

POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Fisica



**TERMOFORESI IN DISPOSITIVI MICROFLUIDICI
FABBRICATI MEDIANTE LASER A FEMTOSECONDI.**

Relatore: Prof.ssa Roberta Ramponi
Correlatore: Dott. Roberto Osellame
Correlatore: Dott.ssa Francesca Bragheri

Candidato:
Tommaso Zandrini
771014

Anno Accademico 2012-2013

Indice

Elenco delle figure	iv
Elenco delle tabelle	vi
Riassunto	vii
Abstract	x
Introduzione	1
1 Dispositivi microfluidici per esperimenti di termoforesi	3
1.1 Lab-On-Chip microfluidici	3
1.1.1 Caratteristiche generali	3
1.1.2 Tecniche di fabbricazione	5
1.2 Separazione di particelle in dispositivi microfluidici	10
1.3 Termoforesi	19
1.4 Studi sperimentali di termoforesi	21
1.4.1 Esperimenti con dispositivi macroscopici	21
1.4.2 Esperimenti con dispositivi microfluidici	23
2 Fabbricazione laser a femtosecondi	25
2.1 Principi dell'interazione tra materia e radiazione laser a femtosecondi	27
2.1.1 Assorbimento non lineare	27
2.1.2 Modifiche indotte nel materiale	29
2.2 Parametri di irraggiamento delle sorgenti laser	30

2.3	Fabbricazione di guide d'onda	32
2.4	Fabbricazione di canali	33
2.4.1	Controllo della geometria dei canali	36
3	Il setup sperimentale	40
3.1	Il setup di fabbricazione	40
3.2	Il setup di connettorizzazione	46
3.3	Il setup di caratterizzazione	48
4	Realizzazione del dispositivo fluidico	53
4.1	Progetto del dispositivo	54
4.2	Realizzazione del dispositivo	57
4.3	Montaggio sul setup di caratterizzazione	59
4.4	Caratterizzazione del primo prototipo del dispositivo	62
4.4.1	Tecniche di misura della temperatura in canali microfluidici	62
4.4.2	Misure della temperatura nei canali del dispositivo	65
4.4.3	Analisi della temperatura in funzione della portata dei canali	66
4.4.4	Prime evidenze di termoforesi	68
4.5	Modifiche apportate al progetto iniziale	70
4.6	Caratterizzazione della seconda versione del dispositivo	73
4.6.1	Validazione della tecnica Differential Dynamic Microscopy	74
4.6.2	Misure di concentrazione	74
4.6.3	Conclusioni e criticità dei dispositivi fluidici per termoforesi realizzati	82
5	Prototipo del dispositivo con sorgenti termiche a stato solido	83
5.1	Progetto del dispositivo	84
5.2	Scelta della lega metallica	86
5.3	Realizzazione del dispositivo	89
5.4	Montaggio sul setup di caratterizzazione	91
5.5	Validazione del dispositivo	92
	Conclusioni	95

Elenco delle figure

1.1	Schema di chip per elettroforesi	11
1.2	Fotografia di chip per cromatografia	12
1.3	Schema di funzionamento della Field Flow Fractionation	13
1.4	Schema di dispositivo per magnetoforesi	14
1.5	Schema di un sorter cellulare che sfrutta la dielettroforesi	15
1.6	Schema di separazione in un canale per acustoforesi	16
1.7	Schema di sorter per FACS	18
1.8	Chip per termoforesi in silicio	23
1.9	Chip per termoforesi in pdms	24
2.1	Schema dei processi di assorbimento non lineare	27
2.2	Fasi della formazione di nano-crepe	30
2.3	Immagini SEM di nano-crepe	35
2.4	Fasi di etching di un canale	37
2.5	Correzione della forma conica di un canale	37
2.6	Irraggiamento di camere concentriche	38
3.1	Foto del setup di scrittura a femtosecondi	42
3.2	Foto del setup di connettorizzazione	47
3.3	Foto del microscopio a fluorescenza invertito	49
3.4	Foto dell'apparato di pompaggio a siringa	50
3.5	Schema dell'apparato di pompaggio a pressione	51
4.1	Progetto del primo dispositivo fluidico	56

4.2	Immagine dei percorsi di irraggiamento laser	57
4.3	Immagine del primo dispositivo fluidico prima e dopo l'attacco chimico in acido	58
4.4	Immagine dei canali del primo dispositivo fluidico riempiti di liquidi colorati	59
4.5	Fotografia del cilindretto metallico attorno al quale viene arrotolato il tubo	59
4.6	Disegno per il supporto di PMMA che sostiene il dispositivo	60
4.7	Fotografia del dispositivo montato sul microscopio invertito	61
4.8	Spettro di emissione del fused silica	63
4.9	Andamento dell'intensità di fluorescenza della Sulforodamina B in funzione del tempo per diversi valori di temperatura	66
4.10	Grafico dell'intensità di fluorescenza nel canale laterale in funzione della portata	67
4.11	Separazione per termoforesi nel primo dispositivo fluidico	69
4.12	Particelle da 240 nm nel primo dispositivo fluidico	70
4.13	Progetto del dispositivo fluidico finale	71
4.14	Immagine del dispositivo fluidico finale prima e dopo l'attacco chimico in acido	72
4.15	Immagine dei canali del dispositivo fluidico finale	73
4.16	Immagine di un canale prima e dopo il trattamento di annealing termico .	73
4.17	Punti sperimentali per calibrazione della tecnica DDM	74
4.18	Esperimenti di termoforesi di particelle da 500 nm con 30 °C di ΔT tra i canali	75
4.19	Grafici della concentrazione di particelle di PS in diverse zone del canale centrale	76
4.20	Simulazione della distribuzione della concentrazione nel canale, nel caso di un gradiente $\Delta T=30$ °C	77
4.21	Immagini della concentrazione nel canale centrale a diverse profondità, con ΔT di 30 °C	78
4.22	Mappa dell'evoluzione temporale della concentrazione nel canale centrale, a ΔT di 6 °C	79

4.23	Mappa dell'evoluzione temporale della concentrazione nel canale centrale, a ΔT di 30 °C	79
4.24	Andamento della concentrazione lungo il canale centrale con gradiente termico di 30°Ce in assenza di gradiente termico	80
4.25	Andamento delle concentrazione nel canale centrale nel lato caldo e nel lato freddo, in funzione del tempo	81
5.1	Schema tridimensionale del dispositivo a stato solido	84
5.2	Schema che illustra il problema dell'apertura numerica necessaria per osservare il canale del dispositivo a stato solido con l'obiettivo del microscopio	85
5.3	Schema 3D del primo prototipo di dispositivo a stato solido realizzato . .	86
5.4	Prova di inserimento di indio in un reservoir	87
5.5	Progetto per la scrittura del prototipo di dispositivo a stato solido	90
5.6	Immagini del canale del dispositivo prima e dopo l'inserimento del metallo	91
5.7	Fotografia del dispositivo a stato solido montato sopra le celle Peltier . . .	91
5.8	Fotografia del dispositivo a stato solido montato sul piatto del microscopio	92
5.9	Immagine al microscopio di particelle da 500 nm nel canale del dispositivo a stato solido	93
5.10	Mappa della concentrazione nel canale del dispositivo a stato solido ottenuta tramite DDM	94

Elenco delle tabelle

5.1	Confronto tra leghe metalliche	88
-----	--	----

Riassunto

La termoforesi è un fenomeno di trasporto di particelle ad opera di un gradiente termico, che negli ultimi anni sta guadagnando attenzione per via della sua possibile applicazione come tecnica di separazione di particelle sulla base delle loro dimensioni e delle loro caratteristiche chimiche superficiali. Di recente diverse tecniche di separazione hanno visto un'implementazione all'interno di dispositivi microscopici detti Lab-On-Chip (LOC). Questo nome è dovuto al fatto che essi racchiudono al proprio interno le funzionalità di diversi strumenti di laboratorio e permettono, grazie alle loro dimensioni molto ridotte, di indagare efficientemente fenomeni microscopici. Per questi motivi è nata l'idea di effettuare esperimenti di termoforesi all'interno di un dispositivo microfluidico. I dispositivi realizzati durante questo lavoro di tesi sono stati fabbricati mediante la tecnica detta Femtosecond Laser Irradiation followed by Chemical Etching (FLICE), che consiste nella creazione di modifiche permanenti all'interno di un chip di fuso di silice irradiandolo con un laser impulsato a femtosecondi. Queste zone verranno poi erose selettivamente procedendo all'immersione del chip in una soluzione acida, creando una rete di microcanali. Durante questo lavoro di tesi sono stati realizzati dispositivi secondo due diverse configurazioni. La prima versione del dispositivo presenta tre canali paralleli, di cui i due laterali vengono utilizzati per far fluire acqua a due diverse temperature così da creare un gradiente termico uniforme in quello centrale. Questo contiene il campione che subisce l'effetto di trasporto dovuto alla termoforesi. Il profilo di concentrazione che si stabilisce al suo interno è stato studiato con una tecnica ottica detta Differential Dynamic Microscopy, che permette di ricavare la concentrazione di particelle di dimensioni inferiori al limite di risoluzione del microscopio ottico analizzando il campo scatterato attraverso il campione stesso. Nonostante sia stato possibile effettuare con successo diverse misure, il

dispositivo ha mostrato alcune criticità. In seguito alla loro analisi, è stato proposto un secondo dispositivo con due reservoir riempiti di metallo che facciano da conduttori termici per sostituire i canali laterali del dispositivo precedente, per aumentare la precisione del gradiente termico applicato.

Abstract

Thermophoresis is a mass transport phenomenon which is gaining attention for its possible application as a particle separation technique based on their dimensions and surface chemical properties. Recently many separation techniques have been implemented in microscopic devices known as lab-on-a-chips (LOCs). The name is due to their ability to integrate different laboratory tools' functions, and they allow to investigate, thanks to their small dimensions, microscopic systems with effects that would be invisible at a macroscopic scale. From these facts the project of performing thermophoresis experiments in a microfluidic device has been born. The devices, produced during this thesis work, have been fabricated using the Femtosecond Laser Irradiation followed by Chemical Etching (FLICE) technique, that consists in irradiating a chip with focused pulsed femtosecond laser light to induce modifications into the substrate and selectively etching the irradiated path in a water-acid solution to dig a microchannel network. Two different device configurations have been proposed. The first version of the device presents three parallel channels: the two lateral channels contain flowing water at two different temperatures which induces a uniform thermal gradient in the central one. The central channel contains the sample on which the thermophoretic effect acts. The concentration profile of the sample has been studied by means of the optical technique named Differential Dynamic Microscopy, which allows to calculate the sample concentration in the channel with particle sizes lower than the microscope resolution limit by analyzing the field scattered through them. Though several measurements have been performed with this device, it has shown some defects. After the analysis of these defects, a second device configuration has been proposed. The lateral channels have been replaced by two metal-filled reservoirs working as thermal contacts, to obtain a more precise control on

the thermal gradient.

Introduzione

In questi anni è in forte crescita l'interesse per sistemi di analisi compatti e portatili che integrino al loro interno diverse funzionalità, detti Lab-On-Chip (LOC) o micro-total-analysis-system, che consentono di eseguire molto rapidamente, e con un consumo ridottissimo di campione e reagenti, diversi tipi di analisi chimico-fisiche. Questi dispositivi sono in grado di sfruttare le proprietà della microfluidica e integrare al loro interno diversi componenti ottici, elettrici e micromeccanici. Grazie alle loro dimensioni ridotte i LOC si rivelano particolarmente adatti per studiare il comportamento di sistemi microscopici ed evidenziare effetti che sarebbero invisibili su dimensioni macroscopiche.

Una delle esigenze dei laboratori che svolgono analisi su campioni biologici o ambientali consiste nella separazione di particelle di dimensioni micrometriche e sub-micrometriche per determinare la loro presenza e la loro quantità nelle soluzioni esaminate. Tra le tecniche di separazione che sono in uso, e talvolta ancora oggetto di studio, in questi laboratori, quella basata sugli effetti della termoforesi, cioè lo spostamento di particelle per l'applicazione di un gradiente termico, sta guadagnando attenzione per la sua capacità di discriminare le particelle non soltanto in base alla loro dimensione, ma anche alle caratteristiche chimiche della loro superficie e alla loro interazione con il solvente, senza la necessità di utilizzare marcatori di vario genere. In questo modo è possibile distinguere particelle che potrebbero sembrare identiche per numerose altre tecniche e arricchisce la varietà degli strumenti di analisi disponibili.

Sulla base di queste due considerazioni è nato, in collaborazione con il gruppo del Soft Matter Lab del dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica del Politecnico di Milano guidato dal prof. Roberto Piazza, il progetto in cui è inserito questo lavoro di tesi, durante il quale sono state curate la produzione e l'ottimizzazione di un dispositivo

microfluidico, realizzato tramite irraggiamento con laser a femtosecondi e attacco chimico in acido secondo la tecnica FLICE (Femtosecond Laser Irradiation followed by Chemical Etching). Il dispositivo è stato progettato per esperimenti di termoforesi, allo scopo di indagare il fenomeno fondamentale e produrre dei prototipi di dispositivi in grado di ottenere separazione.

Quindi nel *primo capitolo* sono illustrate le proprietà generali dei Lab-On-Chip e le loro principali tecniche di fabbricazione. Successivamente viene presentata una panoramica sulle tecniche di separazione che hanno visto un'implementazione in chip. Il capitolo si conclude con un approfondimento sulla termoforesi, con un'attenzione particolare agli studi sperimentali su questo fenomeno.

Nel *secondo capitolo* sono spiegati i principi e i meccanismi fisici che stanno alla base della tecnica di fabbricazione FLICE e le sue applicazioni alla produzione di guide d'onda e circuiti di canali microfluidici, discutendo più in dettaglio le tecniche utilizzate per ottenere canali di forma e dimensione controllata, utilizzate nel corso di questo lavoro di tesi.

Nel *terzo capitolo* è mostrata la strumentazione di laboratorio utilizzata per le diverse fasi della produzione dei dispositivi e per la loro caratterizzazione. Gli esperimenti di caratterizzazione sono stati svolti presso il dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica del Politecnico di Milano.

Nel *quarto capitolo* si racconta come sia stato realizzato un dispositivo con tre canali fluidici, di cui i due laterali portano acqua a diverse temperature per creare un gradiente termico, e come il progetto originario sia stato modificato in seguito alle criticità emerse durante il suo utilizzo. In seguito sono presentati i risultati delle misure di concentrazione in presenza di termoforesi effettuate utilizzando la tecnica ottica di analisi del campo scatterato attraverso il campione detta Differential Dynamic Microscopy.

Nel *quinto capitolo* viene proposto un diverso dispositivo con reservoir riempiti di metallo, poste ai lati di un canale, per condurre il calore, chiamato per brevità dispositivo a stato solido, che si propone di superare alcuni inconvenienti di quello presentato nel capitolo precedente.

Capitolo 1

Dispositivi microfluidici per esperimenti di termoforesi

L'esigenza di poter compiere analisi di tipo chimico/fisico su piccole quantità di campioni senza essere vincolati ad un laboratorio con strumentazione dedicata, insieme agli sviluppi delle tecnologie di microfabbricazione, ha portato negli ultimi dieci anni molti gruppi di ricerca e anche numerose aziende a sviluppare dispositivi miniaturizzati che integrano diverse componenti. Questi dispositivi, detti Lab-On-Chip (LOC), consentono la gestione dei campioni attraverso canali microfluidici, e presentano al loro interno elementi micromeccanici, ottici o elettronici che ne completano le funzionalità, permettendo la realizzazione di diversi generi di analisi, sia a livello cellulare sia molecolare.

1.1 Lab-On-Chip microfluidici

1.1.1 Caratteristiche generali

I dispositivi microfluidici sono caratterizzati dalla presenza di una rete di canali con diametri che possono andare da diverse centinaia a poche decine di micron, che vengono utilizzati per condurre il campione nelle zone dove vengono effettuate le analisi e possono fungere essi stessi da camere in cui queste vengono eseguite. Al loro interno possono essere integrati, a seconda della tecnologia di fabbricazione utilizzata e dal materiale scelto, altri componenti di tipo elettronico, micromeccanico e ottico, come resistenze,

sensori di temperatura o pressione, valvole attive o passive e guide d'onda. Il flusso del liquido all'interno dei canali può essere comandato da micropompe interne al dispositivo, qualora le sue dimensioni non siano troppo ridotte, o da un sistema di pompaggio esterno. Nel primo caso esse vengono fabbricate solitamente tramite litografia includendo valvole e membrane in grado di muoversi per l'azione di un campo elettrico o magnetico indotto da elettrodi stampati sul dispositivo, altrimenti nel caso dell'utilizzo di pompe esterne è necessario dotare il circuito di accessi o tubi che permettano di collegarlo al sistema esterno scelto. In questo caso le pompe utilizzate possono essere di vario tipo e controllare la portata o la pressione. Tra quelle che controllano la portata si possono utilizzare pompe a siringa, che come suggerisce il nome si occupano di spingere, o talvolta tirare, lo stantuffo di una siringa, o peristaltiche, che spingono continuamente un fluido senza avere il problema di un serbatoio di dimensioni finite, con una portata però più discontinua. Le pompe a pressione, solitamente alimentate da un compressore, fissano invece la pressione all'interno del serbatoio in cui è contenuto il liquido; in questo caso la portata dipende sia dalla pressione sia dalla resistenza fluidica del circuito utilizzato.

Un'altra caratteristica dei sistemi microfluidici che deriva immediatamente dalle loro dimensioni molto contenute è la laminarità del flusso all'interno dei microcanali. Il flusso all'interno di un canale è definito laminare se i diversi piani del fluido scorrono indipendentemente tra loro senza mescolarsi. Questa condizione garantisce che due fluidi copropagantesi non entrino a contatto tra loro; addirittura controllando il flusso di uno dei due è possibile imporre la portata dell'altro (tecnica nota come focus idrodinamico, solitamente con due flussi di controllo e uno controllato). Un parametro che consente di verificare la laminarità del flusso è il numero di Reynolds, definito come

$$Re = \frac{Dv\rho}{\eta},$$

dove D è il diametro del canale, v la velocità del fluido, ρ la sua densità e η la sua viscosità. Il flusso sarà sicuramente laminare se $Re < 2000$, mentre sarà turbolento se $Re > 3000$. Nella condizione intermedia il suo regime non è esattamente determinato.

Il principale vantaggio di questi sistemi è senz'altro la loro multifunzionalità, ossia la

capacità di integrare diversi componenti che permettono di svolgere analisi senza il bisogno di strumenti esterni specifici, eliminando così il bisogno di acquistare strumentazione dedicata, spesso molto costosa.

La loro dimensione ridotta ne consente anche un trasporto molto semplice, permettendo di compiere, se necessario, analisi sul campo o in laboratori distanti da quello in cui ne è stato testato il funzionamento.

La grande integrazione dei loro componenti ne semplifica anche l'utilizzo, si eliminano infatti la necessità di interfacciare tra loro strumenti diversi e soprattutto la difficoltà di allineare componenti ottici, operazione spesso critica per il corretto funzionamento di un setup.

A questo si può aggiungere il fatto che, grazie alla laminarità del flusso, se la velocità del fluido è sufficiente si può pensare di trascurare gli effetti della diffusione e della gravità, perché le particelle non hanno il tempo di diffondere e sedimentare durante il loro transito vista la breve estensione del microcanale. Questo facilita di molto la manipolazione di cellule o molecole, per contro potrebbe essere uno svantaggio se si volessero mescolare tra loro diverse soluzioni, ad esempio per provocare reazioni chimiche.

Per finire saranno molto più rilevanti e quindi potranno essere sfruttati gli effetti di superficie come capillarità, bagnabilità e tensione superficiale, ad esempio per controllare o favorire la movimentazione di gocce di liquido.

1.1.2 Tecniche di fabbricazione

La scelta di una tecnologia di realizzazione per un dispositivo microfluidico determina senza dubbio le sue caratteristiche e i componenti che potranno essere integrati al suo interno. Possiamo distinguere tre principali tecniche di produzione di circuiti microfluidici:

- stampaggio o fusione di polimeri
- litografia
- fabbricazione laser.

Tutte queste tecniche hanno vantaggi e svantaggi strutturali e ineliminabili, tuttavia alcune sono innegabilmente più accessibili in termini di costo, semplicità di implementazione e strumentazione rispetto ad altre.

Stampaggio o fusione di polimeri

Lo stampaggio e la fusione di polimeri sono le tecniche più semplici ed economiche disponibili per ottenere rapidamente circuiti microfluidici. Lo stampaggio consiste nell'imprimere una matrice solida su un polimero più morbido e successivamente nel trattare il polimero per renderlo duro, ad esempio tramite cottura, o lasciandolo raffreddare se era stato scaldato per renderlo morbido. Nel processo di fusione il polimero in fase liquida viene colato su un negativo del pezzo desiderato e successivamente fatto solidificare. Spesso il fluido che viene colato non contiene direttamente il polimero, ma i monomeri che lo compongono e che reagiscono con degli iniziatori quando viene fornita energia, sotto forma di luce UV o calore, e polimerizzano formando una matrice solida. Spesso è poi necessario incollare tra loro le diverse parti del circuito se si vogliono ottenere dei canali sepolti.

Un primo limite di queste tecniche risiede nelle caratteristiche dei polimeri in uso, tra cui si possono citare il polidimetilsilossano (PDMS) e il polimetilmetacrilato (PMMA). Questi polimeri innanzitutto sono trasparenti alla luce visibile ma non possiedono la qualità ottica del vetro. Ad esempio sia il PMMA sia PDMS presentano una debole autofluorescenza[1], e per la natura dei processi di fabbricazione la qualità delle superfici non è sempre eccellente.

Talvolta questi materiali non sono adatti al contatto con i campioni e le soluzioni di interesse: è stato mostrato che il PDMS è permeabile a diversi gas tra cui il vapore acqueo e tende ad assorbire molecole idrofobiche[2], mentre il PMMA ha scarsa resistenza a diversi solventi comunemente utilizzati quando si trattano campioni biologici o durante le operazioni di pulizia dei circuiti fluidici, come etanolo e acetone.

Questi polimeri hanno poi una scarsa resistenza alle alte temperature, ad esempio il PMMA ha temperatura di transizione vetrosa di 110°C e il PDMS è stabile fino a circa 200°C.

Inoltre la minima dimensione ottenibile dipende da quella della matrice utilizzata: per raggiungere risoluzioni intorno al micron con canali delle dimensioni di alcune decine di micron, come riportato in diversi lavori[3][4], è necessario possedere prima una tecnologia in grado di fabbricare negativi con quella precisione, e nel caso del PDMS la sua viscoelasticità impedisce di avere pareti troppo sottili tra due canali. Per contro, questa proprietà del PDMS permette la realizzazione di valvole all'interno di un circuito.

Litografia

La fotolitografia è la tecnica che è stata sviluppata per la produzione di circuiti microelettronici e si presta anche alla fabbricazione di circuiti microfluidici. Il materiale principe su cui si è evoluta è il silicio, ma può essere utilizzata anche per realizzare strutture su ossido di silicio. Questa tecnologia è in grado di raggiungere, con opportuni accorgimenti, come ad esempio l'utilizzo di maschere che sfruttano gli effetti della diffrazione, risoluzioni di qualche decina di nanometri; tuttavia questa precisione è appannaggio di poche aziende leader a livello mondiale nella produzione di microelettronica e generalmente fuori dalla portata di un laboratorio universitario interessato a produrre pochi esemplari di un dispositivo a scopo di studio. Infatti buona parte dei macchinari necessari hanno un costo che può essere giustificato solo da una produzione di massa destinata poi alla vendita su un mercato molto vasto. Fortunatamente per i dispositivi microfluidici è solitamente sufficiente una risoluzione intorno al micron. La procedura di fabbricazione si compone di diversi passaggi:

- produzione della maschera
- deposizione dello strato di silicio policristallino, ossido di silicio o altro materiale
- deposizione del fotoresist su tutta la superficie del campione da lavorare
- irraggiamento del fotoresist attraverso la maschera
- rimozione della porzione desiderata del fotoresist
- attacco chimico del materiale non coperto da fotoresist
- rimozione del fotoresist residuo

Il fotoresist è un materiale polimerico sensibile alla luce e può essere di tipo positivo o negativo: quello positivo una volta illuminato diventa solubile per determinate sostanze, mentre al contrario quello negativo è solubile in partenza e polimerizza diventando resistente dove viene colpito dalla luce. Sul campione verrà quindi passato un solvente per rimuovere il resist nei punti dove si desidera che il materiale depositato venga poi eroso. La rimozione del materiale può essere eseguita o con immersione in acido, che porta ad un'erosione isotropa, o tramite reactive ion etching (RIE) per avere un profilo più netto. Nel primo caso si parla di *wet etching*, mentre nel secondo di *dry etching*. Il processo di RIE utilizza due piatti metallici tra cui è imposto un campo elettrico ad alta frequenza (nell'ordine dei MHz) che ionizza un gas e muove gli ioni tra i due piatti. Su quello inferiore è posizionato il campione che verrà quindi colpito dagli ioni, che reagiranno con la sua superficie scavandola nella direzione del loro moto, cioè quella perpendicolare al piatto. Per questo motivo questo procedimento permette di avere una forte anisotropia di fabbricazione.

La procedura di deposizione del substrato, applicazione del resist e erosione del materiale può essere iterata se si desidera produrre strutture complesse su più livelli. Questo consente di integrare componenti elettronici e micro-meccanici, a spese di un grande numero di passi di lavorazione. Sullo stesso dispositivo possono essere depositi successivamente vari materiali, tra cui silicio policristallino anche opportunamente drogato (per la produzione di componenti elettronici o strutture micromeccaniche) e ossido di silicio (cioè vetro, per isolare componenti o integrare guide d'onda).

Il primo elemento di criticità delle tecniche fotolitografiche è la produzione della maschera. Essa è di norma piuttosto costosa perché viene fabbricata tramite altre tecniche come la scrittura a scansione con fascio di elettroni e deve essere molto precisa e resistente, soprattutto se si desidera produrre più copie dello stesso dispositivo. La deposizione di silicio policristallino necessita di evaporatori, l'irraggiamento del resist ha bisogno degli opportuni proiettori e soprattutto l'intera lavorazione del campione deve essere eseguita in locali con ambiente controllato.

Il silicio poi risulta non trasparente alla radiazione ultravioletta (oltre che naturalmente a quella visibile), e spesso è necessario procedere ad incollare tra loro due parti

di cui una fa da copertura del circuito microfluidico, con colle apposite o tecniche di thermal-bonding. Se si desidera poter vedere, ad esempio tramite microscopio, l'interno dei canali, la copertura superiore deve essere trasparente; può essere costituita ad esempio da un semplice vetrino da microscopio tagliato allo scopo. Tuttavia per l'osservazione di campioni biologici spesso è necessario poter guardare i campioni con un microscopio in trasmissione, operazione impossibile se anche uno solo dei due lati del campione non è trasparente.

Fabbricazione laser

Rispetto alle altre tecniche, quella di fabbricazione tramite impulsi laser è molto più versatile per la possibilità di usare numerosi materiali diversi, come polimeri o vetri e non necessita di maschere o negativi, ed è quindi adatta per fare prototipazione rapida. In particolare i vetri si distinguono per essere particolarmente inerti, quindi adatti ad applicazioni biologiche, e trasparenti.

Una prima tecnica per ottenere microcanali in substrati di vetro attraverso un fascio laser impulsato consiste nell'ablazione superficiale del chip di vetro, ossia nella formazione di plasma superficiale che porta alla rimozione del materiale. Questa procedura è però piuttosto limitante perché permette di creare solamente strutture superficiali e richiede quindi l'incollaggio successivo di diverse parti, come nel caso della fotolitografia, per ottenere canali sigillati.

Da alcuni anni è stata sviluppata, grazie alla diffusione anche commerciale di sorgenti laser con impulsi della durata di poche centinaia di femtosecondi, una tecnica denominata appunto femtosecond laser micromachining (FLM) che permette, con strumentazione relativamente accessibile in termini di costo dei macchinari e delle strutture necessarie, di fabbricare microcanali sepolti e guide d'onde con geometrie tridimensionali all'interno di un chip di vetro, modificandone le proprietà. Questa tecnica è quella che è stata utilizzata per produrre i dispositivi utilizzati in questo lavoro di tesi e sarà oggetto di un'approfondita descrizione nel prossimo capitolo.

Connettorizzazione

Con tutte queste tecniche è necessario occuparsi dell'interazione dei dispositivi con il mondo macroscopico dell'operatore, che procederà a inserire i campioni da analizzare mediante pipette o siringhe, o attraverso altri macchinari. Bisognerà dunque dotarli di pozzetti o tubi con connessioni compatibili con gli strumenti standard in uso nei laboratori. Queste connessioni dovranno garantire la tenuta in fase di inserimento e di uscita per non disperdere campione e la compatibilità in termini di sterilità e caratteristiche chimiche e meccaniche con la soluzione contenente il campione e con le diverse condizioni sperimentali previste, al pari del materiale utilizzato per il dispositivo.

1.2 Separazione di particelle in dispositivi microfluidici

Tra le molteplici applicazioni in cui trovano impiego dispositivi di tipo LOC, è di sicuro interesse la separazione di particelle differenti tra loro sfruttando le loro proprietà microscopiche. Numerose tecniche di separazione sono da tempo utilizzate in svariati campi come la medicina, la biologia, le biotecnologie e le analisi ambientali, e negli ultimi anni sono state sviluppate diverse soluzioni integrate che sfruttano queste tecniche per compiere operazioni di separazione e conteggio di particelle all'interno di un singolo chip. In tutte le tecniche di separazione, caratteristiche fondamentali che dipendono sia dalla tecnica sia dal tipo di strumentazione utilizzata sono la capacità di distinguere particelle il più possibile simili tra loro ma con fondamentali differenze, cioè la loro sensibilità, e la possibilità di utilizzare quantità minime di campione per svolgere l'analisi. Prima di presentare lo studio della tecnica indagata in questo lavoro di tesi, verranno prese in esame le principali tecniche che hanno visto un'implementazione in chip.

Elettroforesi

L'elettroforesi è una tecnica di separazione che si basa sull'utilizzo di un campo elettrico esterno per muovere particelle cariche, in particolare la separazione avviene sfruttando il rapporto tra la loro carica e il loro volume. Quando delle particelle cariche sono immerse in un campo elettrico, tenderanno a muoversi verso il catodo o l'anodo, a seconda della

loro carica, con una velocità v pari a

$$v = \frac{zE}{6\pi\eta r} \quad (1.1)$$

dove z è la carica della particella, η la viscosità del mezzo in cui è immersa, r il suo raggio di Stokes, che è legato al raggio particella ma tiene conto dell'interazione con il solvente, e E il campo elettrico imposto. Numerosissimi esempi di chip per elettroforesi sono stati presentati, tra i tanti articoli si possono citare il lavoro di Harrison *et al.*[5] del 1993 e quello di Tanyanyiwa *et al.* del 2004[6].

Nell'articolo di Harrison *et al.* il chip presenta due microcanali perpendicolari tra loro realizzati mediante fotolitografia su vetro (Pyrex), uno da cui viene inserito il campione e l'altro lungo il quale avviene la corsa elettroforetica. La rilevazione viene effettuata al microscopio marcando le particelle in fluorescenza ed eccitandole con un laser ad argon: in particolare il funzionamento del dispositivo è dimostrato separando diversi amminoacidi marcati con FITC.

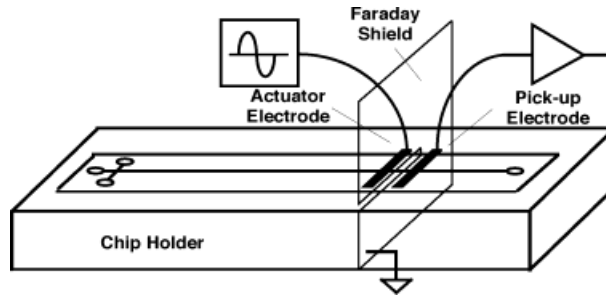


Figura 1.1: Schema del chip per elettroforesi di Tanyanyiwa *et al.*[6], il canale più corto è utilizzato per l'inserimento del campione, quello più lungo per effettuare la corsa elettroforetica, gli elettrodi sono utilizzati per la movimentazione e la rivelazione. Immagine riprodotta da [6].

In quello di Tanyanyiwa *et al.* si presenta una soluzione completamente integrata in grado di fornire una misura delle quantità di sostanza rivelate, che utilizza dei chip commerciali in vetro e polidimetilsilossano (PDMS) a seconda delle soluzioni da analizzare. In questo caso i chip sono stati modificati scavando gli alloggiamenti per gli elettrodi necessari, ed effettuano la rivelazione delle particelle mediante misure di conduttività. Con questo dispositivo è stata mostrata la separazione di diverse specie chimiche come amminoacidi, zuccheri, dolcificanti artificiali, dopamine, efedrine e metanefrine. Nonostante

questo chip abbia una capacità di rivelazione molto maggiore rispetto a quello del 1993, il design dei canali è rimasto il medesimo; tuttavia risulta notevole il livello di integrazione raggiunto, che elimina la necessità di ricorrere a un laser ed un microscopio esterno, oltre a rendere superflua la marcatura in fluorescenza delle sostanze da esaminare.

Cromatografia

La cromatografia si basa sul principio secondo il quale un solvente può attraversare un campione trascinandolo con sé le diverse componenti di esso in fase liquida, ciascuna delle quali si sposterà ad una velocità diversa a seconda della loro affinità con il solvente. Come per l'elettroforesi, sono state proposte diverse soluzioni in chip, che sfruttano i principi della cromatografia capillare già precedentemente utilizzata, come quello di Murrhy *et al.*[7], che presenta un chip in silicio con canali superficiali fabbricato litograficamente e coperto con un vetrino in Pyrex per sigillare la superficie superiore dei canali mantenendo la possibilità di osservarne l'interno dall'alto e compiere una rivelazione UV delle componenti. In questo caso sono stati separati NO_2^- , NO_3^- , I^- e tiourea usando KCl come solvente.

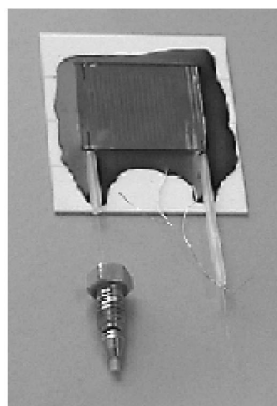


Figura 1.2: Fotografia della colonna per cromatografia su chip di Murrhy *et al.*[7], fabbricata su silicio. Immagine riprodotta da [7].

Field Flow Fractionation

Diversi metodi di separazione sviluppati in LOC sfruttano il profilo di velocità parabolico che si instaura all'interno di un microcanale, in cui gli strati di fluido più vicini alle pareti

avranno velocità minore rispetto a quelli al centro del canale. La tecnica che ha introdotto l'uso di questo fenomeno per ottenere separazione è detta Field Flow Fractionation (FFF) e si basa sull'idea di applicare un'azione esterna che porti le diverse particelle a distanze differenti dalle pareti del canale in modo che acquistino diverse velocità e risultino separate uscendo in tempi successivi. Viene utilizzata anche una variante di questa tecnica in cui il dispositivo prevede di avere due ingressi e due uscite, detta split-flow lateral-transport thin (SPLITT). In questo caso due flussi propagano affiancati nel microcanale principale e le particelle da separare passano dal primo al secondo flusso per via di una forza esterna applicata, che può essere di varia natura a seconda del tipo di particelle analizzate, ad esempio elettrica o magnetica, venendo così raccolte da un'uscita diversa da quella delle altre[8].

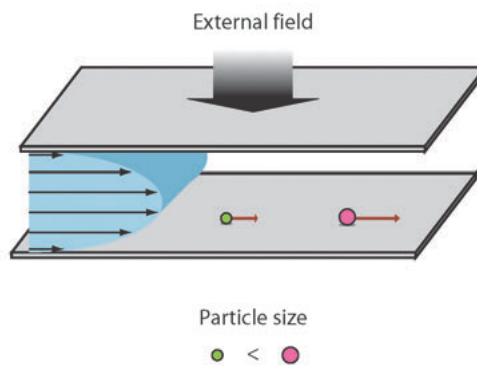


Figura 1.3: *Schema di funzionamento della Field Flow Fractionation, le particelle di diversa dimensione sono schiacciate verso il basso da una forza esterna e sono spinte da strati di fluido a diversa velocità. Immagine riprodotta da [8].*

Magnetoforesi

La magnetoforesi è una tecnica che consiste nell'applicare un campo magnetico perpendicolarmente alla direzione del flusso per separare i campioni all'interno di un microcanale. La tecnica può essere abbinata ad una separazione tipo FFF o SPLITT[9], o sfruttare un dispositivo con diversi canali posti lungo la direzione di applicazione del campo magnetico che raccolgano le particelle una volta separate[10]. Il comportamento magnetico sfruttato può essere quello delle particelle da separare, oppure essere dato da molecole magnetiche che si legano ad esse sfruttando un meccanismo di riconoscimento del tipo

antigene-anticorpo. Quest'ultima soluzione è piuttosto comune, tuttavia abbastanza invasiva perché richiede di legare altre particelle di dimensioni non indifferenti (qualche micron) a quelle in esame, che potrebbero impedire o falsare ulteriori analisi.

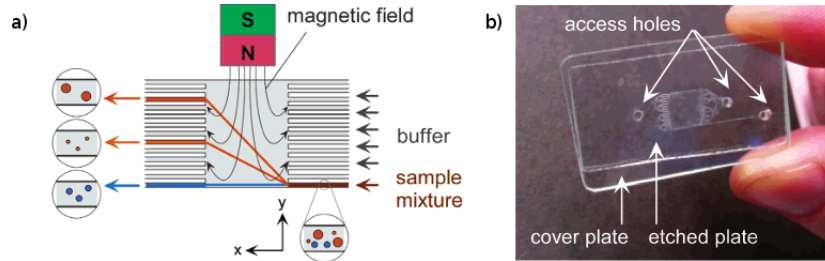


Figura 1.4: a) Schema del dispositivo di Pamme *et al.*[10] in cui effettuano separazione per magnetoforesi e b) foto del dispositivo realizzato in vetro tramite fotolitografia. Immagini riprodotte da [10].

Dielettroforesi

La dielettroforesi (DEP) si basa sulla forza che un oggetto dielettrico sente in presenza di un campo elettrico non stazionario variabile nello spazio. Questa forza risulta in prima approssimazione proporzionale al gradiente del quadrato del campo elettrico medio secondo la relazione[11]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}(f_{CM}(\omega)) \nabla E_{RMS}^2 \quad (1.2)$$

dove f_{CM} è il fattore di Clausius-Mosotti che dipende dalla frequenza del campo elettrico applicato, r è il raggio della particella e E è il campo elettrico applicato. Un esempio di un'applicazione di questa tecnica è il lavoro di Kim *et al.*[12], dove alcuni marcatori dielettroforetici sono stati applicati a diversi tipi di cellule per separarle all'interno dei canali di un chip in poliimmide tenuto tra due vetrini. Al loro interno sono poi stati inseriti gli elettrodi necessari per ottenere il campo elettrico. I marcatori utilizzati sono particelle di polistirene con diversi diametri e sono i responsabili dell'interazione con il campo elettrico.

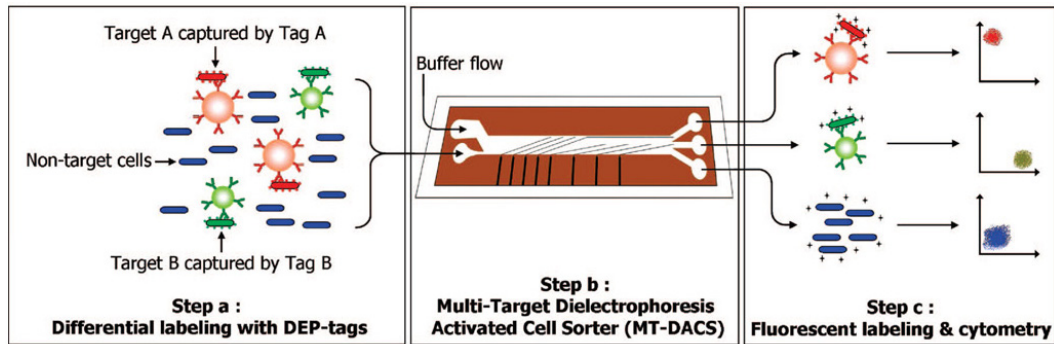


Figura 1.5: Schema del sorter cellulare di Kim et al.[12], le cellule sono marcate con marcatori dielettroforetici diversi, separate nel chip e rivelate in fluorescenza nei pozzetti di raccolta. Immagine riprodotta da [12].

Acustoforesi

La separazione all'interno di un canale può essere ottenuta anche tramite forze acustiche: se all'interno di un microcanale si stabilisce un'onda acustica stazionaria, le particelle tenderanno a spostarsi verso i nodi o i ventri a velocità diverse a seconda della loro dimensione, densità e compressibilità[13]: In questo modo, se si instaura in un canale un'onda stazionaria la cui mezza lunghezza d'onda è pari alla sua altezza, le particelle si separano lungo la direzione perpendicolare all'asse del canale nel tratto in cui è presente l'onda, e per la laminarità del flusso al suo interno, rimarranno separate nel tratto successivo. Di recente è stata sviluppata anche una tecnica analoga con onde acustiche superficiali[14] (surface acoustic wave, SAW) che permette di applicare gli stessi metodi di separazione per acustoforesi anche con substrati di PDMS, che per la scarsa riflettività acustica non potrebbe sostenere onde stazionarie al suo interno.

Pinched Flow Fractionation

Ci sono tecniche che non necessitano dell'applicazione di un campo esterno perché sfruttano una particolare geometria del dispositivo, ad esempio possono contenere ostacoli che devino il flusso solo di alcune particelle a seconda della loro dimensione. Una tecnica notevole è quella chiamata pinched flow fractionation, in cui le particelle sono tenute sul fondo di un canale, in modo che tocchino tutto il fondo ma il loro centro sia ad altezze diverse a causa della loro diversa dimensione[15]. Il canale si allarga poi in modo da man-

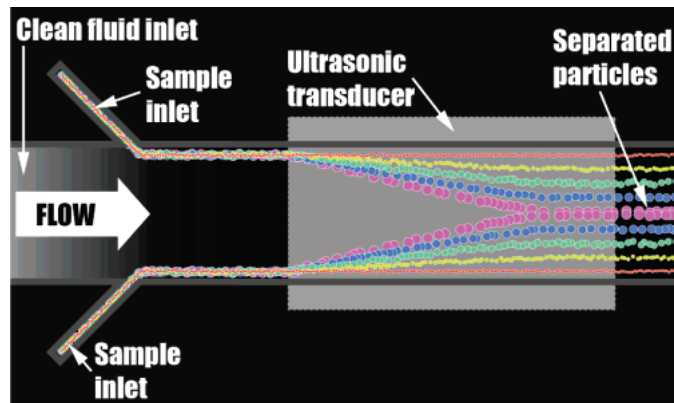


Figura 1.6: *Schema del dispositivo di Petersson et al.[13], le particelle si muovono verso il centro del canale a diverse velocità nel tratto in cui è presente l'onda acustica stazionaria. Immagine riprodotta da [13].*

tenere lo stesso rapporto tra la sua dimensione e la distanza dei centri delle particelle dal fondo, risultando così in una maggiore separazione tra loro. Per mantenere le particelle sul fondo del primo tratto del canale, si utilizzano due ingressi, uno che contiene solo fluido ad alta pressione, e l'altro contenente anche le particelle a pressione inferiore, che risulta compresso dal primo, schiacciando quindi le particelle sul fondo.

Tecniche ottiche

Negli ultimi anni diverse analisi di campioni biologici hanno rivelato che anche popolazioni uniformi presentano eterogeneità, dimostrando l'importanza di analisi a livello di singola cellula. Sono state quindi sviluppate tecniche ottiche che permettono di manipolare e analizzare cellule senza contatto, quindi senza modificarne lo status, sfruttando forze ottiche.

Un fascio laser è in grado di esercitare una forza su una particella per via della pressione di radiazione che esercita su di essa. Se tutto ciò viene realizzato all'interno di un canale microfluidico, si apre la possibilità di spingere una singola particella per deviarla verso la direzione desiderata, ad esempio per dirigerla verso una determinata uscita di un circuito microfluidico.

Nel 2004 Wang *et al.* hanno presentato un dispositivo[16] costituito da un chip contenente i microcanali realizzato litograficamente su vetro e inserito in una cartuccia di materiale plastico in cui sono presenti i serbatoi per il liquido da analizzare. Il canale

principale in cui vengono fatte fluire le cellule da separare si biforca in due canali di uscita, le cellule sono mantenute nel centro del canale sfruttando il focus idrodinamico dato dal liquido che proviene da due canali posti all'inizio del canale principale e perpendicolari ad esso. Le cellule che devono essere spinte nel secondo canale di uscita sono marcate in fluorescenza tramite GFP e vengono eccitate e deviate da due laser esterni al circuito, che vengono focalizzati sul canale. Il segnale di fluorescenza viene catturato da un fotomoltiplicatore e l'analisi di questo segnale e l'attivazione del laser per lo spostamento delle cellule sono affidate ad un'elettronica dedicata. Questo sistema si è dimostrato molto efficiente, tuttavia rimane molto critico l'allineamento delle varie componenti ottiche, viste le dimensioni molto ridotte del circuito microfluidico.

Un Lab-on-Chip ottico[17] realizzato tramite FLM e che sfrutta la stessa tecnica del precedente, detta fluorescent activated cell sorting (FACS), ma integra i componenti ottici all'interno del chip che contiene i microcanali, è stato presentato da Bragheri *et al.* nel 2012. Come mostrato nello schema di Fig. 1.7, si compone di due canali che confluiscono in uno solo, per poi ridiversi in due, in cui la laminarità del flusso garantisce che le cellule, che entrano solo dal primo ingresso, escano, in assenza di azione esterna, esclusivamente dalla prima uscita. Sul tratto centrale del canale sono affacciate due guide, di cui la prima eccita la fluorescenza delle cellule, e la seconda, se è stato registrato il segnale di fluorescenza, spinge la cellula interessata verso la regione del canale che uscirà dalla seconda uscita, ottenendo così la separazione in base alla fluorescenza. La rivelazione è stata automatizzata controllando al computer in tempo reale le immagini raccolte attraverso un microscopio ottico e una CCD. Ogni volta che il software rileva un segnale di fluorescenza, attiva il laser che spinge le cellule per separarle e farle fluire nel flusso secondario. In questo caso non è necessario allineare alcun componente ottico per effettuare gli esperimenti, poiché le guide sono integrate nello stesso vetro in cui sono scavati i canali, e la luce in ingresso e in uscita dalle guide si propaga attraverso fibre ottiche incollate al dispositivo.

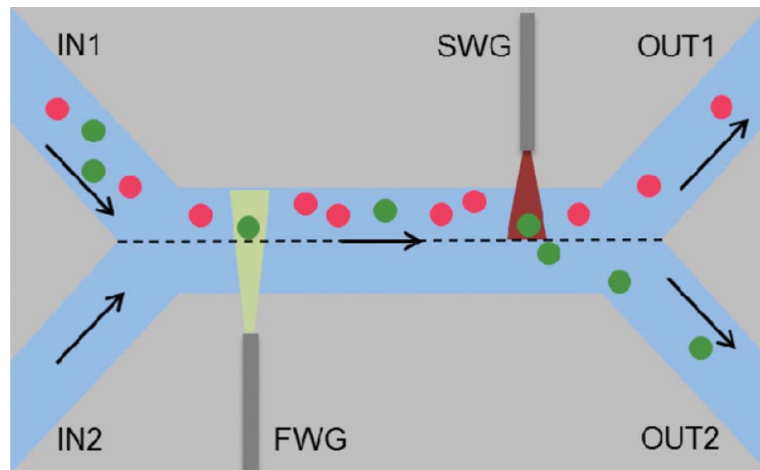


Figura 1.7: *Schema del dispositivo di Bragheri et al.[17], la fluorescenza delle cellule è attivata dalla prima guida (FWG), la seconda (SWG) si occupa di spingerle perché escano dalla seconda uscita. Immagine riprodotta da [17].*

Termoforesi

Una tecnica di separazione di recente interesse e molto promettente per diverse classi di particelle come cellule, proteine, frammenti di DNA, polimeri e altri colloidali, i cui principi fisici sottostanti sono tutt'ora oggetto di studio, è quella basata sugli effetti della termoforesi. La termoforesi è un fenomeno di trasporto di massa indotto da un gradiente di temperatura, che può ricordare, per il tipo di esperimenti che permette di effettuare, il fenomeno ben noto e sfruttato alla base dell'elettroforesi, ma presenta sostanziali differenze. Innanzitutto in presenza di un gradiente termico costante e a transitorio esaurito, si instaura un gradiente stazionario di concentrazione, anziché una separazione totale delle componenti. La forte dipendenza di questo fenomeno dall'interazione tra il solvente e gli elementi presenti sulla superficie delle particelle da separare permette di distinguere con grande precisione particelle anche molto simili tra loro, che potrebbero essere ad esempio indistinguibili tramite elettroforesi perché presentano massa e carica pressoché identiche. Nonostante questo fenomeno di trasporto sia stato osservato nei liquidi indipendentemente da Ludwig e Soret nella seconda metà del 1800, manca tutt'ora una comprensione microscopica accurata del fenomeno. Le indagini sono state condotte negli anni passati attraverso apparati sperimentali macroscopici e solo recentemente utilizzando sistemi microfluidici. Questo lavoro di tesi si propone di realizzare un dispo-

sitivo microfluidico mediante lavorazione laser a femtosecondi che permetta di svolgere esperimenti sulla termoforesi in maniera rapida ed efficiente utilizzando strumentazione di laboratorio di uso comune, allo scopo di chiarire fenomeni fisici non ancora del tutto spiegati e di sperimentare alcune possibili applicazioni.

1.3 Termoforesi

Poiché, come detto prima, la termoforesi è un fenomeno di trasporto di massa, gli studi sul di essa si propongono di analizzare il moto di particelle (generalmente molecole, anche di notevole complessità) in presenza di un gradiente di temperatura. Questo moto è da sommare alla diffusione Browniana presente in tutti i sistemi.

È possibile scrivere il flusso totale di massa delle particelle interessate all'interno di una soluzione come

$$J = -D\nabla c - cD_t\nabla T, \quad (1.3)$$

dove D è il coefficiente di diffusione Browniana, c la concentrazione e D_t il coefficiente di diffusione termica. Si noti che dimensionalmente D_t non è un coefficiente di diffusione, ma piuttosto una mobilità.

Quando si esaurisce il flusso di massa si giunge ad uno stato stazionario che, ipotizzando un gradiente uniforme di temperatura diretto lungo z , porta ad un profilo di concentrazione descritto dall'equazione

$$\frac{dc}{dz} = -cS_t\frac{dT}{dz}, \quad (1.4)$$

dove $S_t = D_t/D$ è detto *coefficiente di Soret* e risulta positivo quando le particelle si muovono verso il lato freddo del sistema.

È possibile quindi definire una lunghezza caratteristica

$$\ell_t = (S_t\nabla T)^{-1} \quad (1.5)$$

sopra la quale l'effetto della termoforesi risulta dominante rispetto alla diffusione Browniana[18].

Il comportamento di diverse molecole si differenzia molto a seconda della loro caratteristiche. Ad esempio è stato mostrato per differenti sistemi contenenti particelle colloidali che il coefficiente di Soret presenta una forte dipendenza dalle dimensioni delle particelle, dalla loro concentrazione e dalla temperatura[19].

Per analizzare esplicitamente gli effetti della concentrazione sul moto delle molecole in presenza di gradiente termico, il coefficiente di Soret può essere espanso come

$$S_t = S_{t,0} + Fc + O(c^2), \quad (1.6)$$

dove $S_{t,0}$ è il coefficiente di Soret a diluizione infinita, cioè con una diluizione tale da non avere nessuna interazione tra le particelle, c la concentrazione e F un termine empirico che tiene conto dell'interazione tra le particelle di soluto[20].

Per quanto riguarda la temperatura, si osserva un'inversione di segno del coefficiente S_t ad una certa temperatura critica T^* , che corrisponde ad un cambio di comportamento, cioè le particelle possono diventare da termofliche a termofobiche o viceversa, invertendo il verso del loro spostamento. La dipendenza di T^* dalla temperatura è descritta con una certa accuratezza dalla relazione empirica

$$S_t(T) = S_t^\infty \left[1 - \exp\left(\frac{T^* - T}{T_0}\right) \right] \quad (1.7)$$

dove S_t^∞ rappresenta un limite asintotico positivo ad alta temperatura e T_0 è una costante che determina la velocità della crescita di S_t con la temperatura[18].

Questi fenomeni sembrano dipendere molto, oltre che dalle caratteristiche superficiali delle diverse particelle, anche dalle caratteristiche dell'intero sistema[21], come il tipo di solvente utilizzato e la presenza di altre specie chimiche al suo interno. Queste differenze possono essere sfruttate per separare particelle che si distinguono ad esempio per diverse T^* .

Ad ora sono stati proposti numerosi modelli teorici per spiegare le interazioni tra le particelle e il solvente in cui sono immerse[18][20], così come sono stati compiuti tentativi di costruire modelli numerici[20] per predire il comportamento di diversi tipi di particelle, come colloidali, proteine, aggregati di surfattanti e polimeri. Tuttavia lo studio di questo

fenomeno necessita ancora di uno studio sperimentale approfondito che permetta di collezionare una quantità sufficiente di dati[18] per supportare lo sviluppo della teoria e dirimere le questioni non ancora chiarite.

1.4 Studi sperimentali di termoforesi

Nonostante la termoforesi sia un fenomeno particolarmente evidente per particelle di dimensioni ridotte e su brevi distanze, i primi studi per osservare e analizzare sperimentalmente questo fenomeno di trasporto in liquidi e gas sono stati effettuati tramite sistemi macroscopici[18][20].

1.4.1 Esperimenti con dispositivi macroscopici

Per lo studio della termoforesi nei liquidi[18] il dispositivo più semplice utilizzato è la cella di diffusione. Essa si compone di due piastre poste a due temperature differenti, tra le quali si trova la soluzione contenente le particelle di interesse. A seconda della natura della soluzione, il tempo perché si stabilisca una concentrazione di equilibrio può variare da poche decine di minuti a diverse ore. Una volta che l'equilibrio viene raggiunto, è possibile misurare la concentrazione. Un metodo che permette di non perturbare il sistema consiste nell'osservare la deflessione di un fascio laser che attraversa la cella e vede una variazione del suo indice di rifrazione causata dalla diversa concentrazione del soluto. Questa tecnica impone una dimensione minima della cella, poiché il fascio ha una sua dimensione caratteristica e deve essere sufficientemente lontano dalle due piastre perché non abbia alcun tipo di interazione con le loro superfici. La deflessione del fascio viene misurata in uscita dalla cella con un sensore ottico sensibile alla posizione.

Per lo studio di miscele di gas[18] vengono prevalentemente utilizzate delle *colonne termogravitazionali*, che consistono in due cilindri concentrici tenuti a due diverse temperature. La miscela è posta nell'intercapedine tra i due cilindri. Questo apparato risulta essere molto efficiente per la separazione di specie diverse fino a che il coefficiente di diffusione è sufficientemente elevato, tuttavia risente fortemente della convezione, che

rimescola i gas riducendo parzialmente l'effetto della termoforesi, pertanto è necessario tenerne conto quando si procede ad analizzare i dati.

Sono stati poi sviluppate tecniche tutto-ottiche[18] per lo studio dei fenomeni di termoforesi, che permettono di osservarne gli effetti all'interno di sistemi liquidi. Una di queste è la tecnica del *thermal lensing*. Questa tecnica sfrutta il gradiente termico prodotto da un fascio laser che attraversa il campione surriscaldandolo per la presenza di assorbitori. Il gradiente termico provoca una variazione della concentrazione causando una variazione locale dell'indice di rifrazione e quindi un effetto di focalizzazione o defocalizzazione del fascio stesso che può essere misurato in uscita dal sistema. Un vantaggio di questa tecnica è il tempo di raggiungimento dello stato di equilibrio, certamente più breve rispetto a quello necessario quando si utilizzano celle di diffusione o colonne termogravitazionali. Per contro risulta molto rilevante l'effetto della convezione.

Il moto delle particelle in un liquido può anche essere osservato utilizzando tecniche di imaging[18]. Un modo per seguire il moto di particelle indistinguibili al microscopio è quello di utilizzare un sistema a fluorescenza, composto da una sorgente luminosa in grado di emettere nella lunghezza d'onda assorbita dalle molecole fluorescenti utilizzate e da un sistema di raccolta della luce di fluorescenza in grado di eliminare la luce di eccitazione. Questi compiti sono svolti in genere da un microscopio a fluorescenza, che integra una sorgente luminosa a larga banda e un blocco di filtri accoppiati in modo che la luce di eccitazione passi dal primo filtro e quella raccolta dall'obiettivo passi dal secondo, prima di raggiungere gli oculari o il sensore d'immagine. I due filtri devono essere scelti in base alla molecola fluorescente utilizzata. Questo però è possibile solo se le particelle interessate sono di per sé fluorescenti o se vengono marcate con appositi fluorofori. Un difetto delle tecniche di fluorescenza è dato dal bleaching dei fluorofori che limita il numero di immagini che possono essere acquisite prima che la molecola si degradi e cessi il proprio comportamento fluorescente. In questo caso il sistema utilizzato non è propriamente macroscopico, perché le dimensioni in cui sono confinate le particelle devono essere piuttosto ridotte perché queste possano essere seguite con un microscopio, tuttavia non vengono in alcun modo sfruttate le potenzialità della microfluidica in esperimenti di questo genere.

1.4.2 Esperimenti con dispositivi microfluidici

I vari sistemi macroscopici soffrono della necessità di avere una strumentazione dedicata per rivelare il segnale in uscita, oltre che dell'effetto della convezione, ineliminabile in sistemi liquidi o gassosi con dimensioni che vanno da pochi millimetri a diversi centimetri.

Per questi motivi negli ultimi anni sono stati sviluppati dispositivi microfluidici che permettono di superare alcune di queste limitazioni, perché gli esperimenti sono realizzati in canali con dimensioni da poche decine a qualche centinaia di micron.

Un esempio è il lavoro di Geelhoed *et al.*[22] in cui viene presentato un dispositivo microfluidico realizzato in silicio in cui sono stati fabbricati canali scavati tramite etching. Il campione, che in questo lavoro è costituito da una soluzione contenente sferette di polistirene di 490 nm di diametro, viene inserito in un lato del canale principale e fatto fluire fino alla fine di esso dove viene separato in due altri canali posti ai due lati del primo (Fig. 1.8). La separazione viene ottenuta integrando delle resistenze su uno dei due lati del canale principale che scaldano quel lato per effetto Joule: in questo modo le particelle si accumulano su un lato del canale principale e vengono indirizzate nel canale di raccolta che si trova su quel lato. Sulla superficie di questo dispositivo è stato incollato un vetrino da microscopio che permette di osservare i canali dall'alto, senza rischiare fuoriuscite di liquido. La temperatura all'interno del canale principale viene controllata utilizzando un fluoroforo la cui intensità di fluorescenza diminuisce con l'aumentare della temperatura.

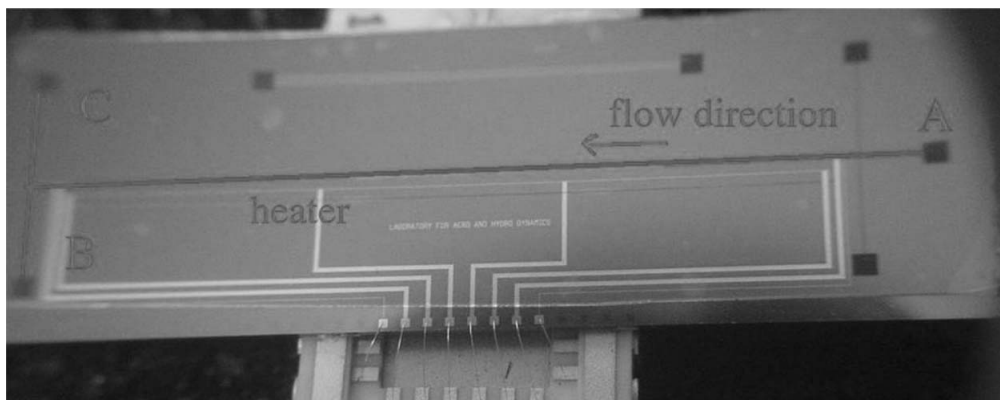


Figura 1.8: *Chip in silicio per la termoseparazione di Geelhoed et al.*[22], il campione viene inserito nel pozzetto A, viene separato durante il transito nel canale principale e diviso tra i pozzetti B e C a seconda del suo comportamento termofobico o termofilico. Immagine riprodotta da [22].

Un altro esempio di dispositivo microfluidico per lo studio dei fenomeni di termoforesi è quello presentato da Vigolo *et al.*[21]. Nell'articolo mostrano di aver realizzato diversi circuiti microfluidici in PDMS; uno di questi circuiti presenta due serbatoi in cui viene fatta fluire acqua a due temperature diverse per instaurare il gradiente termico desiderato all'interno del canale che conterrà il campione in esame (Fig. 1.9). Gli altri circuiti, invece, hanno al loro interno delle resistenze realizzate inserendo resine resistive all'interno di un canale che si occupano di scaldare un lato dell'altro canale in cui fluisce la soluzione che si vuole osservare. I canali sono poi stati coperti con un vetrino di 0.17 mm di spessore per sigillare i canali.

Con questi dispositivi è stato ricavato il profilo di concentrazione raggiunto nel canale centrale dopo aver imposto una differenza di temperatura di alcuni centesimi di grado con particelle di polistirene di diametro di 117 nm e 477 nm, in canali di larghezza di 50 e 75 μm . Nonostante il canale sia molto lungo per un dispositivo microfluidico, più di una decina di centimetri, a causa del gradiente termico molto ridotto, la separazione ottenuta è completa solamente a basse velocità della soluzione all'interno del canale. Naturalmente a basse velocità l'efficacia della separazione risentirà maggiormente degli effetti della diffusione. Le principali cause del raggiungimento di un gradiente di temperature così esiguo sono la bassa conduttività termica del PDMS (0.15 W/mK, contro gli 0.58 W/mK dell'acqua e 1.05 del vetro) che fa sì che la maggior parte del gradiente termico cada sulle pareti di PDMS, e l'impossibilità di realizzare pareti di PDMS troppo sottili per via della sua elasticità.

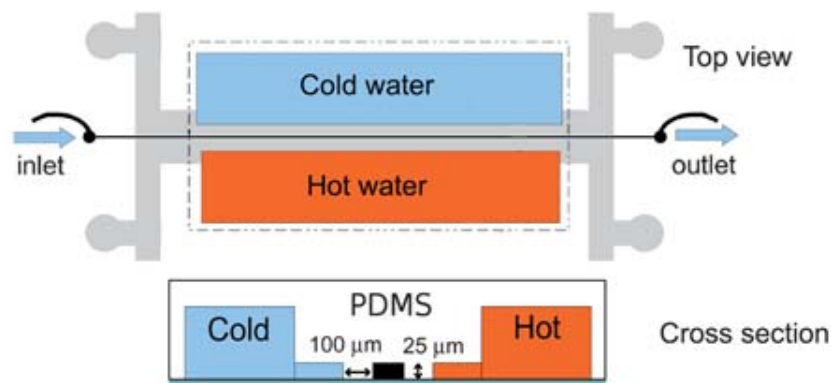


Figura 1.9: *Schema del chip in PDMS di Vigolo et al.[21] nella sua versione con serbatoi di acqua a due temperature diverse. Immagine riprodotta da [21].*

Capitolo 2

Fabbricazione laser a femtosecondi

La tecnica di fabbricazione attraverso l'utilizzo di laser a femtosecondi (Femtosecond Laser Micromachining, FLM) è stata sviluppata a partire dal 1996, quando è stata dimostrata la possibilità di indurre un cambio di indice di rifrazione in diversi vetri attraverso impulsi di un centinaio di femtosecondi[23]. Lo scopo iniziale per cui questa tecnica è stata creata è la produzione di dispositivi per l'industria delle telecomunicazioni, per cui è utile avere circuiti di guide d'onda con grande libertà di scelta delle geometrie.

Successivamente nel 2001 la FLM è stata integrata per sviluppare la FLICE (Femtosecond Laser Irradiation followed by Chemical Etching) che ha permesso di fabbricare microcanali sepolti di circa un centinaio di micron di lunghezza e diametro di 10 micron all'interno di un chip di silice[24]. Questa tecnica si compone di due passaggi: prima il vetro viene irraggiato lungo il percorso desiderato, in un secondo momento il substrato è messo in acido perché questo scavi i canali lungo la zona irraggiata dal laser. In questo modo è stata aperta la strada alla produzione di dispositivi microfluidici e optofluidici tridimensionali utilizzando esclusivamente tecniche di fabbricazione tramite laser a femtosecondi.

La fabbricazione laser a femtosecondi presenta alcune caratteristiche uniche rispetto alle altre tecniche usate per la fabbricazione di lab-on-chip, come quelle discusse nel capitolo precedente.

Innanzitutto permette di scrivere in un solo passaggio circuiti tridimensionali sepolti all'interno del substrato vetroso, in cui le strutture possono essere orientate sia paral-

lelemente alla superficie del dispositivo, sia perpendicolarmente. Al contrario, le altre tecniche permettono soltanto di fabbricare strutture tridimensionali uno strato alla volta, come nel caso della fotolitografia su silicio o vetro, e necessitano di una copertura se si desidera avere un canale sepolto osservabile dall'esterno.

Un altro vantaggio è la rapidità offerta da questa tecnica, che permette di realizzare un dispositivo in pochi giorni, e se necessario di produrne più versioni in parallelo. È sufficiente irraggiare il campione per produrre le modifiche desiderate nel materiale e dare origine a guide d'onda e tracciati per l'attacco chimico e quindi per la fabbricazione di canali. Solitamente il passaggio in acido dura alcune ore, a seconda della complessità del circuito desiderato e delle condizioni di attacco, come l'acido utilizzato, la sua concentrazione e la sua temperatura.

Il setup di fabbricazione è piuttosto semplice e più economico rispetto a quello richiesto per la fabbricazione fotolitografica: non sono necessarie maschere, proiettori e soprattutto clean-room. La minima dimensione ottenibile è molto inferiore a quella permessa con le tecniche standard di stampaggio su polimeri e il vetro utilizzato ha caratteristiche ottiche, fisiche e meccaniche di gran lunga più adatte, per via della sua solidità, trasparenza e inerzia chimica, alla gestione fluidica di un gran numero di campione biologici. Inoltre la possibilità di integrare componenti ottiche e microfluidiche all'interno di un solo chip riduce al minimo i problemi dovuti alle difficoltà dell'allineamento, infatti tutto il dispositivo sarà soggetto ai medesimi spostamenti micrometrici dovuti alla variazione di temperatura e alle vibrazioni del sistema su cui è posto, per cui l'allineamento dipende solo dal sistema di movimentazione del campione durante l'irraggiamento, la cui precisione può aggirarsi intorno ai 100 nm.

Nonostante la fabbricazione in parallelo di un numero elevato di dispositivi sia preclusa per la natura stessa di questa tecnica, e quindi risulti difficile immaginarne applicazioni per la produzione di massa di dispositivi, la fabbricazione a femtosecondi si è affermata per la prototipazione rapida di circuiti ottici e optofluidici e per la produzione di singoli dispositivi in ambito di ricerca, dove la velocità di realizzazione, il costo contenuto di fabbricazione e l'estrema flessibilità nella scelta delle geometrie sono essenziali.

2.1 Principi dell'interazione tra materia e radiazione laser a femtosecondi

I materiali utilizzati come substrati per la fabbricazione a femtosecondi hanno un energy gap E_g maggiore dell'energia $h\nu$ dei fotoni del fascio laser utilizzato per la scrittura, dove h è la costante di Planck e ν la frequenza della radiazione laser; per questo risultano trasparenti a quella radiazione e non ne assorbono l'energia, fino a che l'intensità del campo elettrico non è sufficientemente elevata per innescare processi di assorbimento non lineare con un'efficienza utile. Questo fa sì che, fino a che il fascio di scrittura non è focalizzato a sufficienza, non avvengano modifiche all'interno del materiale. Nel punto di fuoco invece, dove la densità di energia è molto elevata, viene generato un plasma di elettroni che cede energia al substrato modificando la sua struttura.

2.1.1 Assorbimento non lineare

I principali effetti ritenuti responsabili dell'assorbimento non lineare sono l'assorbimento multi-fotone, il tunneling di elettroni dalla banda di valenza a quella di conduzione e la ionizzazione a valanga[25], il cui principio fisico è schematicamente illustrato in Fig. 2.1.

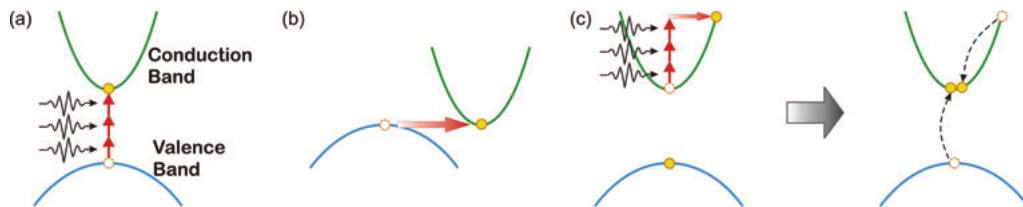


Figura 2.1: *Illustrazione schematica dei processi di assorbimento non lineare: (a) assorbimento multi-fotone (b) ionizzazione per effetto tunnel (c) ionizzazione a valanga. Immagine riprodotta da [26].*

L'assorbimento multi-fotone consiste nell'assorbimento simultaneo di un numero m di fotoni, dove m è sufficientemente grande perché sia $m h \nu > E_g$. Perché possa essere innescato, è necessario che il numero di fotoni presenti sia molto alto, quindi sarà possibile solo in presenza di impulsi con intensità di picco elevata.

Se il campo elettrico è molto intenso la barriera di potenziale Coulombiano si abbassa e diventa molto più probabile che un elettrone passi dalla banda di valenza a quella di

conduzione per effetto tunnel.

Generalmente ad alte intensità assorbimento multifotone e ionizzazione per effetto tunnel sono presenti simultaneamente, si può determinare quale sia dominante valutando il parametro di Keldysh γ definito come

$$\gamma = \omega(2m^*E_g)^{1/2}/e\mathcal{E} \quad (2.1)$$

dove m^* e e sono massa efficace e carica dell'elettrone e \mathcal{E} è l'intensità del campo elettrico oscillante a frequenza ω . Se $\gamma > 1.5$ la ionizzazione per effetto tunnel domina, in caso contrario risulta più rilevante l'assorbimento multi-fotone. Quando $\gamma \sim 1.5$ i due effetti sono presenti allo stesso modo[26].

Nella ionizzazione a valanga un elettrone libero sul fondo della banda di conduzione viene accelerato dal campo elettrico dovuto alla radiazione laser incidente e incrementa così la propria energia cinetica. Quando questa risulta superiore di almeno E_g al minimo della banda di conduzione, può portare un altro elettrone dalla banda di valenza a quella di conduzione cedendogli energia. I due elettroni liberi nella banda di conduzione possono essere ancora accelerati dal campo elettrico presente e promuovere altri elettroni di valenza a elettroni di conduzione, scatenando un processo a valanga. Quando la densità di elettroni diventa critica, il plasma generato comincia ad assorbire energia dal fascio laser causando modifiche permanenti nel materiale. Questo processo è controllato e produce un risultato riproducibile solo se il picco di energia dell'impulso è sufficientemente elevato, quindi ,perché questa condizione si verifichi, è necessario che la durata dell'impulso sia nell'ordine dei femtosecondi. In questo modo la ionizzazione a valanga può avere origine da elettroni generati per assorbimento multi-fotone o effetto tunnel nel fuoco del fascio, cioè esattamente nel punto desiderato. Se, al contrario, gli impulsi hanno durata superiore (picosecondi o più) la ionizzazione a valanga verrà innescata da elettroni liberi a causa di difetti nel materiale, che per la loro natura casuale daranno luogo a effetti imprevedibili rendendo impossibile la scrittura precisa di pattern.

2.1.2 Modifiche indotte nel materiale

Il plasma di elettroni generato nel materiale provoca modifiche nel substrato. I meccanismi fisici che sottostanno a queste modifiche sono tutt'ora oggetto di indagine, in quanto diversi effetti concorrono e non è ancora stato stabilito quali siano più rilevanti e quali trascurabili. Inoltre anche la loro dinamica non è stata ancora del tutto compresa.

Se la fluena del laser, definita come $F = E/A$ dove E è l'energia per impulso e $A = \pi w_0^2$ è la dimensione di macchia nel fuoco, è bassa, il plasma di elettroni generato nel materiale cede energia alla struttura creando modifiche permanenti dell'indice di rifrazione. Gli effetti che si suppone siano responsabili di queste modifiche sono la formazione di centri di colore, la risolidificazione di materiale fuso e il riarrangiamento dei legami nelle matrici vetrose[26]. La fusione del materiale per via dell'energia ceduta dal plasma di elettroni e la sua rapida solidificazione porta ad una variazione della densità locale; è questa che a sua volta genera una variazione dell'indice di rifrazione. Quest'ultimo sembra essere il principale modello per spiegare ciò che avviene nel fused silica.

Con una fluena più elevata possono crearsi delle nano-crepe all'interno del materiale, che saranno orientate perpendicolarmente alla polarizzazione del laser. Questo fenomeno è stato osservato con buoni risultati principalmente nel fused silica, pertanto gli studi citati d'ora in avanti relativi alla produzione di microcanali con tecnica FLICE faranno riferimento a questo materiale. La loro formazione ha origine da plasma che evolve prima in nano-sfere e successivamente in nano-ellissi, come mostrato in Fig. 2.2. Questa evoluzione ha luogo durante l'arrivo successivo di numerosi impulsi per un effetto di memoria che equivale ad un abbassamento progressivo dell'energy gap; non si tratta dunque di un effetto che è possibile osservare con un singolo impulso in un punto del materiale. Supponendo che la radiazione laser sia polarizzata linearmente, le nano-ellissi di plasma risultano perpendicolari alla direzione di polarizzazione del laser. Quando la loro densità raggiunge una soglia critica esse assumono un comportamento quasi-metallico influenzando la propagazione della luce e crescendo ancora fino a fondersi tra loro. Le crepe che si formano per l'unione delle ellissi di plasma, che in origine sono disposti casualmente nel volume irraggiato, risultano alla fine ordinate e spaziate della metà della lunghezza d'onda incidente[27].

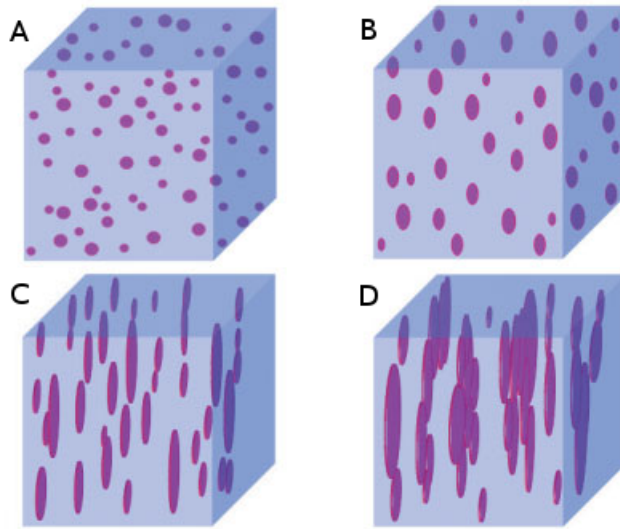


Figura 2.2: *Formazione delle nano-crepe: (a) formazione casuale delle nano-sfere (b,c) le nano-sfere evolvono in nano-dischi (d) i nano-dischi si uniscono a formare delle nano-crepe ordinate. Immagine riprodotta da [27].*

Quando la fluensa diventa ancora più elevata, si osserva la formazione di vuoti e micro-esplosioni che danneggiano il materiale. Questo regime in cui si ottiene ablazione diretta del materiale è indesiderato per la produzione di strutture all'interno del substrato, ma può essere usato per fabbricare canali superficiali.

2.2 Parametri di irraggiamento delle sorgenti laser

Il primo parametro della sorgente che deve essere preso in esame è lunghezza d'onda λ della radiazione emessa, che deve essere tale per cui l'energia $h\nu = c/\lambda$ dei fotoni risulti minore dell'energy gap del materiale, e quindi questi non vengano assorbiti, a meno che non siano presenti in gioco notevoli quantità di energia tali da dare luogo a fenomeni di assorbimento non lineare, che sono quelli sfruttati per la scrittura di strutture e sono stati discussi nella sezione precedente. È possibile se necessario modificare la lunghezza d'onda del fascio laser ad esempio con cristalli che inducano la generazione di armoniche successive alla prima.

È stato dimostrato che gli effetti prodotti sui materiali dagli impulsi laser dipendono fortemente dalla durata degli impulsi τ , dalla loro energia E_p e dalla loro frequenza di ripetizione f_{rep} . Fissate l'energia degli impulsi e la frequenza di ripetizione risulta

determinata la potenza media del laser $P_m = E_p * f_{rep}$.

L'energia degli impulsi dipende dalla sorgente, ma può essere ridotta ponendo davanti all'uscita del laser un assorbitore o una combinazione di lamina a lambda-mezzi e polarizzatore lineare. In questo modo la rotazione della lamina produce una variazione della direzione della polarizzazione del fascio prima che questo raggiunga il polarizzatore, cambiando quindi la sua intensità trasmessa.

Quando l'impulso giunge sul materiale e viene assorbito, si determina un accumulo di energia termica nel punto di assorbimento, che verrà poi dissipata nel materiale in un tempo T_{th} , che nei vetri ha valori intorno al μs . A seconda del rapporto tra la frequenza di ripetizione degli impulsi f_{rep} e l'inverso $f_{th} = 1/T_{th}$ si determinano diversi regimi di scrittura nel materiale.

- Se $f_{rep} \ll f_{th}$, cioè $f_{rep} \approx 1kHz \div 200kHz$, si parla di interazione di singolo impulso, perché il calore fa in tempo a diffondere prima che giunga l'impulso successivo. In questo regime si utilizzano impulsi molto energetici (qualche μJ), pertanto non è necessaria una forte focalizzazione del fascio, ma si impone una velocità di scrittura molto ridotta (decine di $\mu m/s$). In questo caso la regione interessata dalle modifiche corrisponde a quella irraggiata. Questo regime è stato il primo ad essere esplorato grazie alla disponibilità di laser a femtosecondi in Ti:zaffiro con amplificazione degli impulsi con frequenze di ripetizione intorno al kHz.
- Se $f_{rep} \gg f_{th}$, cioè $f_{rep} \approx 4MHz \div 25MHz$, il materiale risente degli effetti di impulsi successivi perché il calore non ha il tempo necessario per diffondere tra un impulso e l'altro. Per ottenere queste frequenze di ripetizione si utilizzano laser in Ti:zaffiro in cui l'amplificazione dell'impulso è ottenuto mediante numerosi passaggi del fascio in cavità attraverso il mezzo attivo, che forniscono impulsi poco energetici (alcune decine di nJ) e si richiede quindi l'uso di un obiettivo che permetta un'alta focalizzazione per avere abbastanza energia nel fuoco da innescare i processi di assorbimento desiderati. A causa del fatto che il calore immagazzinato concorre alle modifiche nel materiale, il volume interessato da esse è maggiore di quello irraggiato. La velocità di scrittura permessa da questo regime è di gran lunga

maggiore rispetto al precedente (decine di cm/s), permettendo di scrivere strutture di dimensioni molto maggiori.

- Se $f_{rep} \approx f_{th}$, cioè $f_{rep} \approx 200kHz \div 4MHz$, si ottiene un regime di scrittura con caratteristiche intermedie rispetto ai precedenti. Vengono usati laser a femtosecondi in itterbio, con impulsi da centinaia di nJ e frequenza di ripetizione accordabile, che permettono di scrivere a velocità accettabili (tra le centinaia di $\mu m/s$ e pochi cm/s) e non richiedono condizioni di focalizzazione troppo spinte, consentendo una maggiore flessibilità nel progetto delle strutture da realizzare.

La dimensione minima delle strutture che è possibile scrivere dipende dalla dimensione di macchia del fascio laser. Supponendo che si avvicini il più possibile ad un fascio gaussiano, il fascio avrà nel punto di fuoco raggio w_0 e distanza di Rayleigh, che è la distanza lungo la direzione di propagazione del fascio a cui la dimensioni di macchia è doppia rispetto al punto di fuoco, z_0 , date da

$$w_0 = \frac{M^2 \lambda}{\pi NA} \quad (2.2)$$

$$z_0 = \frac{M^2 n \lambda}{\pi NA^2} \quad (2.3)$$

dove M è il fattore di qualità del fascio che determina quanto esso si avvicini ad un fascio gaussiano, λ è la lunghezza d'onda della luce laser, NA è l'apertura numerica dell'obiettivo su cui il fascio arriva collimato e n è l'indice di rifrazione del substrato su cui esso incide.

2.3 Fabbricazione di guide d'onda

Una guida d'onda è una regione che presenta un indice di rifrazione maggiore rispetto a quello del substrato in cui si trova, e per questo motivo è in grado di confinare la radiazione al proprio interno per riflessione interna totale. Grazie all'irraggiamento con laser a femtosecondi, quando la fluensa è sufficientemente bassa, come spiegato nella sezione precedente, è possibile ottenere una variazione dell'indice di rifrazione lungo il

tratto irraggiato, producendo in questo modo una guida d'onda all'interno di un substrato vetroso.

Visto che il salto d'indice necessario perché la luce rimanga confinata all'interno di una guida dipende dalla lunghezza d'onda e che il salto che si riesce ad ottenere in diversi materiali, ad esempio nel fuso di silice, non è sufficiente per guidare radiazione con lunghezza d'onda superiore a quella del visibile, è necessario ricorrere a diversi metodi per incrementarlo. Uno di questi, detto approccio multi-scan, consiste nel passare più volte con la luce laser sul tratto dove si desidera fabbricare la guida per aumentare il salto d'indice. Un altro metodo prevede di incrementare la fluensa laser per bruciare la zona irraggiata e far diminuire la densità del materiale. Questo produrrà una zona al di sotto di quella bruciata che avrà densità maggiore, sufficiente per guidare la luce infrarossa.

Un aspetto da considerare è quello della forma della sezione della guida. Se la guida viene irraggiata traslando il campione lungo la direzione di propagazione del fascio laser, la sezione sarà tonda e di dimensione pari alla sezione del fascio nel fuoco, cioè con raggio pari al parametro w_0 del fascio. Tuttavia con questa geometria la lunghezza della guida è limitata dallo spessore del campione e dalla distanza di lavoro dell'obiettivo e permette soltanto guide verticali. Se invece la guida viene fabbricata traslando il campione sul piano perpendicolare al fascio, sarà possibile avere grande libertà nella definizione della geometria delle guide e non ci saranno limiti di lunghezza, se non quelli del sistema di traslazione. La sezione delle guide sarà però fortemente asimmetrica, in quanto la sua larghezza dipenderà da w_0 mentre la sua altezza sarà legata al parametro di Rayleigh z_0 . Questa asimmetria può essere corretta utilizzando un telescopio cilindrico che renda il fascio astigmatico, con l'utilizzo di specchi deformabili o adottando un approccio di tipo multi-scan.

2.4 Fabbricazione di canali

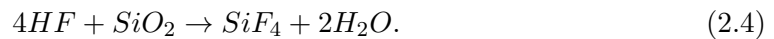
La realizzazione di canali all'interno di vetro con laser a femtosecondi è stata effettuata tramite metodi diversi, quali tecniche di trapanazione mediante ablazione in aria o in liquidi e con l'irraggiamento di vetri fotosensibili e loro successiva cottura e talvolta at-

tacco chimico in acido fluoridrico (HF). Questi procedimenti tuttavia soffrono di alcuni difetti: l'ablazione produce soltanto canali superficiali e con rugosità piuttosto pronunciata a causa dell'elevata energia degli impulsi necessaria, mentre l'irraggiamento di vetri fotosensibili richiede numerosi passaggi e macchinari specifici[28].

La tecnica presentata di seguito si compone di due soli passaggi, irraggiamento laser e attacco chimico, e permette di ottenere canali sepolti con geometrie tridimensionali. La rugosità dei canali ottenuti può in parte compromettere la visualizzazione di particelle di dimensioni nanometriche e disturbare il loro flusso all'interno dei canali e può essere ulteriormente ridotta attraverso un procedimento di annealing, cioè cottura e raffreddamento controllato, se l'applicazione per cui è stato realizzato il dispositivo lo richiede.

Il primo passo consiste nell'irraggiamento del campione in modo da formare, come illustrato nella sezione precedente, nano-crepe orientate ordinatamente lungo la geometria della rete fluidica che si vuole realizzare. È importante che le crepe siano orientate parallelamente alla direzione dei canali, per permettere e facilitare successivamente la diffusione dell'acido con la massima efficienza possibile, si comprende così la necessità di avere la luce laser polarizzata linearmente. L'irraggiamento avviene solitamente focalizzando il laser all'interno del campione e traslando il campione, mantenendo invece fisso il fascio per comodità.

Il secondo passo prevede l'immersione del campione in una soluzione di HF e acqua secondo proporzioni definite e a temperatura stabilita e il più possibile costante. Tipicamente si utilizza HF al 20% in acqua, ad una temperatura di $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Il processo di etching avviene tra acido e silice secondo la reazione



Si può notare che, nel punto dove avviene la reazione, diminuisce la quantità di acido, e quindi l'efficienza di etching, e si formano prodotti di reazioni inutili al processo di corrosione che dovrebbero essere rimossi. Inoltre se si sta scavando una cavità interna abbastanza grande, possono separarsi frammenti di vetro di piccole dimensioni ma non del tutto disciolti che rimangono all'interno dei canali fino a che non sono stati corrosi del

tutto e che rischiano quindi di intralciare il flusso dei liquidi all'interno del canale. Per favorire la rimozione di questi residui di lavorazione e facilitare il passaggio di HF fresco, il contenitore in cui si trova la soluzione può essere messo a bagno in acqua e ultrasuoni.

Come descritto nella sezione precedente, le nano-crepe formate dall'irraggiamento laser si allineano (Fig. 2.3), e se sono orientate lungo la direzione del canale, l'acido può fluire attraverso di esse. Al contrario se sono perpendicolari, il tasso di erosione è notevolmente ridotto e di poco superiore a quello del materiale non irraggiato. È possibile dunque regolare la velocità dell'etching regolando l'orientazione della polarizzazione, anche se questo è piuttosto laborioso e si preferisce di solito, quando è necessario ritardare l'etching in una zona del circuito microfluidico, allungare alcuni tracciati o lasciare zone non irraggiate. È stato anche osservato che, nel caso in cui si utilizzi polarizzazione circolare, si formano crepe disordinate ma molto ravvicinate che consentono una velocità di etching confrontabile con quella ottenuta utilizzando polarizzazione lineare perpendicolare alla direzione del canale (cioè crepe parallele)[28]. Per quanto la velocità di etching con questa polarizzazione sia inferiore e quindi questa sia di solito poco utilizzata, può rivelarsi utile per scrivere strutture con numerosi percorsi obliqui che costringerebbero a cambiare di continuo la polarizzazione del laser durante la scrittura.

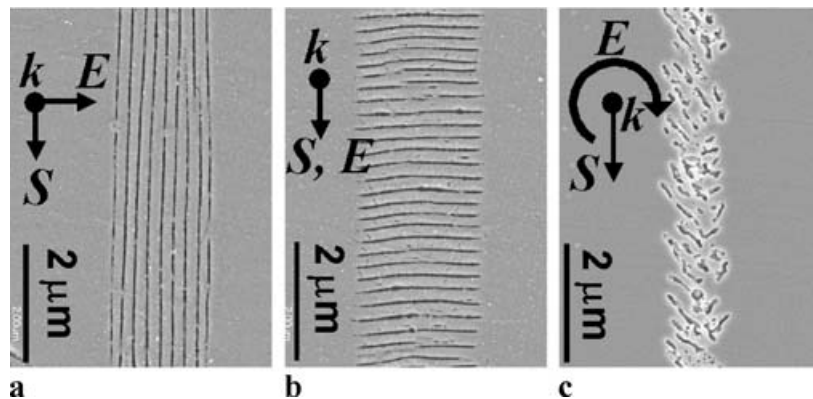


Figura 2.3: Immagini SEM di nano-crepe con diverse polarizzazioni rispetto alla direzione di scrittura del canale S : (a) polarizzazione perpendicolare (b) polarizzazione parallela (c) polarizzazione circolare. Immagine riprodotta da [28].

Sono possibili due geometrie di scrittura:

- il campione viene traslato nel piano perpendicolare al vettore d'onda del fascio laser: le strutture sono scritte su quel piano e la polarizzazione è determinante per

la penetrazione efficace dell'acido, la forma del volume irraggiato risulta allungata a causa della forma dello spot focalizzato in quel punto; questo difetto può essere corretto se necessario compiendo più passaggi, utilizzando lenti cilindriche o aumentando la dispersione spaziale del fascio per avere una forma perfettamente sferica del volume irraggiato[26]

- il campione viene traslato lungo la direzione del vettore d'onda del fascio: indipendentemente dalla polarizzazione le crepe saranno orientate lungo la direzione di scrittura del canale, la forma del canale non dipende da quella dello spot, tuttavia questo permette una minore flessibilità nella scelta delle geometrie dei canali.

Entrambi i regimi di scrittura possono essere utilizzati durante la produzione di un singolo dispositivo.

2.4.1 Controllo della geometria dei canali

Durante la fase di etching l'acido comincia a corrodere prima le parti del canale più vicine all'esterno del chip, perché sono le prime che incontra, quelle in cui l'acido è più fresco e dove la rimozione del materiale è più agevole. Questo fa sì che i canali assumano una forma svasata, più larga verso l'esterno e che si stringe via via verso l'interno, dove l'acido è giunto dopo, come in Fig. 2.4.

Per regolare la massima lunghezza ottenibile e correggere questo difetto si possono innanzitutto ottimizzare i parametri di etching regolando la concentrazione di acido e il tempo di immersione del campione. Se si utilizza una maggiore percentuale di acido si otterrà un minore aspect ratio, cioè il rapporto tra lunghezza e larghezza dei canali, ma sarà possibile scavare canali più lunghi perché si ritarda il termine dell'azione corrosiva. Riducendola invece si otterranno canali con aspect ratio maggiore ma lunghezza inferiore. Per compensare direttamente la forma conica è stata sviluppato un metodo che consiste nell'irraggiare una spirale conica intorno al tracciato del canale, che abbia la punta all'esterno e la base rivolta verso l'interno, che produrrà come risultato sarà un canale con una sezione circolare uniforme, come mostrato in Fig. 2.5. Il passo della spirale deve essere abbastanza corto perché l'acido riesca a continuare a scavare lungo la direzione

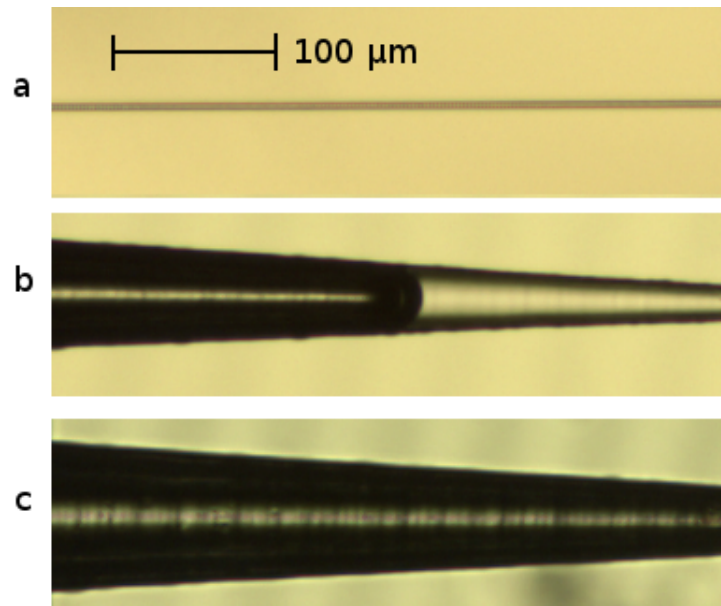


Figura 2.4: Immagini al microscopio ottico di fasi successive di etching: (a) parte irraggiata prima dell'etching (b) dopo 3 ore e 30 minuti di etching (c) dopo 3 ore e 50 minuti

del canale[26]. Un'altra soluzione che sta venendo esplorata consiste nell'utilizzare KOH al posto di HF, che sembra avere una selettività maggiore nei confronti delle strutture irraggiate, permettendo così di avere canali più lunghi o con rapporto d'aspetto maggiore. Per contro la sua azione è molto più lenta, tanto che si può scegliere di scavare con KOH solo una regione del circuito in cui sia necessario avere caratteristiche molto ben definite, e compiere il resto del lavoro utilizzando HF.

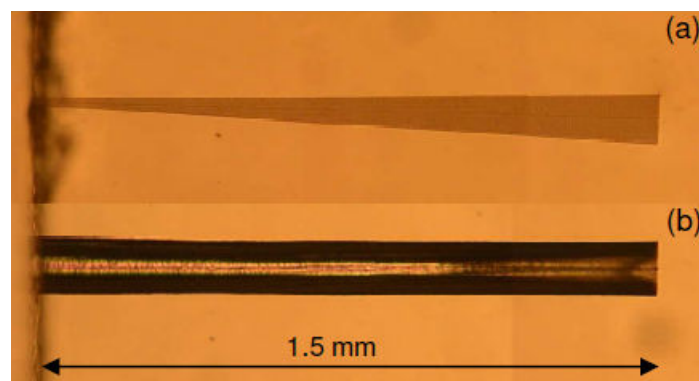


Figura 2.5: Immagini al microscopio ottico della produzione di un canale cilindrico, l'accesso al canale è sull'estremità sinistra: (a) zona conica irraggiata prima dell'etching (b) canale a etching concluso

Grazie alla sua versatilità e alla sua capacità di realizzare tracciati nelle tre dimensioni,

la tecnica FLICE può fare molto più che correggere la forma dei canali. Ad esempio è possibile fabbricare pozzetti di accesso cilindrici per tubi di diametro molto maggiore di quello dei canali, o camere di grandi dimensioni e con profilo variabile, che possono essere usate come camere di reazione o come canali con geometria e dimensione controllata, senza che questo necessiti tempi di attacco chimico elevati, che farebbero allargare troppo anche le altre strutture.

Queste strutture di grandi dimensioni sono ottenute irraggiandone il canale che fa loro da asse e i piani che ne delimitano la superficie laterale. Se il volume è piuttosto grande (pozzetti o camere più larghi di qualche decina di micron) vengono irraggiate più forme concentriche, a partire da quelle esterne per non avere deformazioni sulle superfici esterne a causa del passaggio del fascio in zone interne con indice di rifrazione già modificato (Fig. 2.6).

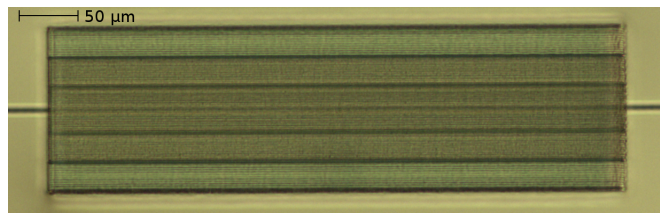


Figura 2.6: *Irraggiamento di una struttura a parallelepipedo: sono visibili il tracciato centrale e i bordi delle tre camere concentriche, larghe rispettivamente 40, 80 e 120 micron*

L'irraggiamento dei piani laterali può avvenire con un tracciato con linee parallele alla direzione del canale, oppure con una spirale a sezione rettangolare o ellittica che progredisca lungo la direzione dell'asse della struttura. Anche in questo caso è necessario regolare la distanza tra le linee o il passo della spirale per garantire che l'erosione della singola linea sia sufficiente a unire il volume scavato con quello della linea successiva. Per lo stesso motivo bisogna dimensionare correttamente le strutture e valutare se e quante forme concentriche sia necessario irraggiare.

Anche queste strutture tenderanno a vedere un'erosione più efficiente nelle zone dove l'acido giunge prima, tuttavia, a causa dell'aspect ratio decisamente inferiore rispetto a quello dei canali, questo effetto sarà molto meno visibile e spesso trascurabile.

Infine è possibile irraggiare con linee parallele piani verticali lungo quelli che si desidera che siano i bordi del chip, in modo che questo venga sagomato con una precisione

molto elevata, che sarebbe impossibile da ottenere con una lavorazione di tipo meccanico al termine della fase di scrittura laser. In questo modo si riesce ad esempio ad ottenere che il taglio sia esattamente all'inizio dei pozzetti di accesso; se così non fosse si rischierebbe di asportare una parte del pozzetto o di lasciare pareti di vetro non irraggiato di spessore non perfettamente controllato che, oltre ad allungare i tempi di attacco chimico, ritarderebbero diversamente l'inizio dell'erosione delle diverse strutture portando a forti asimmetrie. Un altro vantaggio di questo metodo è l'assenza di polveri e detriti che potrebbero entrare nei canali e nelle altre strutture in seguito ad un taglio di tipo meccanico o alla lappatura delle superfici.

Capitolo 3

Il setup sperimentale

I dispositivi prodotti durante di questo lavoro di tesi sono stati fabbricati e connessi presso i laboratori del dipartimento di Fisica del Politecnico di Milano, e caratterizzati nei laboratori di Soft Matter del dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica del Politecnico di Milano.

3.1 Il setup di fabbricazione

Il setup sperimentale di fabbricazione permette di produrre un dispositivo in due passaggi, irraggiamento e attacco chimico, più un eventuale trattamento di annealing termico. L'apparato utilizzato per l'irraggiamento, mostrato in Fig. 3.1, si compone di un laser a femtosecondi a itterbio, un attenuatore composto da lamina a lambda mezzi rotante e polarizzatore, due percorsi per il fascio laser, in uno dei quali viene generata la seconda armonica, uno shutter meccanico, un obiettivo per focalizzare il fascio sul campione e un sistema di slitte a tre assi per la movimentazione del campione. Successivamente il campione è immerso in una soluzione acquosa di HF al 20% all'interno di una cappa aspiratrice perché le strutture vengano scavate, e eventualmente in seguito trattato termicamente in forno.

Sorgente laser

Il laser utilizzato è una sorgente commerciale modello FEMTOREGEN, prodotto da HighQ, con una potenza media massima superiore ai 6 W in condizioni ottimali. Il mezzo attivo è composto da ioni di itterbio in un cristallo di KYW, emette luce polarizzata linearmente alla lunghezza d'onda di 1040 nm e lavora in regime di mode-locking, con impulsi di circa 400 fs. La sua potenza di uscita è regolabile, ed è in grado di operare a diverse frequenze di ripetizione: 350, 500 e 960 kHz, mantenendo costante la potenza media e variando quindi l'energia per impulso a seconda della frequenza di ripetizione impostata. Al suo interno è disponibile anche un pulse picker elettro-ottico che, scelto un numero n intero tra 1 e 255, permette di lasciar uscire un solo impulso ogni n , lasciando in questo caso invariata l'energia per impulso ma riducendo la potenza media al crescere di n . L'energia per impulso sarà quindi pari a

$$E_p = \frac{P_m n}{f_{rep}} \quad (3.1)$$

dove P_m è la potenza media misurata in uscita dal laser, f_{rep} è la frequenza di ripetizione scelta e n è il numero impostato sul pulse picker.

L'attenuatore manuale posto dopo l'uscita del laser è costituito da una lamina a lambda mezza, che permette di ruotare la polarizzazione del laser, e da un polarizzatore che lascia passare soltanto la componente del fascio polarizzata secondo la direzione del suo asse, trasmettendo quindi potenza variabile a seconda della polarizzazione ottenuta tramite la rotazione della lamina. L'attenuazione può essere regolata a occhio osservando la macchia su una cartina ottica sensibile all'infrarosso durante le operazioni preliminari di allineamento, o utilizzando un power-meter posizionato dopo il polarizzatore per la fase di scrittura, quando è necessaria maggiore precisione.

Perchè il laser funzioni in maniera ottimale, l'ambiente in cui si trova è mantenuto ad una temperatura intorno ai 21 °C e l'umidità è controllata.

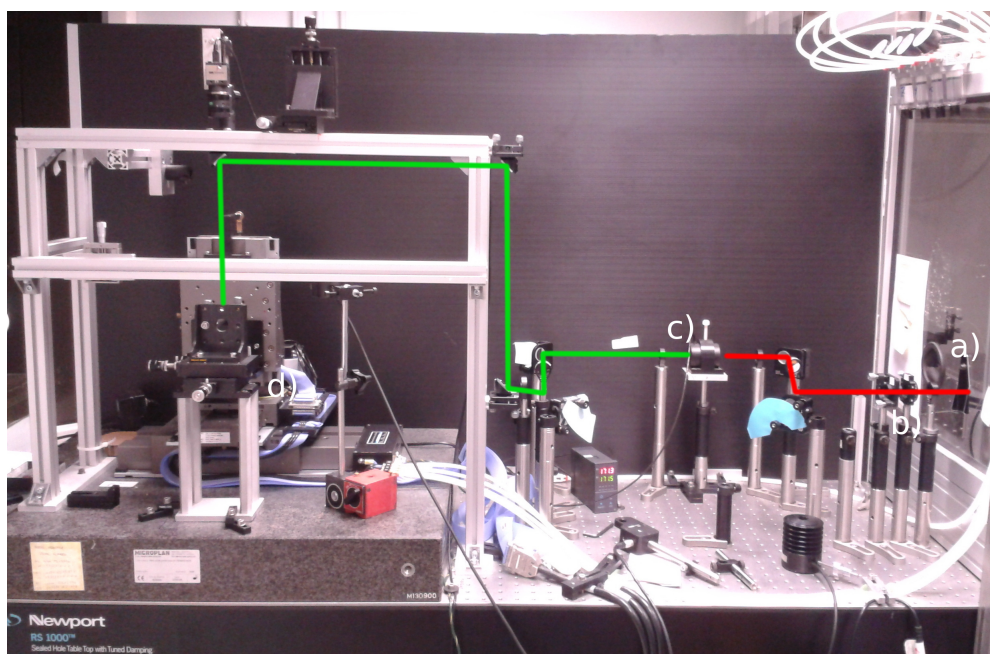


Figura 3.1: Foto del setup di scrittura a femtosecondi: (a) punto da cui proviene la luce laser, (b) attenuatore, (c) cristallo per la generazione di seconda armonica, (d) slitte che traslano il campione. In rosso è segnato il percorso del fascio infrarosso a 1040 nm fino al suo ingresso nel cristallo di seconda armonica, e in verde quello del fascio a 520 nm.

Percorso ottico e generazione di seconda armonica

Dopo il passaggio attraverso l'attenuatore, il fascio compie un tratto di propagazione libera parallela al tavolo su cui risiede il setup, incontra un periscopio che lo alza rispetto al tavolo e viene riflesso in verticale verso il basso da uno specchio, finendo così per incidere sull'obiettivo di focalizzazione e quindi sul campione.

Durante il tratto di propagazione libera e prima del periscopio, il percorso del fascio può essere modificato tramite l'inserimento di due specchi per incontrare un cristallo di LBO (triborato di litio LiB_3O_5), all'interno del quale viene generata seconda armonica. Prima del cristallo si trova una lente che focalizza il fascio al suo interno per rendere più efficiente la conversione, visto che il fenomeno non lineare di generazione è proporzionale all'intensità del fascio incidente, e dopo di esso è posta un'altra lente che ricollima il fascio in uscita dal cristallo. Affinché il processo sia efficiente, la generazione di seconda armonica avviene in condizione di *phase matching*, che significa che i fotoni alle due lunghezze d'onda vedono lo stesso indice di rifrazione. Nel caso dell'LBO la condizione di *phase matching* è di tipo II, in cui i fotoni in ingresso, vista la polarizzazione del campo

rispetto agli assi del cristallo, vedono il suo indice ordinario, mentre quelli di seconda armonica sono polarizzati ortogonalmente ai primi e vedono il suo indice straordinario. Perché i due indici coincidano per le lunghezze d'onda di 1040 e 520 nm è necessario controllare la temperatura del cristallo, che in questo caso è fissata a 171.5 °C. L'efficienza di conversione di seconda armonica è legata anche dalla durata degli impulsi, poiché dipende dal loro picco di intensità che è inversamente proporzionale alla loro durata se l'energia è fissata. Pertanto monitorare l'efficienza di conversione permette anche di tenere sotto controllo la durata degli impulsi del fascio incidente.

Focalizzazione del fascio

La focalizzazione del fascio sul campione riveste importanza fondamentale, perché determina l'intensità del campo elettrico nel fuoco e quindi l'efficienza degli effetti non lineari responsabili della generazione di plasma che avvengono all'interno del materiale, e la dimensione della zona interessata da questi effetti.

Per focalizzare il fascio sul campione viene utilizzato un obiettivo da microscopio con magnificazione 50x e apertura numerica 0.6. È montato su un traslatore manuale con due assi di traslazione e due di regolazione dell'inclinazione, la perpendicolarità del fascio sull'obiettivo, importante per la scrittura di componenti ottiche e fluidiche nel substrato, è controllata verificando che la macchia prodotta dalla retroriflessione del fascio su un vetrino appoggiato sopra l'obiettivo si sovrapponga al punto da cui proviene il fascio.

Traslazione del campione

Il campione è posizionato su un blocco di traslazione a tre assi Aerotech FiberGlide3D, visibile in Fig 3.1(d), in grado di mantenere costante la sua velocità su un qualsiasi percorso tridimensionale e con una risoluzione sulla posizione di 100 nm. Le slitte sono movimentate da tre motori brushless e mantenute sollevate grazie ad un sistema ad aria compressa, che riduce di molto gli attriti, raggiungendo una velocità massima di 150 mm/s.

Il portacampione posizionato sulle slitte permette la regolazione manuale della sua inclinazione mediante rotazione intorno ai due assi paralleli al piano del tavolo, la mac-

chia riflessa sulla superficie del campione può essere osservata a computer con una CCD posta al di sopra dell'obiettivo di focalizzazione, per controllare che il campione sia perpendicolare rispetto al fascio.

Le slitte sono comandate da pc tramite il software Automation 3200, che esegue programmi nel linguaggio G-Code, utilizzato comunemente per le macchine utensili a controllo numerico; il software controlla anche uno shutter meccanico posto lungo il cammino del fascio, che consente di bloccare il fascio laser in maniera automatica durante la fabbricazione, così da poter traslare il campione senza scrivere su di esso. Tutto il sistema di traslazione poggia su un blocco di granito, che gli garantisce maggiore stabilità.

Attacco chimico in soluzione acquosa di acido fluoridrico

Terminato l'irraggiamento e quindi la fase di scrittura delle modifiche all'interno del campione, l'attacco chimico avviene sotto cappa aspiratrice per via dei rischi dovuti all'utilizzo di HF. Il laboratorio dispone di una cappa Gloria Artec per l'aspirazione dei fumi tossici, con rivestimenti interni ignifughi e resistenti alla corrosione da parte degli acidi, dedicata all'utilizzo di HF, al cui interno vengono maneggiate le soluzioni di HF. All'interno della cappa è posto un bagno a ultrasuoni Branson 3510 a temperatura regolabile, a cui è stato aggiunto un circuito di raffreddamento costruito appositamente, e in cui viene inserito il becher contenente la soluzione. Il controllo della temperatura all'interno del bagno a ultrasuoni è di fondamentale importanza per la buona riuscita del procedimento di attacco chimico, perché influenza di molto la velocità e quindi l'efficienza di corrosione dell'acido. Gli ultrasuoni sono utilizzati per favorire la fuoriuscita del materiale da rimuovere durante la formazione dei canali e il ricircolo di acido.

Sempre sotto cappa viene effettuata la pulizia dei campioni una volta che sono stati estratti dall'acido, attraverso passaggi in acqua deionizzata e alcool isopropilico in un becher posto all'interno del bagno a ultrasuoni, per avere la certezza che ogni traccia di acido sia stata rimossa e quindi il processo di corrosione si sia interrotto, oltre che per garantire la sicurezza di chi maneggerà il campione.

L'intera procedura di attacco chimico del campione può essere divisa in più passaggi per tenere sotto controllo il procedere dell'acido all'interno del dispositivo. Ogni volta

il campione viene esaminato al microscopio ottico per monitorare l'avanzamento della formazione dei canali e quindi per stabilire il tempo di permanenza in acido ancora necessario.

Misure al microscopio ottico

Il microscopio ottico utilizzato per l'ispezione dei campioni è il modello Eclipse ME600 prodotto da Nikon e permette, tramite un software collegato al computer, di ottenere misure accurate sulle dimensioni delle strutture scritte sul campione e dei tratti scavati dall'acido; è utilizzato dunque sia durante i successivi passaggi in acido del campione, sia una volta terminati la scrittura e l'attacco chimico del campione. Può lavorare sia in riflessione, per apprezzare i dettagli superficiali o nel caso in cui un campione non sia trasparente, sia in trasmissione, per osservare le strutture interne al campione, e monta quattro obiettivi a diversi ingrandimenti, 4x con apertura numerica 0.13, 10x con NA 0.3, 20x con NA 0.5, e 40x con NA 0.75, che possono essere selezionati ruotando il loro supporto posto sopra il piatto portacampione.

L'immagine può essere osservata tramite gli oculari o dallo schermo di un computer, grazie ad una telecamera collegata al microscopio. La risoluzione dell'immagine è limitata innanzitutto dal limite di diffrazione di Abbe

$$d \approx \frac{\lambda}{2NA} \quad (3.2)$$

e può esserlo ulteriormente dalla risoluzione in pixel della camera e dalla magnificazione utilizzata, in quanto riducendo l'ingrandimento ogni pixel riceve luce da una zona di dimensioni maggiori, riducendo la risoluzione. Pertanto le misure effettuate, contando che per inquadrare una struttura per intero è necessario generalmente utilizzare l'obiettivo 4x o al massimo 10x, soffriranno di un'incertezza data dal limite della telecamera piuttosto che da quello imposto da Rayleigh.

Trattamento termico

Il trattamento termico del campione, in grado di ridurre la rugosità superficiale dei canali, viene realizzato utilizzando un forno Nabetherm che consente di raggiungere temperature fino ai 2000 °C. Il forno può eseguire programmi impostati dall'operatore, che sceglie due tra i tre parametri regolabili per ogni segmento del programma: temperatura di arrivo, pendenza della rampa di riscaldamento (o di raffreddamento) e durata temporale; ogni programma risulta composto da un numero arbitrario di questi segmenti. Naturalmente la pendenza massima raggiungibile dipende in fase di salita dalla potenza del forno e in fase di discesa dalla velocità con cui questo scambia calore con l'esterno. Per rendere più rapido il raffreddamento è possibile aprire una valvola che aumenti lo scambio di gas tra la camera interna del forno e l'ambiente esterno.

3.2 Il setup di connettorizzazione

Per poter inserire liquidi nella rete di microcanali fabbricati e per controllarne i flussi, è necessario connettere il dispositivo. Questo viene effettuato inserendo tubi in PEEK (polieterchetone) all'interno di pozzetti predisposti sulle sue facce laterali, e fissandoli con della colla fotopolimerizzabile. Il PEEK è stato scelto per la sua resistenza meccanica e la sua flessibilità, ma anche per la sua alta biocompatibilità e la sua ottima resistenza ai solventi utilizzati per la pulizia dei dispositivi. I tubi utilizzati hanno un diametro esterno di 350 μm e un diametro interno di 100 o 150 μm . Spesso il dispositivo viene incollato su un vetrino sottile, di 170 μm di spessore, per semplificare la sua gestione e che funge da supporto per la goccia di colla che viene appoggiata ai tubi. Per riuscire a centrare i tubi nei pozzetti, data la loro dimensione molto ridotta, si utilizzano dei traslatori micrometrici manuali a tre assi Melles-Griot, su cui sono montati i tubi. Il campione invece è posto su un supporto avvitato ad un traslatore a due assi, per ottimizzare l'inclinazione tra tubo e chip e facilitarne quindi l'inserimento. L'operazione è svolta osservando tubi e dispositivo tramite un microscopio ottico MZ 12.5, Leica Microsystems, che opera in riflessione. Per migliorare la visibilità dei tubi una volta che sono stati inseriti nel dispositivo e controllare la loro posizione all'interno dei pozzetti, può essere aggiunta una fonte luminosa esterna

che permetta al microscopio di raccogliere anche la luce diffusa dal campione, oltre a quella riflessa.

La colla utilizzata per sigillare le intercapedini tra tubi e pareti dei pozzetti e per collegare saldamente i tubi al dispositivo in modo che reggano la pressione dei fluidi al loro interno, è colla di qualità ottica prodotta da Norland composta da un fotopolimero e rimane liquida fino a che non viene curata con luce ultravioletta. Per l'illuminazione si utilizza un LED UV modello LC-L2 prodotto da Hamamatsu. La precisione durante l'operazione di deposizione delle gocce di colla è molto importante, perché non si corra il rischio di coprire una parte del dispositivo che contiene elementi da osservare successivamente al microscopio, dal momento che una goccia solidificata introduce significative distorsioni nell'immagine. È anche fondamentale illuminare tempestivamente la colla, per solidificarla prima che possa infilarsi per capillarità all'interno dei canali otturandoli. Tuttavia l'illuminazione non deve essere effettuata troppo presto, perché la colla abbia il tempo di riempire i vuoti tra il tubo e le pareti dei pozzetti, per evitare che ci siano perdite di liquido e per resistere alle pressioni imposte.

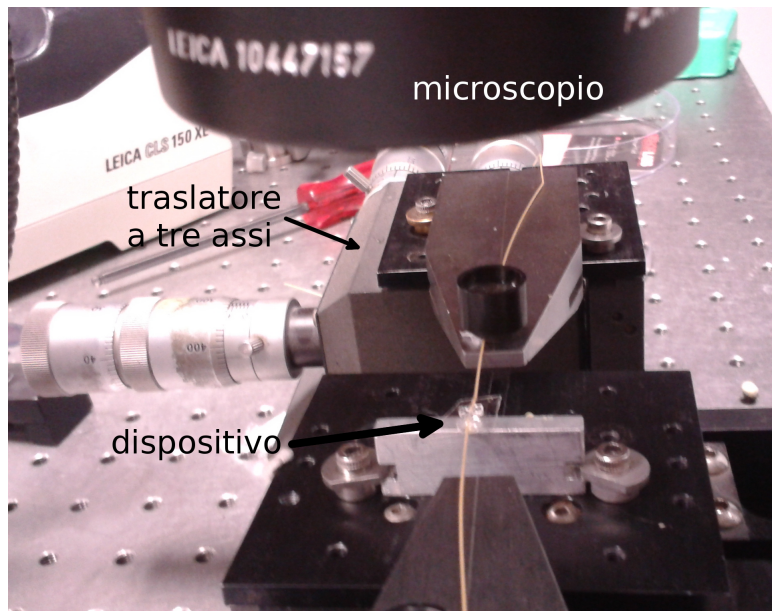


Figura 3.2: Foto del setup di connettorizzazione: il dispositivo è incollato su un vetrino e posto su un traslatore a due assi, il tubo è tenuto su un altro traslatore a tre assi, l'operazione viene effettuata osservando tramite microscopio.

3.3 Il setup di caratterizzazione

Una volta fabbricati e testati per quanto riguarda la tenuta fluidica, i dispositivi sono stati caratterizzati presso i laboratori di Soft Matter del dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica del Politecnico di Milano. I chip sono composti da più canali affiancati, in cui vengono fatti fluire la soluzione contenente il campione in esame e i liquidi a diverse temperature necessari per la generazione del gradiente termico che induce termoforesi.

Microscopio a fluorescenza invertito

Il microscopio in dotazione al laboratorio in cui sono effettuate le caratterizzazioni dei dispositivi presentati in questo lavoro di tesi è un microscopio invertito Olympus IX70 (Fig. 3.3). Invertito significa che il supporto rotante per gli obiettivi è posto al di sotto del piatto mobile che sostiene il campione, mentre l'illuminatore e il condensatore si trovano al di sopra del piatto. Questo permette un accesso più agevole per l'operatore a ciò che è posto sopra al piatto del microscopio, permettendo agli obiettivi di avvicinarsi il più possibile al campione senza schiacciarlo contro il piatto. L'obiettivo utilizzato per queste misure ha magnificazione 50x, che può essere ulteriormente aumentata di un fattore 1.5 tramite un controllo del microscopio.

Questo microscopio è predisposto per eseguire misure in fluorescenza, pertanto al di sotto degli obiettivi ospita un blocco di filtri intercambiabili con un sistema ottico che permette di illuminare con una lunghezza d'onda il campione e filtrarne un'altra prima di raggiungere gli oculari o la telecamera. Le coppie di filtri per la luce emessa e raccolta sono stabilite e abbinate secondo i parametri dei più comuni fluorofori utilizzati, cioè le loro lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione.

Il piatto del microscopio è comandato da un motore che lo trasla sui tre assi ed è controllabile con un joystick. Per l'illuminazione sono presenti una lampada da microscopio comune e una lampada a mercurio ad ampio spettro per le misure in fluorescenza.

Le immagini sono trasmesse al computer tramite una telecamera Prosilica GX, prodotta da Allied Vision Technologies, e acquisite con il software commerciale della telecamera o attraverso un programma scritto ad hoc che permette di impostare esposizione,



Figura 3.3: Foto del microscopio a fluorescenza invertito utilizzato per la caratterizzazione del dispositivo: sul piatto è montata una piastra appositamente costruita che sostiene il campione e scambia calore tra le celle Peltier e il microscopio.

numero di frame per secondo, area acquisita e numero di frame da acquisire e può essere utilizzato anche attraverso Labview, per automatizzare la procedura di acquisizione dati.

Sistemi di pompaggio

Per il pompaggio di grandi volumi di liquido (diversi ml) a velocità controllata, necessario per mantenere costante la temperatura nei canali in cui viene fatta passare acqua alla temperatura desiderata, si utilizza una pompa a siringa Pump 33, Harvard Apparatus (Fig. 3.4), che supporta due siringhe, anche di diverse dimensioni, per ciascuna delle quali può essere impostato il volume pompato per unità di tempo. Il motore può azionare anche una sola delle due siringhe, e si può scegliere se spingere o tirare lo stantuffo. Il punto

debole di queste pompe sono le siringhe utilizzate: infatti se la resistenza fluidica del circuito è troppo elevata, queste tendono a deformarsi piuttosto che spingere il liquido che contengono, risultando in una riduzione del volume pompato per unità di tempo e talvolta nella loro rottura. Per ovviare parzialmente a questo inconveniente si possono tenere molto corti i tubi che entrano nel dispositivo microfluidico e collegarli a tubi di diametro maggiore per raggiungere le pompe, riducendo così la resistenza fluidica complessiva del circuito.

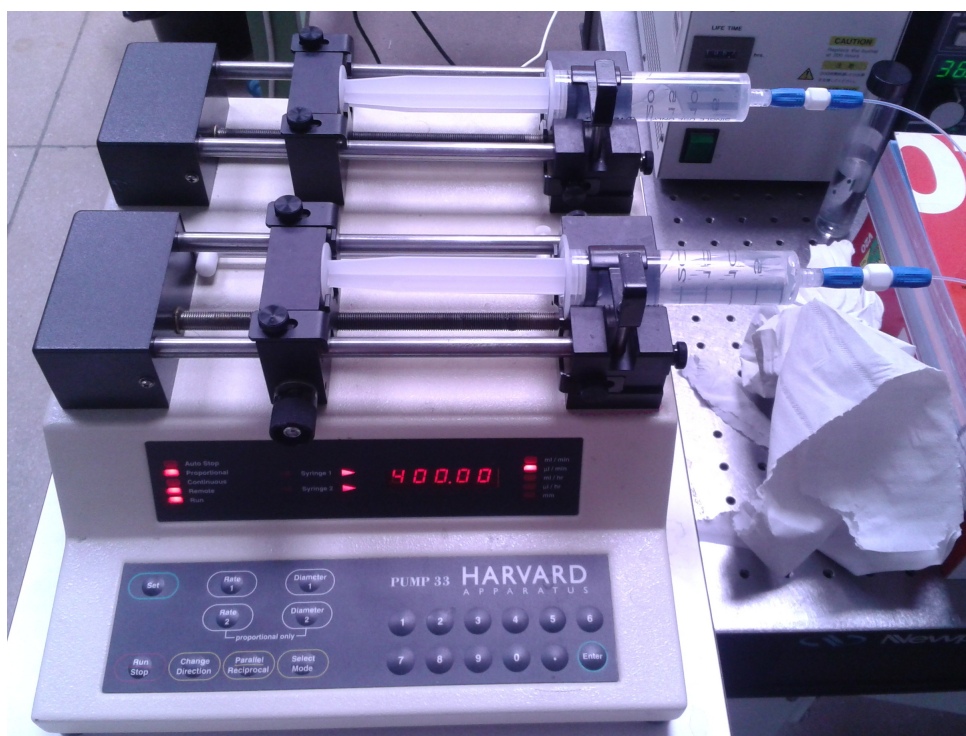


Figura 3.4: Foto della pompa a siringa Harvard Apparatus: nella foto vengono utilizzati entrambi i canali di pompaggio. I tubi di uscita dalle siringhe sono di diametro maggiore di quelli che entrano nei dispositivi utilizzati, per minimizzare la resistenza fluidica di tutto il circuito.

Per un controllo dei flussi più preciso, a scapito della potenza e del volume di liquido a disposizione, viene utilizzata una pompa a pressione Fluigent MFCS-FLEX, con quattro canali indipendenti e pressioni fino a 1 bar, il cui schema di funzionamento è illustrato in Fig. 3.5. Il circuito dell'aria a cui è collegata la pompa a pressione è alimentato da un compressore dedicato. Questo tipo di pompa impone una pressione costante all'interno di un serbatoio in cui è contenuto il liquido. Il tubo di uscita pesca liquido dal fondo del serbatoio, questo liquido sarà spinto nel tubo a causa della pressione imposta dalla

pompa nel serbatoio più quella data dal peso della colonna di liquido, che sarà però generalmente trascurabile, a meno di non cercare di ottenere condizioni di equilibrio o flussi particolarmente controllati. Anche la posizione e l'altezza del tubo di uscita possono avere un effetto sulla velocità del liquido che si stabilirà nel circuito. Un esempio di condizione in cui questi effetti risultano rilevanti è quella in cui si impone la stessa pressione ai capi di un canale nel tentativo di annullare la velocità al suo interno.

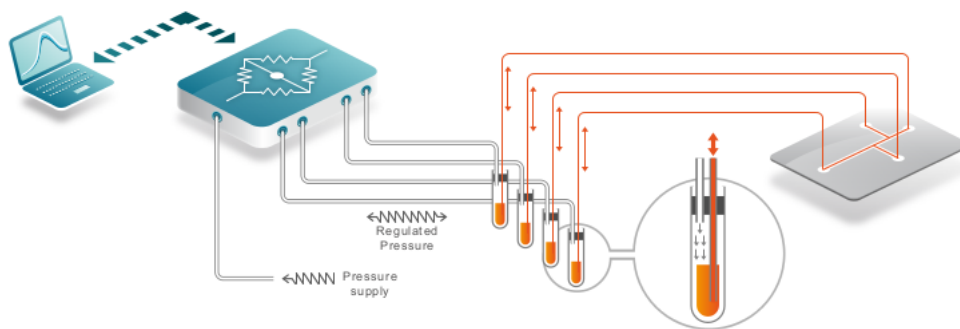


Figura 3.5: *Schema del funzionamento delle pompe a pressione Fluigent MFCS -FLEX. L'apparato regola finemente la pressione fornita da una sorgente esterna, e la impone all'interno dei serbatoi contenenti la soluzione da inserire nei dispositivi e in cui sono inseriti i tubi, nei quali essa scorre. Immagine riprodotta dal documento che ne riporta le specifiche.*

Entrambe le pompe possono essere controllate da pc con un programma Labview.

Controllo e imposizione della temperatura

La temperatura è fissata tramite due celle Peltier che si occupano di scambiare calore nella direzione desiderata tra il piatto del microscopio, che funge da pozzo di calore, e gli oggetti di cui si vuole fissare la temperatura, cioè hanno l'effetto di scaldarli o raffreddarli. La corrente che alimenta le celle Peltier è determinata da due controllori PID LFI-3751 Wavelength Technology, che utilizzano ciascuno due termistori, uno per retroazionare il controllo e uno di supporto. I controllori vengono tarati in relazione ai termistori che vengono utilizzati: la procedura di taratura prevede di immergere i termistori in un bagno termico a diverse temperature note per acquisire alcuni punti sperimentali che saranno usati dai regolatori per elaborare la loro curva di funzionamento. Inoltre andranno scelti i coefficienti P, I e D, cioè i parametri responsabili della risposta proporzionale, integrale e

derivativa del sistema di controllo, più adatti per avere una retroazione stabile e sufficientemente rapida a seconda dei Peltier in uso e del sistema da controllare. Per migliorare il contatto termico tra le celle Peltier, i termistori e tutti gli oggetti che devono scambiare calore fra loro, si utilizza una pasta termoconduttiva, che ha la funzione di riempire i vuoti tra le superfici a contatto, dove altrimenti rimarrebbe intrappolata aria, che ha una conducibilità termica talmente bassa (due ordini di grandezza in meno rispetto al vetro e diversi ordini rispetto ai metalli) da degradare le prestazioni del sistema.

Anche i controllori PID possono essere gestiti attraverso programmi Labview: questo fatto ha permesso che numerose misure, che coinvolgono l'acquisizione di dati tramite videocamera, l'uso di pompe e dei controllori PID, siano state effettuate in maniera automatizzata attraverso programmi Labview scritti appositamente, rendendo più rapido il lavoro di laboratorio.

Analisi delle immagini

Le misure di caratterizzazione del dispositivo prevedono di acquisire un gran numero di immagini e filmati, ad esempio per valutare l'intensità di fluorescenza di una soluzione utilizzata per misurare la temperatura nei canali, o per ricavare la concentrazione delle particelle che subiscono termoforesi. La loro analisi è stata effettuata in un primo momento mediante il software di pubblico dominio ImageJ. Questo programma consente di effettuare operazioni matematiche di vario genere sulle immagini e sui fotogrammi di un filmato e di automatizzare molte operazioni tramite macro, permettendo di utilizzare tecniche avanzate di analisi con grande semplicità, a patto di disporre della potenza di calcolo necessaria.

In seguito, per processare in sequenza un grande numero di filmati, sono stati scritti dei programmi ad hoc utilizzando Labview.

Capitolo 4

Realizzazione del dispositivo fluidico

I dispositivi realizzati durante questo lavoro di tesi sono stati progettati sulla base di un preciso vincolo di progetto: disporre di un canale a sezione quadrata di dimensioni ridotte (nell'ordine delle decine di μm) in cui possa essere indotto un gradiente di temperatura tra le due facce laterali, per effettuare esperimenti di termoforesi su dimensioni inferiori ai $100 \mu\text{m}$ e con gradienti termici di alcuni gradi. La sezione quadrata del canale é fondamentale per due ragioni: permette di osservare dall'alto l'interno del canale senza avere distorsioni nell'immagine introdotte da eventuali superfici curve e consente di avere un gradiente omogeneo nel canale lungo l'asse verticale. Questo perché il fused silica in cui è fabbricato il dispositivo ha una conducibilità termica diversa da quella dell'acqua che riempie i canali, quindi la caduta di temperatura nella zona interna del canale dipenderà dalla relazione tra lo spessore delle pareti che lo separano dalle sorgenti di calore e la sua larghezza. Più precisamente, utilizzando il formalismo dei circuiti termici equivalenti, l'analogo della legge di Ohm per la caduta di temperatura su una serie di resistenze termiche è

$$\Delta T = Q \sum_i R_i \quad (4.1)$$

dove ΔT è la differenza di temperatura ai capi del circuito, Q è il flusso di calore attraverso la serie di resistenze e R_i è la resistenza termica del singolo tratto di materiale, calcolata

come

$$R_i = \frac{l_i \rho_i}{A} \quad (4.2)$$

in cui l_i è la lunghezza del tratto di materiale, ρ_i la sua resistività termica e A la sua sezione. Nel caso di un canale riempito di acqua con due pareti di vetro (fused silica), che possono essere considerate come un'unica resistenza visto che sono dello stesso materiale, la pendenza del gradiente termico lungo la direzione di propagazione del calore sarà

$$\frac{dT}{dx} = \frac{\Delta T \rho_w}{l_c \rho_w + (l - l_c) \rho_g} \quad (4.3)$$

dove l è la lunghezza totale su cui insiste il gradiente termico, l_c la larghezza del canale e ρ_w e ρ_g le resistività di acqua e vetro, che saranno i reciproci delle rispettive conducibilità termiche,

Quindi se lo spessore del canale l_c variasse lungo la sua altezza il gradiente di temperatura non risulterebbe omogeneo in quella direzione. Si può notare come, se la resistività termica di un materiale fosse molto superiore a quella dell'altro, con spessori confrontabili, quel materiale vedrebbe la quasi totalità della caduta di temperatura ai suoi capi, a scapito dell'altro. Questo è esattamente il problema riscontrato da Vigolo *et al.*[21] nel dispositivo in PDMS da loro presentato dove, a fronte di qualche decina di gradi di differenza di temperatura dei serbatoi, il canale vedeva ai suoi lati meno di un grado di differenza. Con un dispositivo in vetro questo problema diventa trascurabile, perché la conducibilità termica di vetro e acqua sono confrontabili, rispettivamente pari a 1 e 0.6 $\text{Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$.

4.1 Progetto del dispositivo

Il primo dispositivo progettato per soddisfare questi requisiti è costituito da tre canali principali paralleli tra loro. Quello centrale è pensato per contenere il campione da studiare, mentre i due laterali servono per far passare acqua a due temperature differenti in modo da imporre il gradiente termico desiderato su quello centrale. I due canali laterali dovranno essere più alti di quello centrale e avere le pareti piatte, almeno per quanto riguarda le facce interne piatte, perché il gradiente sia sufficientemente uniforme

lungo l'asse verticale e il campione nel canale centrale non risenta di effetti di bordo. Per questo motivo tutti e tre i canali avranno nel loro tratto centrale delle camere a sezione rettangolare, che saranno collegate ai pozzetti di accesso da tratti di canale con sezione circolare, per semplicità di realizzazione. I pozzetti per l'inserimento dei tubi da collegare alla rete fluidica esterna dovranno invece avere sezione circolare, ma con diametro decisamente superiore, visto che al loro interno verranno inseriti dei tubi in PEEK con diametro esterno di $360\ \mu\text{m}$.

Per essere sicuri che i tempi di erosione in acido (etching) siano uguali per i tre canali è stato imposto il vincolo che la lunghezza totale dei tre canali, cioè la somma dei tratti a sezione rettangolare e di quelli a sezione circolare, sia uguale. Per rispettare questo vincolo, visto che la distanza tra i canali è troppo ridotta per permettere di avere tre pozzetti per lato con gli assi paralleli ai canali, i pozzetti di accesso per i due canali laterali sono stati posizionati sui lati del dispositivo, come si può osservare nel progetto CAD mostrato in Fig. 4.1. Questo pone un vincolo sia sulla lunghezza sia sulla larghezza del chip a causa della massima lunghezza di canale realizzabile (pochi mm), come discusso nella sezione 2.4.

La larghezza della scatola del canale centrale è stata fissata a $40\ \mu\text{m}$ mentre quella dei canali laterali a $120\ \mu\text{m}$, e tutte e tre saranno lunghe $500\ \mu\text{m}$, mentre la lunghezza complessiva di ciascun canale compresi i pozzetti di accesso sarà di $2.5\ \text{mm}$. Il limite sulle lunghezze delle scatole e dei canali è imposto dalla natura del processo di fabbricazione: per evitare che, quando l'acido arriva a scavare la parte centrale del canale, gli imbocchi risultino troppo larghi e le scatole siano troppo svasate, non è possibile realizzare canali e scatole più lunghi di qualche mm. Le tecniche di compensazione della forma, illustrate nella sezione 2.4, che prevedono un particolare irraggiamento, possono aiutare se necessario, senza però riuscire ad superare di molto questi limiti. Le scatole distano tra loro dai 40 ai $60\ \mu\text{m}$, a seconda del dispositivo.

Per via di questi limiti sia sulla larghezza sia sulla lunghezza del chip, le sue dimensioni risultano molto ridotte e la sua gestione da parte di chi deve connettersi e utilizzarlo risulterebbe particolarmente difficile: per questo motivo è stato fabbricato in modo da avere delle specie di piedini sui suoi quattro vertici laterali perché possa essere maneggiato

e successivamente incollato e connettorizzato più agevolmente (Fig. 4.1). L'irraggiamento dei piani dei muri è fondamentale in questo caso, non solo per la precisione del taglio all'imbocco dei pozzetti, ma anche perché la forma particolare del chip non sarebbe in alcun modo ottenibile tagliando le pareti con i tradizionali strumenti meccanici in dotazione al laboratorio.

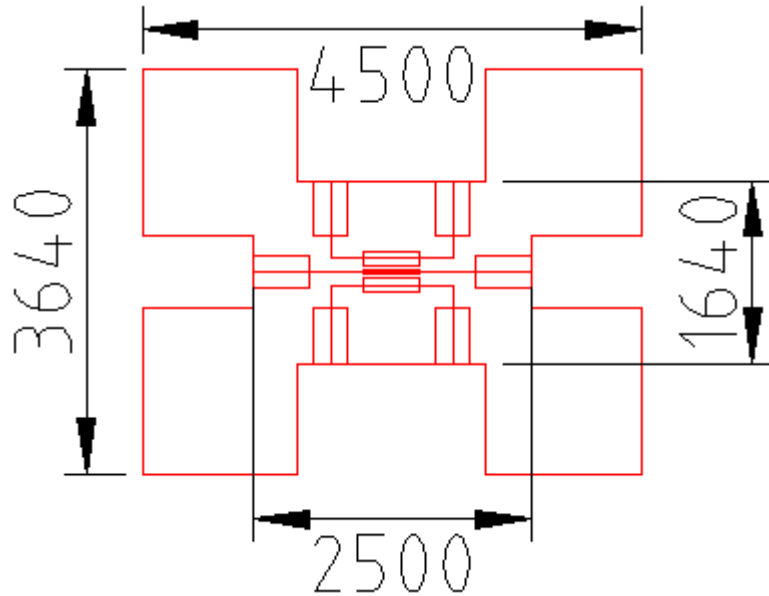


Figura 4.1: *Progetto CAD per la scrittura del primo dispositivo fluidico (molte quote sono omesse per leggibilità, le misure sono in micron). Sono presenti tre canali con sezione rettangolare collegati ai relativi pozzetti di accesso da canali a sezione circolare, realizzati con una sola linea. I piedini laterali facilitano la gestione del chip.*

Il progetto dei dispositivi è effettuato stabilendo le dimensioni che si desiderano per la scrittura laser. Tuttavia in questa fase è necessario tenere conto del fatto che l'acido scaverà le strutture aumentando le dimensioni di canali, pozzetti e scatole; per questo motivo le loro dimensioni sono minori di quelle che si desiderano alla fine, e le distanze tra le scatole sono maggiori.

Le scatole sono realizzate tramite irraggiamento a carpet, cioè con linee parallele che ne tracciano la superficie laterale (Fig. 4.2 in alto), mentre i pozzetti sono irraggiati con un'elica a sezione circolare (Fig. 4.2 in basso). Vista la loro dimensione elevata rispetto a quella di una singola linea scavata dall'acido, le scatole laterali e i pozzetti sono scritti con più strutture concentriche rispetto a quelle esterne, due per le scatole e tre per i pozzetti, per velocizzare l'etching.

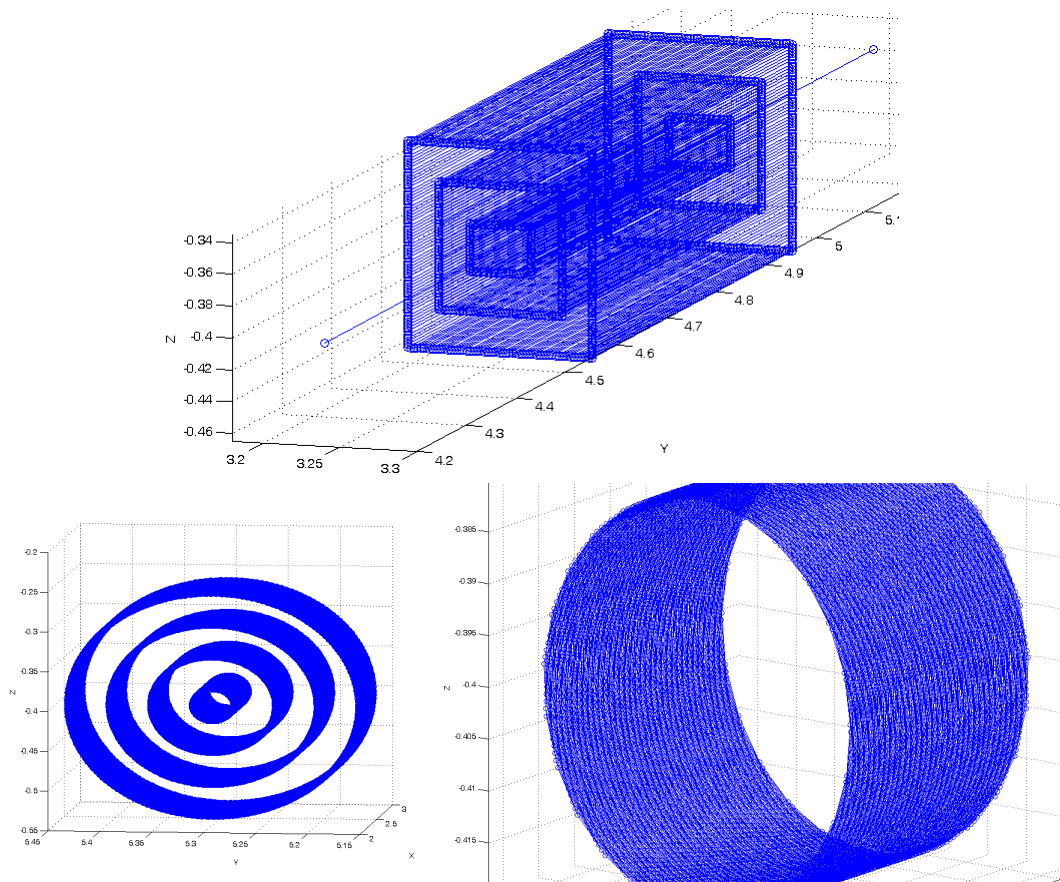


Figura 4.2: Immagine dei percorsi di irraggiamento laser, prodotte tramite il software Matlab che si occupa di generare il G-Code per i tracciati di irraggiamento. In alto è mostrato il percorso utilizzato per la realizzazione di una camera, con tre parallelepipedi concentrici irraggiati a linee parallele, e la linea singola centrale per il canale. In basso si vede il tracciato per realizzare i pozzetti, sulla sinistra le strutture concentriche, e sulla destra un dettaglio dell'irraggiamento a elica di una singola superficie cilindrica.

Visto il grande numero di linee necessarie per produrre questi dispositivi, i file contenenti il G-Code necessario sono stati prodotti tramite un software a interfaccia grafica scritto appositamente all'interno del laboratorio.

4.2 Realizzazione del dispositivo

Durante la prima scrittura laser sono stati irraggiati tre dispositivi che differiscono tra loro per la distanza tra i canali (40 e 60 μm) e per le distanze tra i piedini e i pozzetti di accesso. L'irraggiamento è stato effettuato con una potenza media di 200 mW e repetition rate di 500 kHz alla lunghezza d'onda di 520 nm (seconda armonica del laser HighQ a

1040 nm), quindi nel regime di scrittura intermedio descritto nella sezione 2.2. Durante la fase di etching sono state riscontrate alcune differenze nella velocità di erosione dell'acido nei diversi chip, tanto che, dei due progettati con canali distanti $40\ \mu\text{m}$, un dispositivo ha visto sfondarsi una delle pareti di separazione tra il canale centrale ed uno dei due laterali, mentre l'altro ha mantenuto entrambe le pareti con uno spessore tra i 6 e i $10\ \mu\text{m}$.

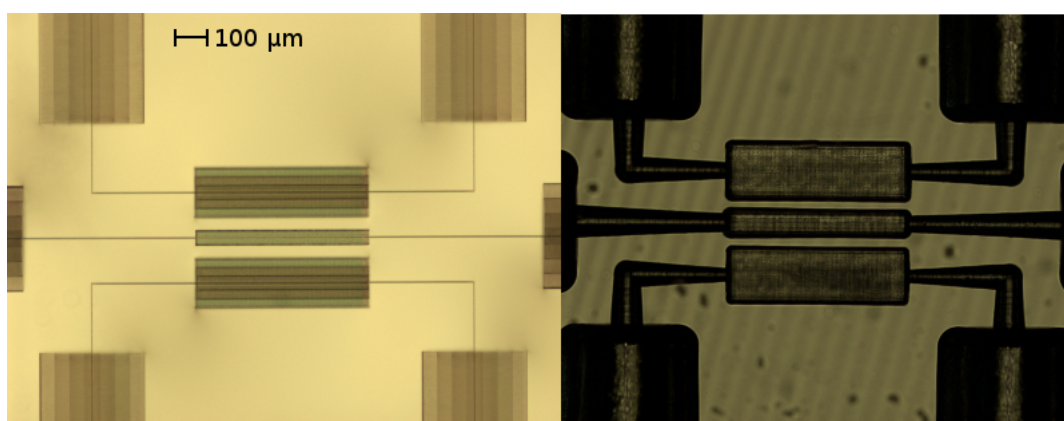


Figura 4.3: Immagine del primo dispositivo fluidico prima e dopo l'attacco chimico in acido, con canali distanti $40\ \mu\text{m}$ da progetto. Si può notare come le dimensioni delle strutture scavate siano visibilmente maggiori rispetto a quelle delle strutture irraggiate, e le sezioni dei canali siano maggiori verso gli imbocchi dei canali.

Il tempo di permanenza dei dispositivi in acido è determinato dal tempo necessario affinché tutte le scatole siano svuotate da qualsiasi residuo di vetro che possa ostruire il passaggio del liquido e i pozzetti raggiungano le dimensioni sufficienti perché possano essere infilati al loro interno i tubi da $360\ \mu\text{m}$.

I due dispositivi che al termine dell'etching avevano ancora le pareti integre, di cui uno è mostrato, prima e dopo il passaggio in acido, in Fig. 4.3, sono stati connettorizzati utilizzando il setup descritto nella sezione 3.2 con tubi da $360\ \mu\text{m}$ di diametro esterno e $100\ \mu\text{m}$ di diametro interno. Dopo la connettorizzazione è stata verificata l'assenza di perdite di liquido nei circuiti fluidici dai pozzetti inserendo liquidi di diverso colore nei tre canali (Fig. 4.4). Questa prova consente anche di notare con estrema facilità se i canali sono comunicanti tra loro tramite fori nelle pareti non visibili al microscopio.

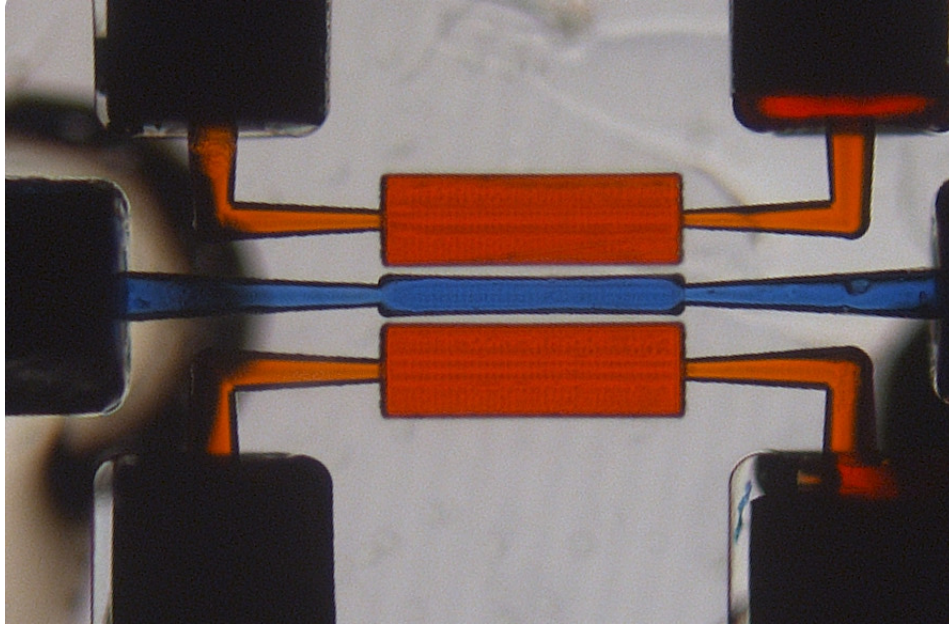


Figura 4.4: *Immagine al microscopio dei canali del primo dispositivo fluidico riempiti di liquidi colorati, si vede facilmente che non ci sono fuoriuscite di liquido dai pozzetti né fori tra le pareti dei canali.*

4.3 Montaggio sul setup di caratterizzazione

Per poter effettuare misure di caratterizzazione del dispositivo è stato necessario progettare un sistema che permettesse di tenere il chip sul piatto del microscopio a fluorescenza invertito e di far fluire acqua a due temperature diverse nei canali laterali. Per scaldare l'acqua, i tubi che entrano nei pozzetti di ingresso dei canali laterali sono stati avvolti intorno a cilindretti di rame ricoperti da uno strato d'oro, per migliorare la conduzione termica tra le superfici, del diametro di 3 cm (Fig. 4.5).



Figura 4.5: *Fotografia del cilindretto metallico attorno al quale viene arrotolato il tubo, prima che venga spalmata la pasta termoconduttiva.*

Il contatto termico tra tubi e cilindretti è garantito dalla pasta termica. Insieme ai tubi è stata fissata a ciascun cilindretto anche un termistore che viene utilizzato dai controllori PID per rivelare la loro temperatura e retroazionare il controllo. I cilindretti

sono attaccati a delle celle Peltier con del nastro adesivo termoconduttivo e coperti con dei tappi di materiale termoisolante per imballaggi. Il numero di avvolgimenti dei tubi intorno ai cilindretti è stato stabilito perché l'acqua, fluendo alla portata scelta tramite la calibrazione descritta di seguito, avesse il tempo di raggiungere la temperatura dei cilindretti, ma la resistenza fluidica del circuito non aumentasse troppo per via della lunghezza eccessiva dei tubi. Per evitare che la temperatura dell'acqua diminuisca drasticamente tra l'uscita dai cilindretti e l'ingresso nei canali, la lunghezza del tratto di tubo che percorre quella distanza è stata ridotta al minimo necessario, posizionando le celle Peltier più vicino possibile al chip.

Per sostenere e bloccare il dispositivo e le celle Peltier e per fornire una superficie di scambio termico alle celle, è stata appositamente fabbricata una piastra di metallo con un foro circolare centrale del diametro di 2 cm da cui possono essere osservati i canali del dispositivo con gli obiettivi che risiedono sotto al piatto del microscopio. Perché il

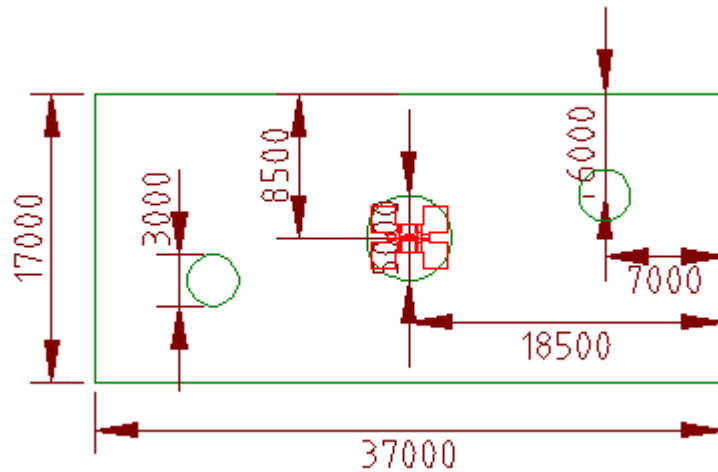


Figura 4.6: *Disegno per la piastrina di PMMA che sostiene il dispositivo, il foro centrale permette di osservare il dispositivo dal lato inferiore e nei fori laterali passano le viti che la bloccano alla piastra metallica. Questi fori sono disassati rispetto all'asse del dispositivo per non intralciare i tubi che escono dal canale centrale.*

chip possa essere rimosso facilmente dalla piastra e perché rimanga termicamente isolato da essa, è stato fissato incollando i piedini su un supporto di PMMA in cui è stato preventivamente praticato un foro al centro, del diametro di 5 mm, per permettere alla luce trasmessa o riflessa dal dispositivo di raggiungere l'obiettivo del microscopio senza dover attraversare il materiale plastico che potrebbe introdurre distorsioni nell'immagine

o comunque alterarne la qualità (Fig. 4.6). Il supporto di PMMA viene poi fissato alla piastra metallica tramite due viti che garantiscono il posizionamento stabile del chip e ne consentono la rimozione agevole. I fori per le viti della piastra metallica sono stati filettati internamente per evitare la necessità di dadi sulla sua faccia inferiore, contro cui potrebbero urtare gli obiettivi del microscopio quando il piatto viene traslato. Le celle Peltier sono fissate alla piastra tramite nastro adesivo termoconduttivo. La piastra è poi avvitata al piatto del microscopio, avendo cura di spalmare di pasta termoconduttiva le zone in cui sono a contatto, perché tutto il corpo del microscopio dissipi il calore scambiato dalle celle Peltier. L'intero sistema è visibile in Fig. 4.7. La piastra è stata costruita in modo che la sua parte centrale, che tiene il dispositivo e le celle, sia più bassa del piatto del microscopio, per potersi avvicinare il più possibile all'obiettivo e lasciare più spazio tra i cilindretti e il condensatore del microscopio.

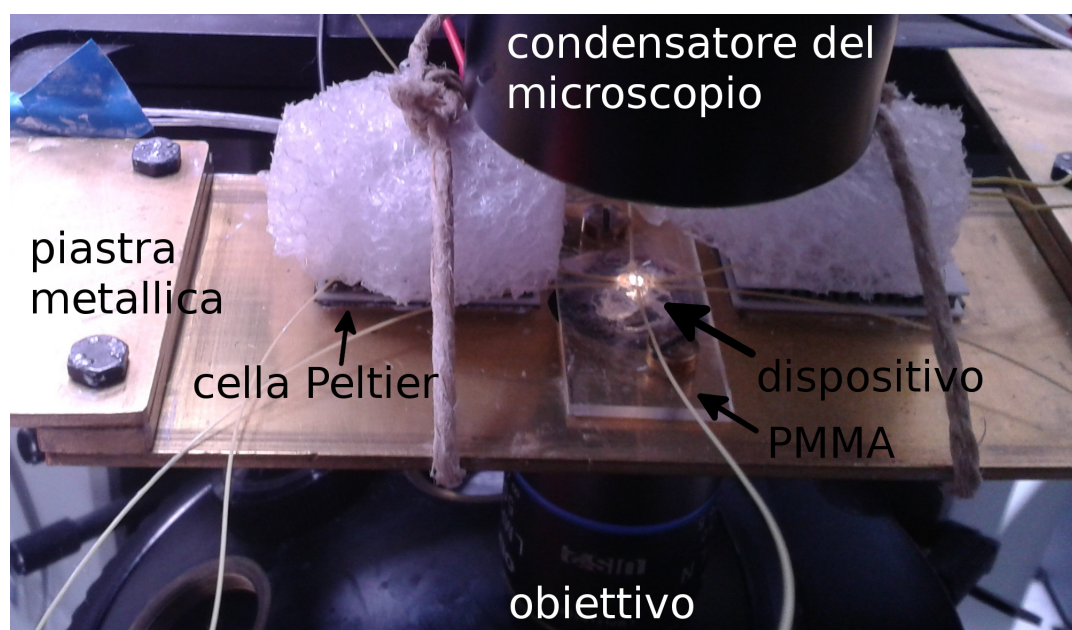


Figura 4.7: Fotografia del dispositivo montato sul microscopio invertito: il chip è incollato sul supporto di PMMA che è avvitato sulla piastra metallica. Accanto al chip sono visibili le celle Peltier su cui sono poggiati i cilindretti metallici attorno ai quali sono avvolti i tubi, non visibili perché coperti dai materiali termoisolante. Le celle Peltier sono fissate alla piastra, che a sua volta è avvitata al piatto del microscopio.

4.4 Caratterizzazione del primo prototipo del dispositivo

Le prime misure di caratterizzazione che sono state eseguite su questo dispositivo hanno avuto lo scopo di determinare la temperatura dell'acqua all'interno dei canali e di monitorarla al variare della temperatura imposta dalle celle Peltier e della portata dei canali. Innanzitutto sono state prese in esame diverse tecniche utilizzate in letteratura con questo scopo.

4.4.1 Tecniche di misura della temperatura in canali microfluidici

Viste le ridotte dimensioni dei canali, non è possibile immaginare di inserire al loro interno un sensore di temperatura, né di fabbricarne uno direttamente nel canale per via della natura del processo di fabbricazione tramite laser a femtosecondi, come invece viene fatto talvolta con tecniche fotolitografiche, che prevedono la deposizione di strati successivi di materiale e la loro rimozione selettiva per ottenere le strutture desiderate, come illustrato nella sezione 1.1.2.

Una tecnica di misura della temperatura molto nota e utilizzata anche in ambito industriale per la misura a distanza prevede l'utilizzo di termocamere, cioè fotocamere con sensori di immagine sensibili all'infrarosso termico. Per la legge di Wien, il picco di intensità dello spettro di emissione di un corpo nero si trova alla lunghezza d'onda data dalla formula

$$\lambda_{max} = \frac{b}{T} \quad (4.4)$$

dove b è una costante pari a $2.898 \cdot 10^{-3}$ m·K e T è la temperatura del corpo in gradi Kelvin. Sebbene i fluidi all'interno dei canali non siano corpi neri ideali, questa legge fornisce un intervallo di lunghezze d'onda sufficientemente indicativo per localizzare il loro spettro di emissione. Purtroppo il fused silica ha uno spettro di trasmissione che va a zero verso i $4.5 \mu\text{m}$ e con un minimo intorno ai $2.7 \mu\text{m}$, come illustrato in Fig. 4.8, mentre i massimi dello spettro di emissione di un corpo tra i 20 e 80 °C sono localizzati tra gli $8.18 \mu\text{m}$ e i $9.89 \mu\text{m}$, pertanto questa tecnica, che avrebbe fornito, senza grande

sforzo, informazioni sulla temperatura del liquido nei canali con una buona risoluzione sulla posizione, è stata scartata per questa applicazione.

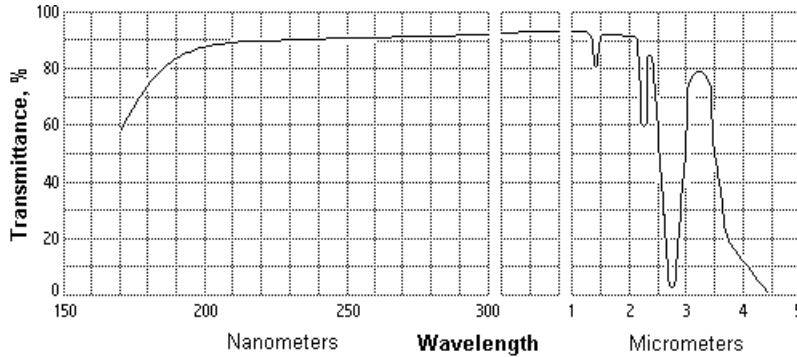


Figura 4.8: Spettro di emissione del fused silica, ha un minimo intorno ai $2.7 \mu\text{m}$ e va a zero dopo i $4.5 \mu\text{m}$.

In letteratura sono state presentate diverse tecniche che prevedono di misurare la temperatura osservando l'intensità dei modi vibrazionali dell'acqua attraverso spettroscopia Raman [29] o misurando le variazioni nello spettro di assorbimento dell'acqua nel vicino infrarosso [30]. In particolare con la tecnica Raman sono state effettuate misure in diversi punti del microcanale ma non è stata effettuata l'acquisizione di un'intera immagine, per via dei tempi lunghi di acquisizione (intorno al secondo per ogni punto), pertanto si rivela poco adatta alla misura di interesse per il lavoro di questa tesi. Nel caso delle misure di spettro di assorbimento nel vicino infrarosso, sono state acquisite immagini con una risoluzione in temperatura di $0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizzando un microscopio con componenti ottiche per l'infrarosso, una fotocamera per l'infrarosso e due spettrometri, per il controllo dello spettro di tutta l'immagine. Questa tecnica appare piuttosto efficace, ma richiederebbe di modificare le ottiche del microscopio del setup di caratterizzazione e sostituire la telecamera, pertanto è stato scelto di cercare delle alternative ad essa che permettessero di utilizzare la strumentazione già presente.

Un'altra tecnica di misura della temperatura molto utilizzata per la sua semplicità sfrutta la dipendenza dell'intensità di fluorescenza di alcune molecole dalla temperatura. Come fluorofori possono essere utilizzati quantum dot o diversi tipi di molecole organiche. I quantum dot possono essere prodotti regolando la loro dimensione per accordare le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione. Utilizzando quantum dot sono state

effettuate misure con una risoluzione di temperatura intorno al grado e risoluzione spaziale di circa $1 \mu\text{m}$ [31]. Con fluorofori organici, tra cui ad esempio la Rodamina e le sue varianti, sono stati ottenuti risultati analoghi, con risoluzioni confrontabili, talvolta migliorate con l'uso di tecniche di media [32]. Al contrario dei quantum dot, i fluorofori organici soffrono sensibilmente del fenomeno del photobleaching, cioè della degradazione della molecole per via dei numerosi cicli di assorbimento e riemissione di luce, che portano ad una diminuzione dell'intensità del segnale di fluorescenza nel tempo. L'intensità di fluorescenza, oltre che dall'intensità della luce di eccitazione e dall'efficienza delle molecole, dipende anche dalla concentrazione del fluoroforo e dalle dimensioni del volume irraggiato. Pertanto si rende necessaria, per ogni misura, una calibrazione del sistema di interesse, effettuando misure a temperatura nota. Per superare questo problema è stata proposta l'utilizzo contemporaneo di due fluorofori con diverse risposte alla temperatura [33]. In particolare sono state utilizzate Rodamina B, la cui intensità di fluorescenza è fortemente dipendente dalla temperatura a cui si trova, e Rodamina 110, che non risente degli effetti della temperatura. In questo modo è stato possibile ricavare informazioni sulla temperatura del sistema utilizzando come parametro il rapporto tra le due intensità di fluorescenza, svincolandosi quindi dalla geometria del circuito fluidico e dalla concentrazione della soluzione (a patto di mantenere costante il rapporto tra le concentrazioni dei due fluorofori). Lo svantaggio di questa tecnica è la necessità di utilizzare due diversi filtri per la raccolta della luce di fluorescenza, quindi un normale microscopio a fluorescenza non è sufficiente.

Per non dover apportare modifiche al setup sperimentale già in uso nel laboratorio di caratterizzazione, è stato scelto di misurare la temperatura nei canali laterali del dispositivo misurando la variazione dell'intensità di fluorescenza di un solo fluoroforo. È stata scelta per queste misure la Sulforodamina B (Lambda Physik), per la sua forte dipendenza dalla temperatura e la sua tendenza a non venire assorbita dalle pareti dei canali in vetro.

4.4.2 Misure della temperatura nei canali del dispositivo

Le prime misure effettuate sul dispositivo hanno avuto lo scopo di valutare la dipendenza dell'intensità di fluorescenza della Sulforodamina B dalla temperatura, per poter avere successivamente una stima della differenza di temperatura tra i canali. Per avere la certezza che l'acqua nei canali avesse esattamente la temperatura imposta dalle celle Peltier, è stata utilizzata una configurazione diversa da quella mostrata in figura 4.7. Il dispositivo è stato posto sopra un disco metallico forato in centro, per permettere di osservare i canali attraverso l'obiettivo posto al di sotto del piatto del microscopio, e il disco a sua volta è stato appoggiato sopra una cella Peltier ad anello, sempre per permettere l'osservazione dei canali. In questo modo sono state eliminate, per questa fase di calibrazione, le eventuali perdite di calore da parte dell'acqua durante il suo percorso nei tubi prima di giungere all'imbocco dei canali, poiché tutto il chip si trova per forza alla temperatura imposta. Questa soluzione naturalmente è valida solo per questo stadio di calibrazione, perché non permette di differenziare la temperatura nel chip e quindi di avere alcun tipo di gradiente termico.

Il canale utilizzato per la calibrazione è stato riempito, utilizzando la pompa a siringa in dotazione al laboratorio di Soft Matter in cui è stata svolta la caratterizzazione, con una soluzione di acqua e Sulforodamina B (concentrazione 1% in massa). La procedura di acquisizione dei diversi punti sperimentali si compone della sequenza dei seguenti passaggi:

- tenendo chiuso lo shutter del microscopio, si fa passare la soluzione nel canale a $300 \mu\text{l}/\text{min}$ per 3 minuti per svuotarlo e pulirlo completamente da quella presente in precedenza, in modo da rimuovere i fluorofori che hanno subito photobleaching
- vengono spente le pompe e impostata la temperatura sulla cella Peltier dal controllore PID, e si attende per 15 minuti che tutto il chip termalizzi a quella temperatura
- si apre lo shutter del microscopio e si acquisisce un filmato del canale per 2 minuti
- si chiude lo shutter e si ripetono i passaggi per la temperatura successiva.

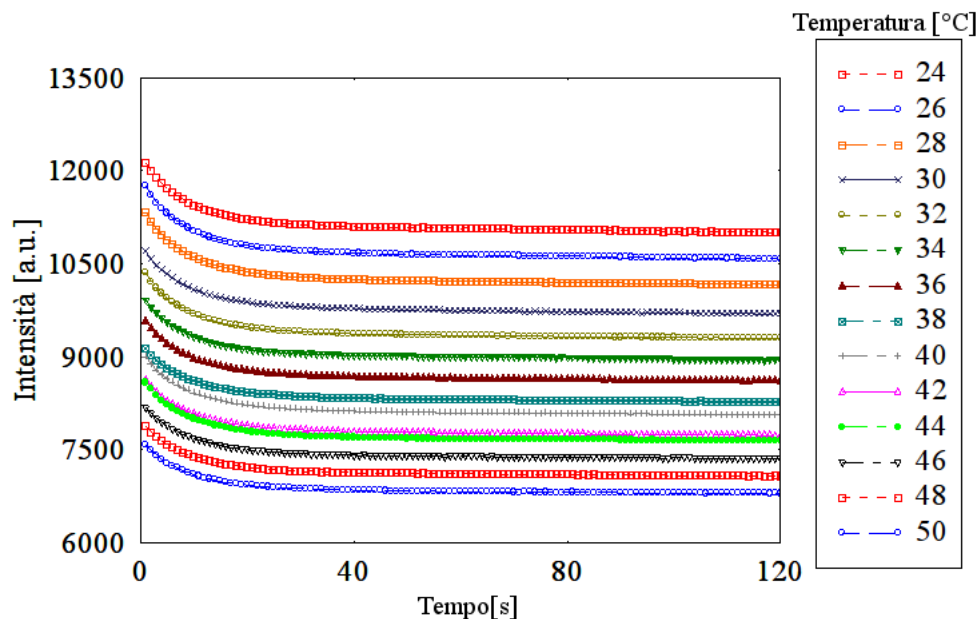


Figura 4.9: Andamento dell'intensità di fluorescenza della Sulforodamina B in funzione del tempo per diversi valori di temperatura. I punti sono stati acquisiti a 2 °C di distanza e sono chiaramente distinguibili. Si osserva all'inizio di ogni misura una diminuzione dell'intensità di fluorescenza, legata al riscaldamento del chip da parte della lampada, una volta aperto lo shutter.

Sono state eseguite misure ogni 2 °C dai 24 ai 50 °C, per ogni fotogramma di ciascun filmato è stata poi effettuata la media dell'intensità in una zona centrale del canale ed è stato ricavato un grafico delle intensità di fluorescenza in funzione del tempo per ciascuna temperatura, visibile in Fig. 4.9. Dal grafico si nota come i punti a distanza di 2 °C siano ben distinguibili tra loro; tuttavia a causa delle variazioni di intensità di eccitazione, dovute probabilmente soprattutto all'instabilità della lampada a mercurio utilizzata per le misure di fluorescenza, alcuni punti sono più vicini tra loro di quanto ci si aspetterebbe, come ad esempio quelli presi a 42 e 44 °C; pertanto si stima che con questa tecnica e con questo setup sperimentale si possa avere una precisione al massimo di ± 1 °C.

4.4.3 Analisi della temperatura in funzione della portata dei canali

Terminata la calibrazione in temperatura, si è tentato di stabilire quale fosse la minima portata necessaria perché la caduta di temperatura nel tratto di tubo tra il cilindretto di rame e il dispositivo fosse minima. Il tentativo è stato quello di aumentare la portata

nei canali fino a che la temperatura smettesse di salire, questo può essere monitorato osservando l'intensità di fluorescenza che smette di scendere una volta trovata la portata corretta. È stata fatta passare in uno dei canali laterali, utilizzando la pompa a siringa, una soluzione di acqua e Sulforodamina B (concentrazione 1% in massa) a diverse portate, dai 200 ai 1000 μl al minuto, per diverse temperature dei cilindretti. Il limite superiore per la portata è dato da quella massima sopportabile dalle pompe prima che le siringhe si deformino o il motore si blocchi per la resistenza fluidica eccessiva. Come previsto il segnale diminuisce all'aumentare della portata, perché l'acqua impiega meno tempo a raggiungere il canale una volta che è stata scaldata, e quindi scambia meno calore con l'ambiente esterno, che ha una temperatura di circa 20 °C più bassa.

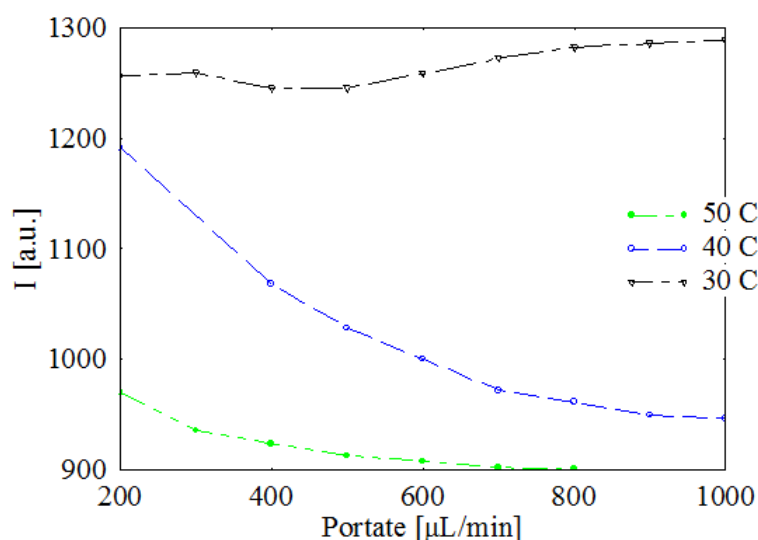


Figura 4.10: Grafico dell'intensità di fluorescenza nel canale laterale in funzione della portata per diversi valori di temperatura. L'intensità continua a diminuire aumentando la portata, anche se la distanza tra i punti sperimentali alle diverse portate diminuisce progressivamente.

In Fig. 4.10 sono mostrati i valori intensità di fluorescenza in funzione della portata per diverse temperature. Si può vedere come la caduta di temperatura diminuisca molto quando la portata sale, tuttavia per i limiti del setup sperimentale non è stato possibile trovare il valore limite oltre cui l'intensità smette di diminuire, e quindi la temperatura smette di salire. È ragionevole prevedere che oltre un certo valore di portata la temperatura ricominci a diminuire, perché l'acqua non fa più in tempo a raggiungere l'equilibrio termico con il cilindretto di rame, purtroppo non è stato possibile spingersi alle portate

necessarie per osservare questo fenomeno.

4.4.4 Prime evidenze di termoforesi

Una volta che è stato verificato che i canali laterali, con il setup utilizzato, si portano effettivamente a temperature molto vicine (a circa $1 \div 2^\circ\text{C}$) a quelle imposte attraverso le celle Peltier, sono state compiute le prime prove di termoforesi inserendo particelle di Polistirene (PS) all'interno del canale centrale del dispositivo e mantenendo i canali laterali a temperature differenti. Sono state effettuate misure con particelle di PS di diversi diametri, da 250 nm a 1 μm .

Per valutare la concentrazione di particelle all'interno del canale è stata utilizzata una particolare tecnica ottica denominata Differential Dynamic Microscopy (DDM), introdotta da Cerbino *et al.* nel 2008[34], che si basa sull'analisi del campo scatterato attraverso il campione, e che permette di analizzare la concentrazione e il moto di particelle di dimensioni inferiori al limite di risoluzione del microscopio, proprio perchè si basa sull'analisi del campo scatterato e non di quello trasmesso. Il campo visto dall'obiettivo è la somma del campo trasmesso, molto intenso, e quello scatterato attraverso le particelle. Per poter analizzare il solo campo scatterato, che è quello che contiene le informazioni sulle particelle, bisogna però eliminare la parte di segnale relativa al campo trasmesso, che contiene le informazioni sulla struttura e le imperfezioni del canale: ciò viene effettuato acquisendo più immagini, cioè un filmato, e sottraendo a ciascun fotogramma la sua media temporale e dividendo sempre per la media. Questo è giustificato poiché la media contiene in buona approssimazione solo l'informazione sul campo trasmesso, la sottrazione permette di eliminare dall'intensità totale, che è la quantità misurata dal rivelatore, l'intensità del campo trasmesso, mentre la divisione elimina il fattore moltiplicativo pari all'ampiezza del campo trasmesso dal prodotto tra campo trasmesso e campo scatterato. L'intensità del campo scatterato risulta trascurabile, rimane quindi solo il termine legato all'ampiezza del campo scatterato. La tecnica si basa sul fatto che la concentrazione, cioè il numero di particelle nell'area esaminata, determina la varianza temporale dell'intensità del campo scatterato. Questo è facile da capire a livello intuitivo pensando che, in assenza di particelle, se si acquisisce una sequenza di immagini la sua varianza non

potrà che essere nulla, perché l'immagine dovrà essere costante, mentre all'aumentare dei centri di scattering in moto browniano (ossia in presenza di particelle), verranno introdotte deviazioni nel percorso della luce che porteranno all'aumento della varianza. In questo modo si può dimostrare come sia possibile utilizzare la varianza dell'intensità del campo scatterato, al variare della posizione lungo la direzione del gradiente termico, per ricavare la concentrazione delle particelle nel canale in quella direzione. Questo è valido se le immagini su cui viene calcolata la varianza presentano tutte la stessa concentrazione, quindi se sono acquisite in un intervallo temporale più breve di quello necessario perché ci sia una variazione significativa di temperatura. Tuttavia la distanza temporale tra le immagini deve essere sufficiente perché il campo sia decorrelato tra un'immagine e la successiva. Per studiare la variazione della concentrazione nel tempo, viene acquisito un gran numero di immagini e viene calcolata la varianza su sequenze successive di immagini, avendo cura di rispettare il vincolo temporale appena discusso.

Per poter ottenere immagini del campo scatterato, è necessario utilizzare il microscopio in condizione di illuminazione di Kohler, che garantisce che il campione sia illuminato uniformemente e con la stessa inclinazione. Se questa condizione non è verificata, gli angoli di scattering non sono più coerenti tra loro e il campione può presentare ombre e artefatti dovuti all'illuminazione non uniforme che invalidano la tecnica.

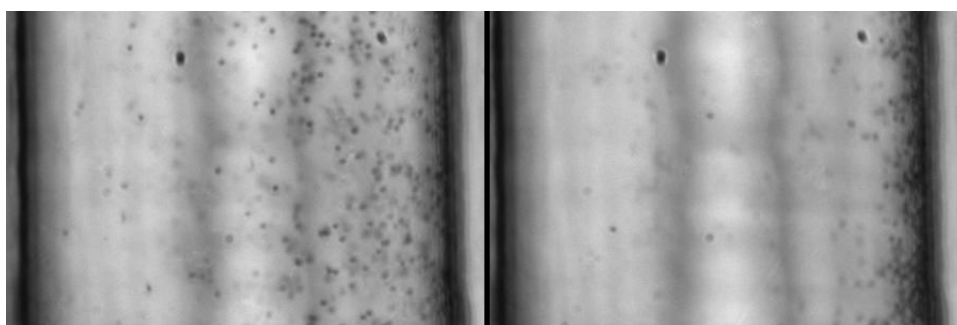


Figura 4.11: *Immagini successive della separazione di particelle di 900 nm di diametro nel canale centrale del primo dispositivo fluidico. Nella prima immagine si inizia a vedere un gradiente di concentrazione, nella seconda il gradiente è stazionario e la separazione è completata.*

Durante i primi esperimenti è stata osservata separazione termoforetica con particelle da 900 nm (Fig. 4.11), tuttavia la visualizzazione delle particelle nel canale centrale risulta piuttosto disturbata dal rumore introdotto dalla rugosità delle sue superfici. Per

particelle di dimensione inferiore alla risoluzione del microscopio, per cui la tecnica DDM è fondamentale perchè non possono essere osservate direttamente, dal momento che è visibile solo la luce scatterata attraverso di esse, la rugosità delle superfici è un forte ostacolo per il buon esito delle misure, come risulta evidente in Fig. 4.12, dove gli ologrammi di particelle di 240 nm di diametro si confondono con i difetti della superficie del canale.

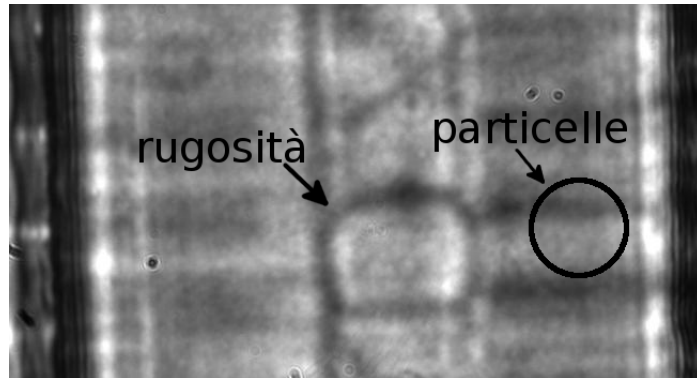


Figura 4.12: Immagine al microscopio ottico del canale centrale del primo dispositivo fluidico, con particelle di 240 nm di diametro. Non è possibile vedere l'immagine delle particelle, ma solo il loro campo scatterato, poiché la loro dimensione è inferiore alla risoluzione del microscopio. La rugosità è molto più visibile dell'ologramma delle particelle.

4.5 Modifiche apportate al progetto iniziale

In seguito alle misure eseguite durante la caratterizzazione del primo dispositivo, sono state evidenziate alcune criticità nella sua progettazione e realizzazione. Per prima cosa la resistenza fluidica del circuito composto da tubi, canali e camere è molto elevata: questo rende difficile pompare liquido al suo interno a velocità elevata poiché le siringhe in plastica tendono a deformarsi e il motore delle pompe a siringa fatica a spingere lo stantuffo di quelle in vetro. Inoltre la pressione eccessiva rischia di sfondare la colla che sigilla i tubi all'interno dei pozzetti del dispositivo. In secondo luogo è stato osservato che in corrispondenza dei vertici delle camere laterali si verifica un ristagno di acqua che rende meno omogenea la temperatura al suo interno. Inoltre le pur piccole variazioni dello spessore delle pareti tra i canali (pochi micron) risultano rilevanti quando la distanza tra i canali è molto esigua come in questi dispositivi, cioè tra i 6 e i 20 μm . Infine, e

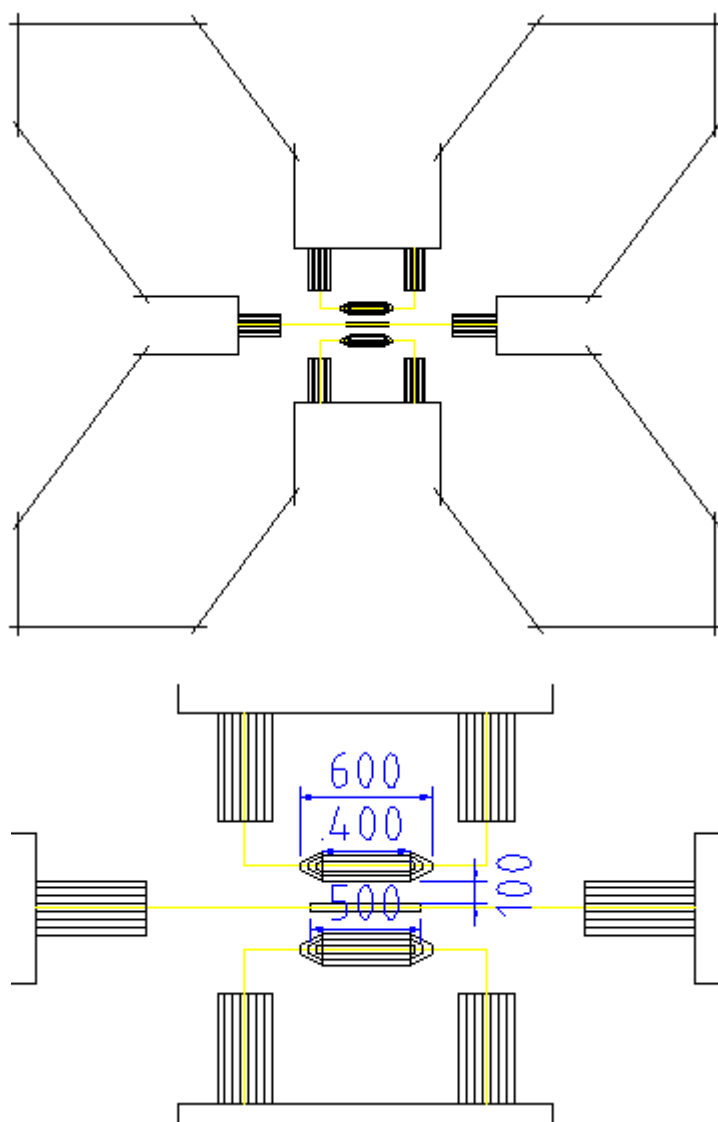


Figura 4.13: Progetto CAD per la scrittura del dispositivo fluidico finale (molte quote sono omesse per leggibilità, le misure sono in micron). Alle scatole laterali sono state aggiunti in ingresso e in uscita tronchi di piramide per facilitare il deflusso dell'acqua, le pareti tra i canali sono più spesse e le dimensioni dei piedini sono aumentate. In alto è mostrato il progetto del chip intero e sotto un ingrandimento per mostrare il dettaglio dei canali.

questa è probabilmente la questione più rilevante, la rugosità delle superfici del canale centrale rende molto difficoltoso se non impossibile l'utilizzo delle tecniche ottiche per l'analisi del moto e della concentrazione delle particelle di polistirene di dimensione sub-micrometrica utilizzate per gli studi di termoforesi in questo lavoro di tesi e descritte in precedenza nella sezione 4.4.4.

Pertanto sono state apportate alcune modifiche al progetto originario, per giungere ad

una versione finale del dispositivo che non soffrisse di queste problematiche. Il progetto per l'irraggiamento laser del nuovo dispositivo è visibile in Fig. 4.13, ed in Fig. 4.14 è mostrata l'immagine del chip prima e dopo il passaggio in acido.

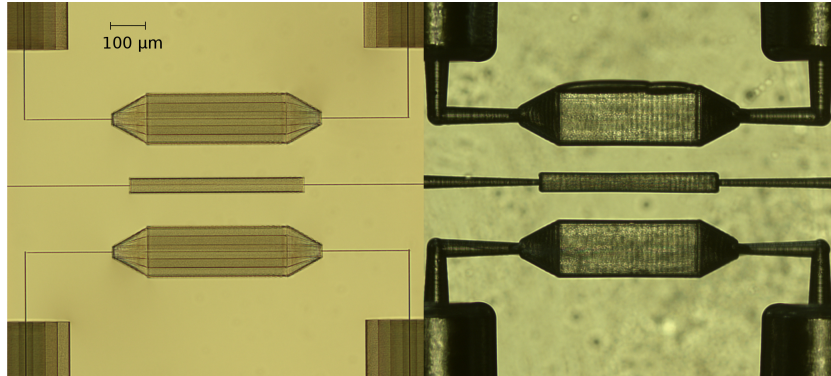


Figura 4.14: Immagine del dispositivo fluidico finale prima e dopo l'attacco chimico in acido, con canali distanti $100\ \mu\text{m}$ da progetto e tronchi di piramide alle estremità delle camere laterali.

Le modifiche apportate sono quindi state le seguenti:

- sono stati utilizzati tubi di connessione in PEEK con diametro esterno sempre di $360\ \mu\text{m}$ ma con diametro interno di $150\ \mu\text{m}$, inoltre i tubi sono stati tenuti molto più corti e connessi, nel caso di quelli infilati nei pozzetti dei canali laterali, con tubi di diametro maggiore che percorra la maggior parte del tragitto tra il piatto del microscopio e le pompe a siringa. Questo permette di ridurre di molto la resistenza fluidica totale e quindi di diminuire la pressione nella rete fluidica, favorendo l'azione delle pompe e la tenuta delle connessioni.
- sono state aggiunte alle estremità delle camere dei canali laterali delle altre camere a tronco di piramide lunghe $100\ \mu\text{m}$ ciascuna e sono stati accorciate di $100\ \mu\text{m}$ le prime, per facilitare il deflusso dell'acqua ed evitare ristagni (Fig. 4.15).
- è stato aumentato lo spessore delle pareti tra i canali a $100\ \mu\text{m}$ in fase di irraggiamento, che ha portato ad una separazione dei canali dopo la fase di erosione in acido tra i 50 e i $70\ \mu\text{m}$, a seconda dei tempi di immersione nell'acido, per rendere meno rilevante la variazione del loro spessore lungo la direzione del flusso (Fig. 4.15).

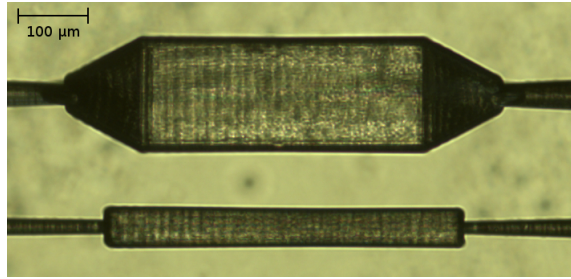


Figura 4.15: Immagine al microscopio di una parte del chip ottenuto dopo l'erosione in acido. Si osserva un canale laterale con le camere che terminano a tronco di piramide e del canale centrale, distanziato dai due laterali rispetto al primo progetto.

- È stata introdotta un'ulteriore fase di lavorazione del chip che consiste in un trattamento termico di annealing, che riduce notevolmente la rugosità delle superfici, rendendo applicabili le tecniche ottiche scelte per l'analisi delle particelle di polistirene di dimensione inferiore al micron. Il risultato di questo trattamento è mostrato in Fig. 4.16.

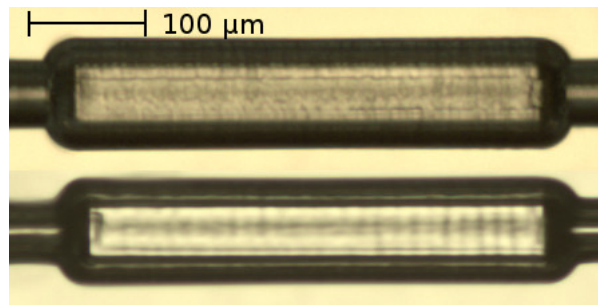


Figura 4.16: Immagine al microscopio di un canale prima (pannello in alto) e dopo (pannello in basso) il trattamento di annealing termico per ridurre la rugosità delle sue superfici.

- Sono state aumentate le dimensioni dei piedini per facilitare la gestione del chip durante le varie fasi di lavorazione e connettorizzazione.

4.6 Caratterizzazione della seconda versione del dispositivo

Una volta corrette le criticità discusse nelle sezioni precedenti, in particolare grazie alla riduzione della rugosità superficiale, è stato possibile osservare gli effetti della termoforesi con particelle di diversa dimensione ed effettuare misure di concentrazione all'interno del canale centrale del dispositivo utilizzando la tecnica DDM sulle immagini acquisite.

4.6.1 Validazione della tecnica Differential Dynamic Microscopy

Per controllare la capacità della tecnica DDM di risalire alla concentrazione a partire dalla varianza dei fotogrammi acquisiti, sono stati acquisiti filmati a diverse concentrazioni note e in assenza di gradiente termico tra i canali.

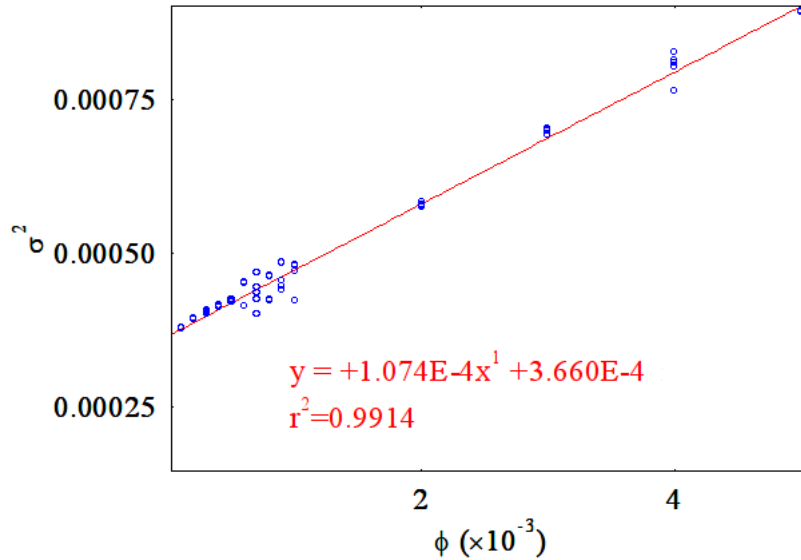


Figura 4.17: *Punti sperimentali per la calibrazione della DDM. È mostrata la varianza media delle immagini σ^2 in funzione della frazione massica Φ . La dipendenza tra le due grandezze è lineare, come si può osservare dalla retta di fit.*

Come si può osservare dalla Fig. 4.17, in cui è mostrata la dipendenza della varianza media dell'immagine dalla concentrazione della soluzione, il fit lineare segue molto bene i punti sperimentali, con un R^2 superiore a 0.99. Questo risultato sperimentale verifica l'efficacia della DDM nel setup di caratterizzazione utilizzato, mostrando che la concentrazione di soluto è direttamente proporzionale alla varianza dell'immagine, permettendo quindi di legittimare i risultati sperimentali che verranno mostrati in seguito.

4.6.2 Misure di concentrazione

Allo scopo di valutare la presenza e l'efficacia del trasporto di massa per effetto della termodiffusione, sono state effettuate misure di concentrazione e della sua variazione nel canale contenente il campione. Per poter applicare la tecnica DDM descritta in precedenza, sono

stati acquisiti filmati con diversi gradienti di temperatura nel canale centrale; la portata utilizzata nei canali laterali è stata di $400 \mu\text{l}/\text{min}$, per evitare di avere fluttuazioni dovute a deformazioni delle siringhe. Nonostante questo valore di portata, come emerso dalle misure di portata effettuate nella prima versione del dispositivo, non sia ottimale per portare l'acqua nei canali laterali alla stessa temperatura delle celle Peltier, sembra ragionevole supporre che la caduta di temperatura sia circa la medesima per entrambi i canali laterali, e che quindi la differenza di temperatura tra le due camere subisca variazioni molto piccole rispetto a quella imposta tra i cilindretti metallici utilizzati per scaldare l'acqua, che sarebbe quella imposta tra le celle Peltier.

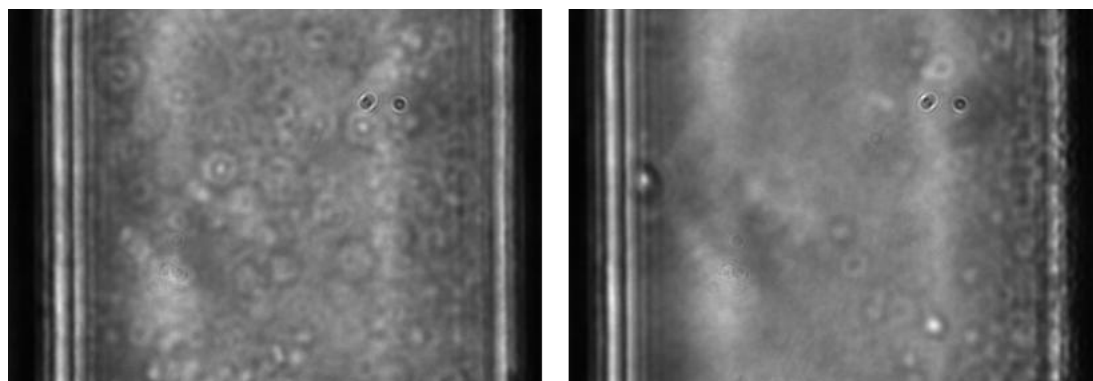


Figura 4.18: *Esperimenti di termoforesi di particelle da 500 nm. Tra i canali è stata imposta una differenza di temperatura di $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Nella prima immagine è mostrato il canale centrale prima dell'accensione del gradiente termico, nella seconda la separazione è giunta a regime e si osserva una variazione della concentrazione lungo la direzione del gradiente.*

Durante gli esperimenti sono state utilizzate particelle di PS da 500 nm di diametro; la loro dimensione è sufficientemente ridotta perchè non possano essere osservate singolarmente al microscopio ottico, ma sia visibile il campo scatterato attraverso di esse. Già dalle immagini acquisite al microscopio (Fig. 4.18) è evidente lo spostamento delle particelle, con una concentrazione maggiore verso il lato freddo del canale. I risultati sono stati analizzati mediante DDM; per comodità di analisi è stato scelto di dividere il canale in tre regioni: quella calda, quella centrale e quella fredda. I filmati acquisiti partono da una condizione di concentrazione uniforme, subito dopo aver acceso il gradiente termico, fino ad arrivare alla condizione di equilibrio in cui si ha un gradiente di concentrazione stazionario; successivamente viene rimosso il gradiente termico e si osserva

il moto diffusivo delle particelle che tendono a tornare alla condizione iniziale. A bassi

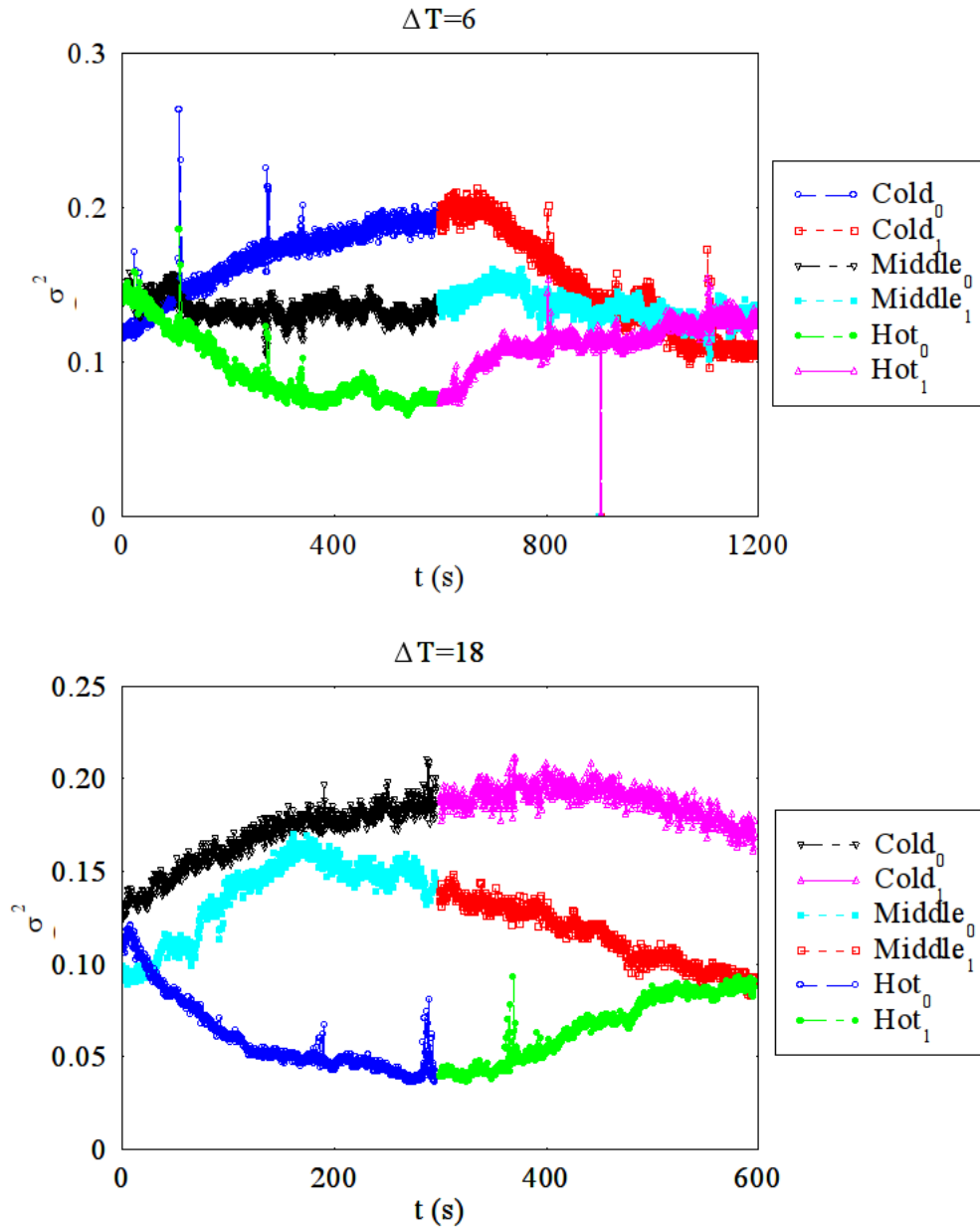


Figura 4.19: Grafici della concentrazione di particelle di PS in diverse zone del canale centrale. Nel pannello superiore la differenza di temperatura tra i canali è di 6 °C, nel secondo è di 18 °C. La prima metà di ciascun grafico mostra la variazione di concentrazione nel canale per via della termoforesi, mentre la seconda metà mostra il comportamento delle particelle una volta annullato il gradiente di temperatura, quindi la variazione è dovuta ad un moto diffusivo. Nella seconda immagine si nota come la varianza totale aumenti per via delle particelle spostate dai moti convettivi nel canale.

gradienti di temperatura, indicativamente sotto i 10 °C, il comportamento atteso viene osservato senza difficoltà. Infatti nel pannello superiore di Fig. 4.19 si può osservare

come, nell'intervallo di tempo tra 0 e 600 s, la concentrazione aumenti nel lato caldo e diminuisca in quello freddo, per poi tornare alle condizioni iniziali tra 600 e 1200 s. Con differenze di temperatura tra i canali laterali più elevate si osserva nella fase di ritorno delle particelle, ossia una volta annullato il gradiente termico, un aumento della varianza totale delle immagini, e quindi del numero totale di particelle presenti. Infatti, come mostrato in Fig. 4.19 nel pannello inferiore, la concentrazione nel lato freddo sembra aumentare ancora tra 600 e 1200 s. Una possibile spiegazione a questo fatto può essere trovata nella nascita di moti convettivi indotti dalla grande differenza di temperatura, che portano ad una variazione della concentrazione anche lungo la direzione verticale. Per questo motivo lo stato di equilibrio iniziale non è ancora ristabilito al termine del filmato perché il gradiente di concentrazione è molto più marcato e le particelle si muovono coi tempi caratteristici della diffusione, quindi impiegano più tempo a ristabilire la condizione iniziale

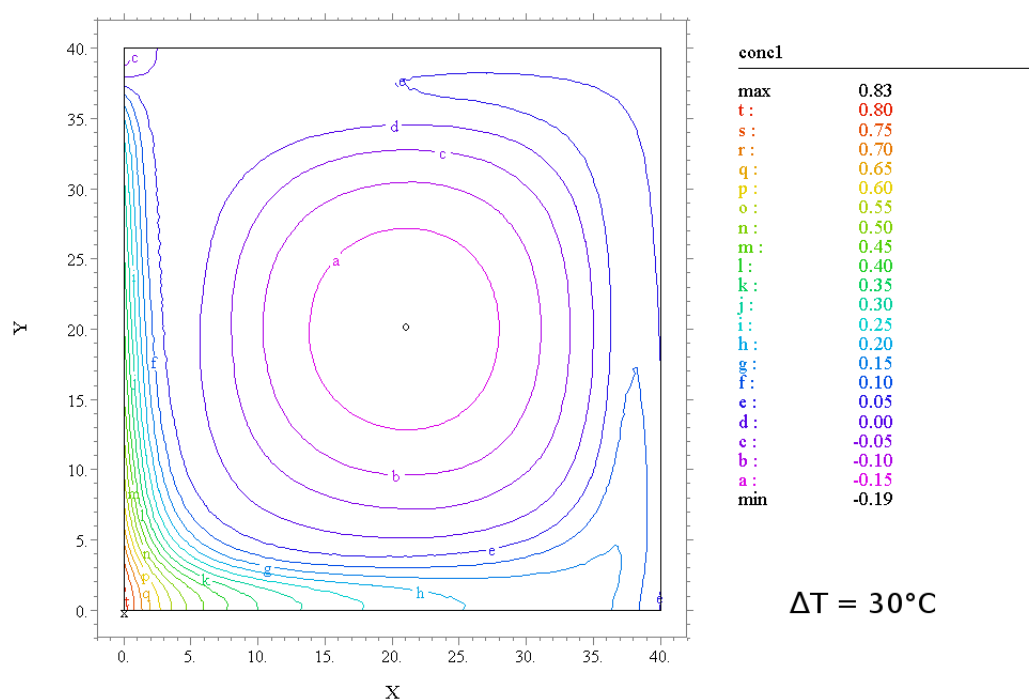


Figura 4.20: Risultato della simulazione della concentrazione nel canale, con ΔT di 30°C . Si vede come la concentrazione sia maggiore sul fondo del canale.

L'ipotesi dell'esistenza di moti convettivi, che compaiono in presenza di differenze di temperatura elevate ai lati del canale, è stata verificata attraverso simulazioni numeriche

e sperimentalmente tramite una scansione della concentrazione sull'asse verticale. Le simulazioni sono state effettuate dal gruppo di Soft Matter e mostrano un moto dovuto alla termoforesi e uno causato dalla presenza di convezione all'interno del canale, che risultano, come riportato in Fig. 4.20, in un accumulo di particelle sul fondo del canale, dal lato freddo. Le misure di scansione verticale, effettuate misurando la concentrazione su piani orizzontali a diversi fuochi, ossia a diverse profondità, hanno poi confermato i risultati delle simulazioni verificando che, in presenza di gradienti termici elevati, le particelle tendono effettivamente ad accumularsi sul fondo del canale, naturalmente dal lato freddo per via della termoforesi. L'effetto è evidente in Fig. 4.21, dove si osserva a sinistra un piano nella parte superiore del canale, dove la concentrazione di particelle è quasi nulla, e a destra un piano nella parte inferiore, dove il numero di particelle presenti è molto maggiore e si nota l'accumulo sul lato freddo (sulla destra del canale). Questo non accade in assenza di gradiente di temperatura, quindi non si tratta di un effetto di sedimentazione, bensì del risultato di moti convettivi che si stabiliscono nel canale centrale.

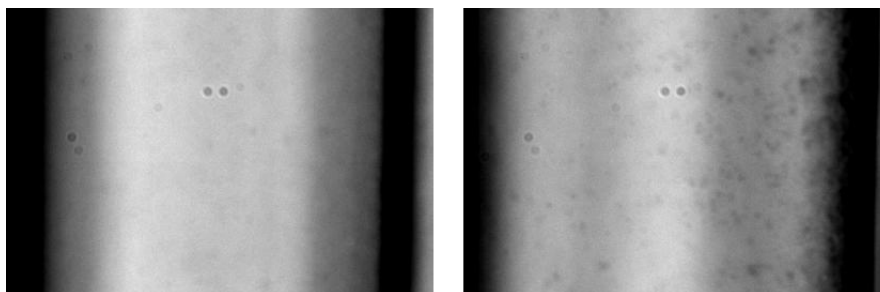


Figura 4.21: Immagini della concentrazione nel canale centrale a diverse profondità, con ΔT di $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, l'immagine a sinistra è presa nella parte superiore del canale, quella di destra nella parte inferiore. Si vede come la concentrazione, dato il gradiente elevato, sia molto maggiore nella zona vicino al fondo del canale.

Per avere una visualizzazione più precisa ed immediata della concentrazione delle particelle di PS nel canale, sono state prodotte immagini, per le diverse intensità dei gradienti termici, che mostrano la variazione della concentrazione lungo la direzione del gradiente termico e nel tempo sugli assi verticale ed orizzontale rispettivamente. Le immagini sono state ottenute calcolando prima la varianza su dieci fotogrammi per volta per produrre una sequenza di fotogrammi che contenessero le varianze di ciascun pixel,

e poi mediando lungo l'asse parallelo alla direzione del canale la varianza dei pixel di ciascun fotogramma ottenuto, per ottenere da ognuno di essi una “fetta” corrispondente alla concentrazione media lungo la larghezza del canale nell'istante di tempo relativo a quel fotogramma. Queste “fette” sono state poi accostate per costruire l'immagine finale (Figg. 4.22 e 4.23 per 6 e 30 °C di differenza tra i canali rispettivamente). In entrambe le

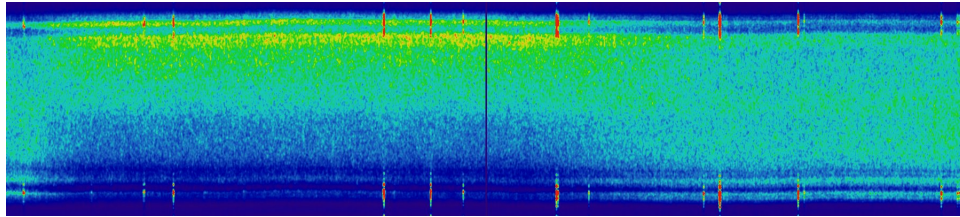


Figura 4.22: *Mappa dell'evoluzione temporale (asse orizzontale) della concentrazione di PS nel canale centrale (asse verticale), nel caso in cui la differenza di temperatura tra i canali laterali è di 6 °C.*

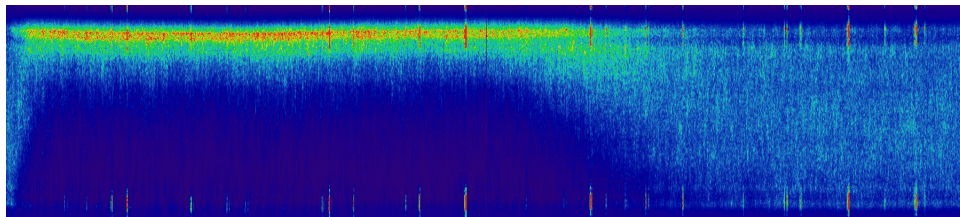


Figura 4.23: *Mappa dell'evoluzione temporale (asse orizzontale) della concentrazione di PS nel canale centrale (asse verticale), nel caso in cui la differenza di temperatura tra i canali laterali è di 30 °C.*

immagini è chiaramente visibile la variazione di concentrazione, tuttavia in quella relativa alla misura con differenza di temperatura di 30 °C (Fig. 4.23) l'effetto è molto maggiore e permette quindi di avere una separazione più efficiente. Per mostrare con ulteriore chiarezza i risultati ottenuti, in Fig. 4.24 è possibile vedere il profilo di concentrazione lungo una sezione del canale in un istante in cui il gradiente termico era attivo (pannello superiore) e in uno in cui era spento (pannello inferiore). Questo dato è stato estratto dalla Fig. 4.23, valutando i dati ottenuti lungo due linee verticali (ossia due diversi istanti temporali); nella prima immagine la variazione della concentrazione è ben visibile, mentre nella seconda non si apprezzano variazioni significative all'interno del canale. In Fig. 4.25 è mostrata invece l'evoluzione temporale della concentrazione, sempre estratta dalla Fig. 4.23 ma lungo una linea orizzontale, nella zona calda (pannello superiore) e in quella

fredda (pannello inferiore). Come previsto nella prima la concentrazione è bassa quando è attivo il gradiente e aumenta in seguito, mentre nella seconda il comportamento è opposto. Entrambe si assestano sullo stesso valore nella seconda metà delle immagini.

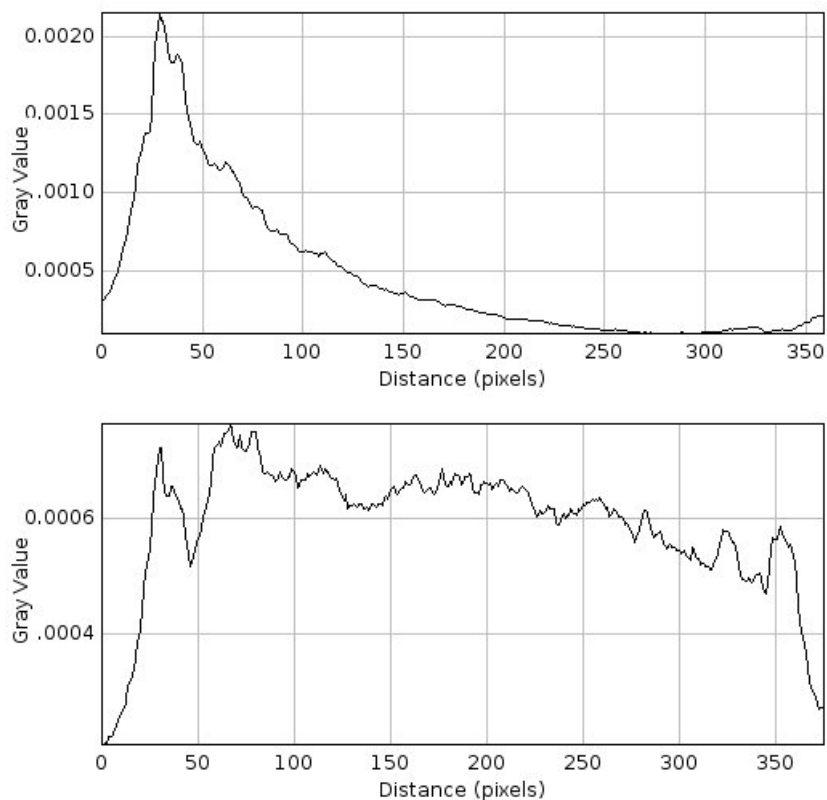


Figura 4.24: *Andamento della concentrazione lungo la sezione del canale centrale con gradiente termico di 30°C nel pannello superiore, in quello inferiore il grafico analogo in assenza di gradiente termico, entrambi calcolati dalla Fig. 4.23.*

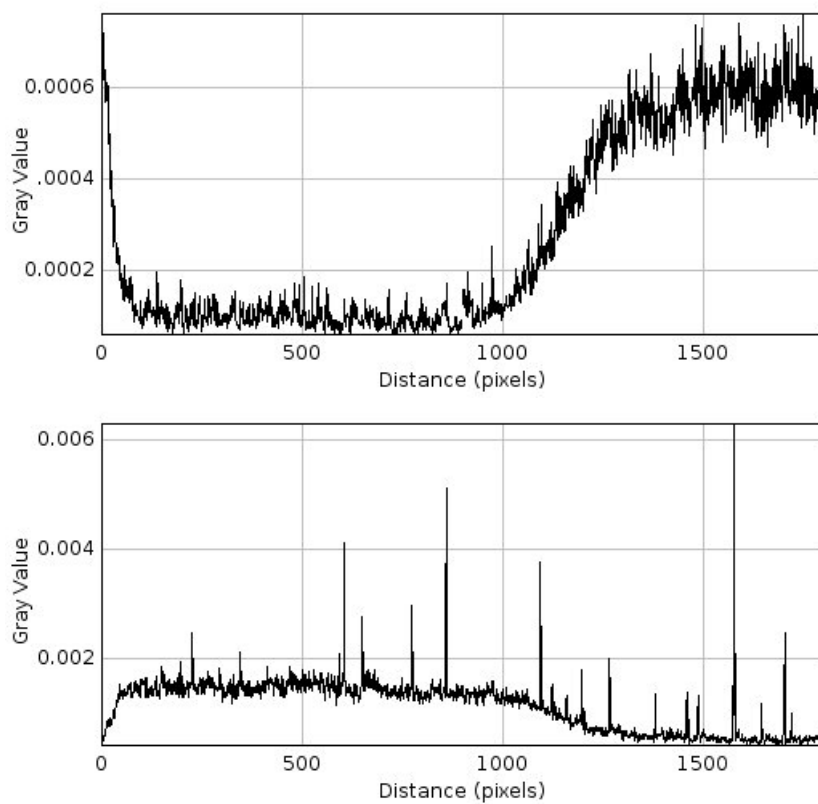


Figura 4.25: *Andamento della concentrazione nel canale centrale verso il lato caldo nel pannello superiore e verso il lato freddo in quello inferiore, in funzione del tempo, calcolati dalla Fig. 4.23.*

4.6.3 Conclusioni e criticità dei dispositivi fluidici per termoforesi realizzati

Questi dispositivi, in cui il gradiente di temperatura è realizzato utilizzando acqua in flusso a diverse temperature nei canali laterali, hanno permesso di osservare con successo il fenomeno della termoforesi all'interno del canale centrale e di eseguire misure di concentrazione mediante DDM anche con gradienti termici molto elevati, cosa difficilmente realizzabile in dispositivi in PDMS.

Tuttavia il controllo della temperatura nei canali risulta essere ancora problematico. Innanzitutto è complesso ottenere una misura affidabile della temperatura dei liquidi al loro interno. Inoltre per imporre esattamente la temperatura desiderata in ciascun canale bisognerebbe riuscire a misurare o calcolare con maggior precisione quale sia lo scarto tra quella sulle celle Peltier e quella nei canali, visto che il controllo è operato sulle celle. Un controllo retroazionato risulterebbe macchinoso da implementare, perché sarebbe necessario misurare continuamente la temperatura dei canali laterali facendo passare al loro interno, anziché acqua, soluzione fluorescente, e bisognerebbe illuminare con la lampada a mercurio ad ampio spettro e filtrare il segnale, rendendo impossibile una misura contemporanea di concentrazione sul canale centrale. Inoltre i limiti imposti dalle pompe a siringa, dalla resistenza meccanica delle siringhe e dalla tenuta delle connessioni fluidiche impedisce di variare a piacimento la portata nei canali laterali.

Queste limitazioni potrebbero essere in parte superate mediante alcuni accorgimenti. Ad esempio per misurare la temperatura con maggiore accuratezza, è stato proposto l'utilizzo della tecnica FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging), che sfrutta la dipendenza del tempo di vita di fluorescenza dei fluorofori dalla temperatura [35]. Per diminuire la resistenza fluidica del circuito potrebbero essere utilizzati tubi di diametro maggiore; anche se questo costringerebbe all'utilizzo di chip di vetro di maggior spessore rispetto a quelli utilizzati durante questo lavoro di tesi, e potrebbe creare qualche difficoltà per la necessità di irraggiare i canali più in profondità, dove la macchia focale del laser è soggetta ad aberrazioni più consistenti. A questo approccio è stato quindi attualmente preferito il progetto di un dispositivo dal design differente, che verrà illustrato in dettaglio nel prossimo capitolo e che promette di migliorare notevolmente le prestazioni.

Capitolo 5

Prototipo del dispositivo con sorgenti termiche a stato solido

Le difficoltà tecniche mostrate durante gli esperimenti di caratterizzazione del dispositivo di misure di termoforesi sono dovute non tanto alla realizzazione, quanto alla complessità di gestione introdotta dal circuito fluidico esterno di riscaldamento dell'acqua nelle camere laterali. Per questo motivo, anche se il dispositivo ha funzionato con successo, è nata l'idea di provare a realizzare un nuovo dispositivo che rispondesse agli stessi requisiti generali, ma che potesse fare a meno delle due camere attraverso cui fluisce acqua a diverse temperature per realizzare il gradiente di temperatura nel canale centrale.

I requisiti del dispositivo sono i medesimi descritti nel capitolo precedente: è necessario avere un canale a sezione quadrata o rettangolare, ai cui lati si trovino due sorgenti termiche uniformi poste a due diverse temperature. Per quanto riguarda il canale centrale, non è nata l'esigenza di apportare variazioni alla sua geometria, in quanto tutte le sue criticità sono state risolte tramite annealing termico. Al posto dei canali laterali invece si è deciso di inserire nel chip dei contatti metallici che facciano da conduttori termici. Per realizzarli sono stati fabbricati due reservoir con una superficie scoperta, contenenti un metallo su cui possano essere appoggiate direttamente le celle Peltier, in modo che il esso si porti tutto alla temperatura desiderata. Questi reservoir avrebbero le pareti rivolte verso il canale centrale a breve distanza da esso, in modo da creare il gradiente termico uniforme desiderato. Lo schema di principio del dispositivo è illustrato

nel disegno di Fig. 5.1.

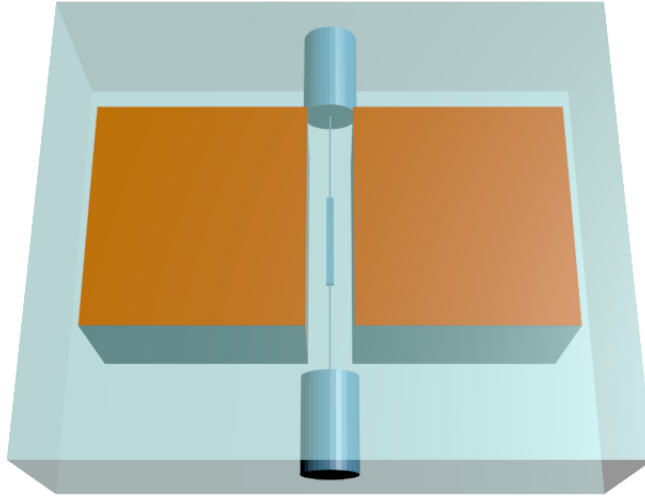


Figura 5.1: *Schema tridimensionale che illustra l'idea alla base del progetto di un dispositivo detto a stato solido, in quanto le sorgenti termiche sono realizzate tramite contatti metallici e non con fluidi che scorrono a diverse temperature. Due reservoir riempiti di metallo sono posti ai lati del canale centrale, sopra di essi verranno appoggiate le celle Peltier per portarle alla temperatura desiderata e imporre il gradiente termico nel canale.*

5.1 Progetto del dispositivo

A partire dall'idea di sostituire i canali laterali con due reservoir riempiti di metallo, è stato progettato un primo prototipo di dispositivo allo scopo di verificare che si possa effettivamente ottenere termoforesi all'interno di simile sistema.

La prima questione da affrontare è legata alle dimensioni dei diversi elementi del dispositivo, infatti il canale centrale deve essere lungo 3 mm, per garantire che la sua sezione rimanga sufficientemente uniforme dove è presente la zona centrale di misura. Le più piccole celle Peltier attualmente a disposizione del laboratorio di caratterizzazione hanno le superfici superiore e inferiore, dove avviene lo scambio termico, con la forma di un quadrato di 5 mm di lato. Pertanto si è reso necessario avere un chip con due reservoir di quella dimensione, e un restringimento centrale per il canale, come mostrato dal modello tridimensionale in Fig. 5.3.

Il secondo problema riguarda la visibilità del canale centrale: se i due reservoir sono molto vicini al canale centrale e le superfici laterali che si affacciano sul canale arrivano fino alla superficie superiore del chip, l'apertura numerica non sarà sufficiente perché l'obiettivo utilizzato, con ingrandimento 50x e apertura numerica 0.5, riesca a raccogliere tutta la luce necessaria per osservare il canale centrale, come illustrato in Fig. 5.2. Per contro, il canale centrale non può essere posto troppo vicino alla superficie perché i

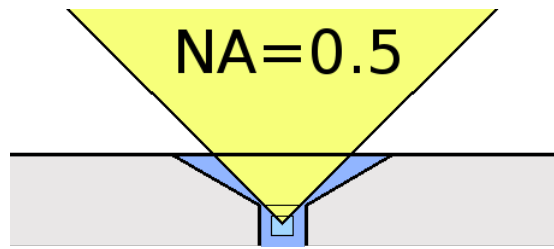


Figura 5.2: Schema che illustra il problema dell'apertura numerica necessaria per osservare il canale del dispositivo a stato solido con l'obiettivo del microscopio, l'obiettivo utilizzato ha $NA=0.5$, e il cono di visione consentito dal dispositivo deve essere maggiore di quello necessario all'obiettivo.

pozzetti, che hanno sezione molto maggiore del canale e arriverebbero alla superficie del substrato di fused silica utilizzato che ha 1 mm di spessore. Le due soluzioni possibili consistono nel variare la profondità di fabbricazione del canale in modo che la zona centrale risulti più alta dei pozzetti e quindi abbastanza vicina alla superficie, oppure seppellire la parte dei reservoir vicina al canale affinché non arrivino fino alla superficie. È stata scelta la seconda soluzione poiché si preferisce mantenere dritto il canale per garantire la massima stabilità del campione al suo interno, visto che le misure di termoforesi che si vogliono attualmente realizzare sono statiche, ossia a campione fermo. Un tratto di canale verticale potrebbe quindi favorire il moto al suo interno, oltre alla nascita di fenomeni convettivi una volta acceso il gradiente termico. Pertanto è stato preferito aggiungere ai reservoir scoperti delle camere che si inseriscono sotto la superficie del dispositivo e si avvicinano al canale (Fig. 5.3). Per garantire un'inclinazione della superficie superiore tale da garantire un'apertura numerica superiore a quella dell'obiettivo, tenendo conto del consumo di materiale dovuto all'immersione in acido, le camere sepolte devono essere lunghe 3 mm ciascuna.

Per permettere la retroazione dei controllori PID che determinano la corrente da far

scorrere nelle celle Peltier per portarle e mantenerle alla temperatura desiderata, è stato necessario prevedere dei punti dove potesse essere appoggiato un termistore che misurasse la temperatura del metallo all'interno dei reservoir. A questo scopo sono stati aggiunti dei fori quadrati di 1 mm di lato sulla superficie inferiore di ciascun reservoir per permettere di appoggiare i termistori riducendo al minimo la superficie di metallo esposta all'aria, allo scopo di evitare di dissipare calore.

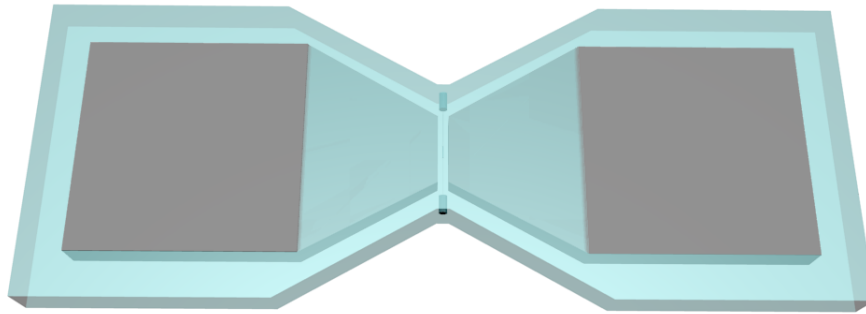


Figura 5.3: *Schema 3D del progetto per il primo prototipo di dispositivo a stato solido realizzato. I reservoir laterali da riempire di metallo sono parzialmente sepolti nella zona vicino al canale per aumentare l'apertura numerica. Sulla superficie inferiore sono praticati due fori di accesso per i termistori (non visibili in figura).*

5.2 Scelta della lega metallica

Per riempire i reservoir sono stati presi in considerazione diversi materiali: i principali aspetti critici sono la temperatura di fusione, l'adesione al vetro e la capacità di riempire dettagli molto piccoli (bagnabilità). Fin dall'inizio sono stati scartati le resine epossidiche e gli inchiostri metallici, perché, sebbene il loro inserimento sia molto agevole, la loro conduttività termica è molto bassa rispetto a quella della maggior parte dei metalli. Inoltre la loro densità, una volta solidificati, non è uniforme e potrebbe portare a disomogeneità nel gradiente termico indotto. È stata quindi cercata una lega metallica che fondesse a temperatura sufficientemente bassa (sotto i 200 °C) in modo da poter essere sciolta sulle piastre elettriche presenti in laboratorio e inserita nei reservoir senza bisogno di apparecchiature particolari; le leghe con questa proprietà sono comunemente dette *leghe bassofondenti* e sono a base di piombo, stagno, indio, bismuto e cadmio. I produttori di

queste leghe generalmente non si interessano alla loro applicazione in dispositivi in vetro di piccole dimensioni, quindi non è facile reperire dati sulla loro bagnabilità verso questo materiale ed è stato necessario testarle all'interno di chip fabbricati appositamente. Pertanto sono stati realizzati, tramite la tecnica FLICE, alcuni chip di test con strutture simili per dimensioni a quelle presenti nel progetto del dispositivo a stato solido, costituite da un reservoir a parallelepipedo e una camera sepolta, come se fosse uno solo dei due reservoir laterali del dispositivo finale, con a fianco un canale. Questo è stato inserito per sfruttare la fabbricazione di questi chip per testare i tempi di etching dei reservoir e del canale contemporaneamente prima della produzione del dispositivo definitivo. I materiali testati sono quelli elencati in Tab. 5.1, si può vedere come la temperatura della piastra su cui sono state testate sia sempre superiore alla temperatura di fusione della lega, perché la stanza in cui viene effettuata la prova è sempre a temperatura ambiente e sia la piastra sia il chip scambiano calore con essa.

Molte leghe si sono rivelate inadatte allo scopo: ad esempio la prima, la lega stagno-piombo da saldatura, tende a disporsi a goccia nel reservoir, appena giunta alla temperatura di fusione. Altre prendono la forma della camera da riempire applicando pressione dall'alto, ma faticano a riempire gli spazi più piccoli come le estremità della camera sepolta, come visibile in Fig. 5.4.

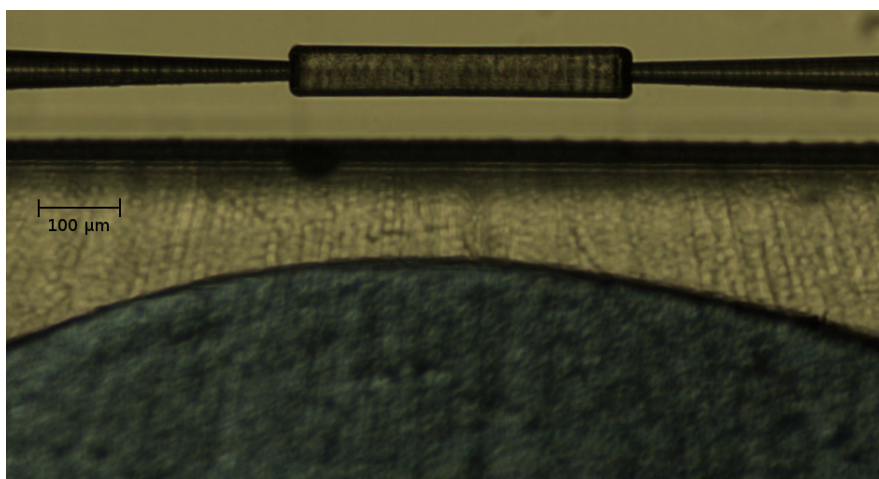


Figura 5.4: *Prova di inserimento di indio in un reservoir, il metallo non riesce a raggiungere il bordo della camera sepolta.*

L'ultima lega testata ha mostrato di essere la più adatta per l'inserimento all'interno

Lega	Composizione	Temperatura di fusione dichiarata [°C]	Temperatura piastra utilizzata [°C]	Comportamento
Stagno-Piombo da saldatura	Sn, Pb	n.d.	150	rimane a goccia e non bagna assolutamente le pareti di vetro
Indio puro	In	157	200	bagna le pareti a fatica, solo se viene applicata pressione
BiIn32	32% In, 68% Bi	110	150	bagna le pareti a fatica, solo se viene applicata pressione
FA6	42% Sn, 58% Bi	138	170	bagna le pareti a fatica, solo se viene applicata pressione
FA6mod	47% Sn, 53% Bi	150	200	bagna le pareti a fatica, solo se viene applicata pressione
L33124	33% Sn, 12% Bi, 4% Sb, 51% Pb	200	250	bagna abbastanza bene le pareti, mantiene la forma che viene data, non riempie spontaneamente tutti i vuoti

Tabella 5.1: *In tabella sono confrontate le diverse leghe metalliche testate.*

dei reservoir del dispositivo, infatti le prove hanno dimostrato che è in grado di riempire tutto il reservoir e aderire alla parete che si affaccia sul canale. Tuttavia anche questa lega necessita che venga applicata pressione sulla sua superficie per riempire bene tutti i vuoti del reservoir. Sebbene un materiale che riempia con precisione senza pressione gli spazi sepolti nel vetro sia desiderabile, si è deciso di realizzare con essa il primo prototipo del dispositivo. Il lavoro futuro prevede di continuare la ricerca di una tecnologia più efficiente nel caso in cui i primi esperimenti con questo dispositivo diano buoni risultati, tali da giustificare la prosecuzione delle fabbricazioni in questa direzione.

5.3 Realizzazione del dispositivo

La fabbricazione, come già detto, viene sempre fatta tramite la tecnica FLICE e il primo passaggio, l'irraggiamento del dispositivo, è stato effettuato con i medesimi parametri usati per il dispositivo fluidico descritto nel capitolo precedente. Vista la grande differenza tra le dimensioni del canale e quelle dei reservoir, sono stati adottati alcuni accorgimenti per ottimizzare e rendere più rapida l'erosione dei reservoir, in modo da evitare che il canale perda la forma rettangolare uniforme e i suoi pozzetti diventino troppo larghi. Siccome il tempo necessario per svuotare i pozzetti è superiore a quello che era sufficiente nel dispositivo fluidico per svuotare le camere dei canali, la dimensione dei pozzetti è stata ridotta perché superi di poco quella dei tubi una volta trascorso il tempo necessario a svuotare i reservoir. Le pareti dei reservoir sono state realizzate irraggiando linee parallele distanti $20\ \mu\text{m}$ dove era possibile l'accesso dell'acido direttamente dalla superficie del chip, mentre le linee della camera sepolta sono state scritte a $10\ \mu\text{m}$ di distanza l'una dall'altra, perché l'accesso dell'acido è più difficoltoso e si rende necessario favorirlo.

I reservoir sono stati divisi in diverse sezioni separate da muri, come si può vedere in Fig. 5.5, per permettere all'acido di entrare da più punti, allo scopo di ridurre il tempo di erosione e facilitare l'uscita di pezzi di fused silica di grosse dimensione dalla zona sepolta.

Una volta terminata la fabbricazione e sottoposto il dispositivo al trattamento di annealing termico per ridurre la rugosità della superficie del canale, si è proceduto all'in-

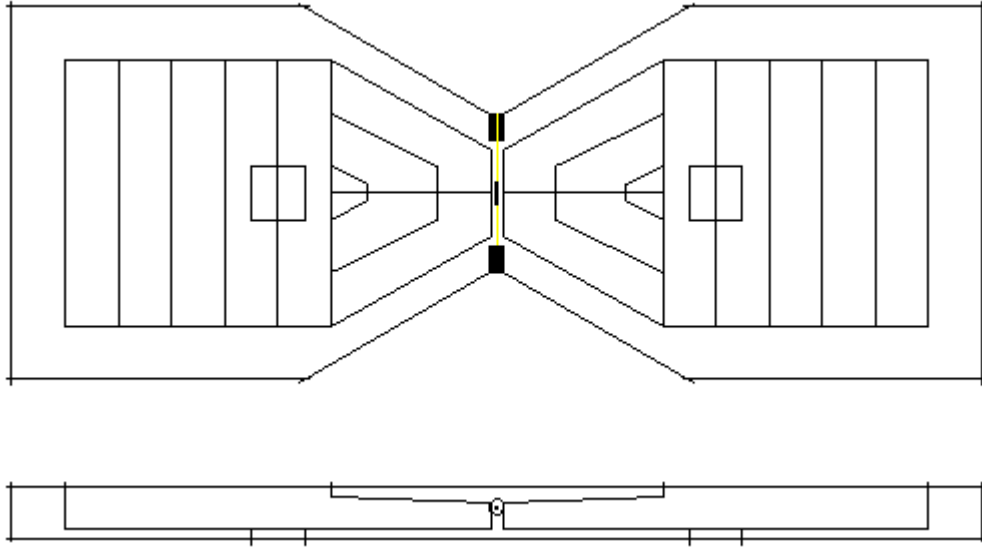


Figura 5.5: *Progetto per la scrittura del prototipo di dispositivo a stato solido, vista dall'alto e vista di fronte. I reservoir sono divisi in segmenti per favorire l'ingresso dell'acido, velocizzare l'erosione e facilitare la fuoriuscita dei pezzi di vetro.*

serimento del metallo nei reservoir laterali. Per questa operazione il dispositivo è stato posto sulla piastra elettrica a disposizione del laboratorio, che è stata portata alla temperatura di 250 °C. Il chip è stato appoggiato sulla piastra ancora fredda, per riscaldarlo gradualmente ed evitare un eventuale rottura delle pareti più sottili per via dello shock termico. La lega utilizzata è stata prima ridotta ad un foglio sottile facendola fondere su un foglio di carta oleata posto sulla piastra, utilizzato per non fare aderire il metallo alla superficie della piastra. In questo modo è stato possibile staccarne agevolmente dei frammenti da inserire nei reservoir. Una volta che questi si sono fusi è stata applicata pressione sulla superficie del metallo per spingerlo all'interno della zona sepolta del reservoir, fino a che questo ha raggiunto la superficie che si affaccia sul canale; il risultato è mostrato in Fig. 5.6, dove si osservano il canale centrale e le pareti ad esso parallele prima (a sinistra) e dopo (a destra) l'inserimento della lega.

Il dispositivo è stato poi connettorizzato con tubi in PEEK, inseriti e incollati nei pozzetti del canale, con il medesimo procedimento utilizzato per i dispositivi fluidici e descritto nel capitolo 3.

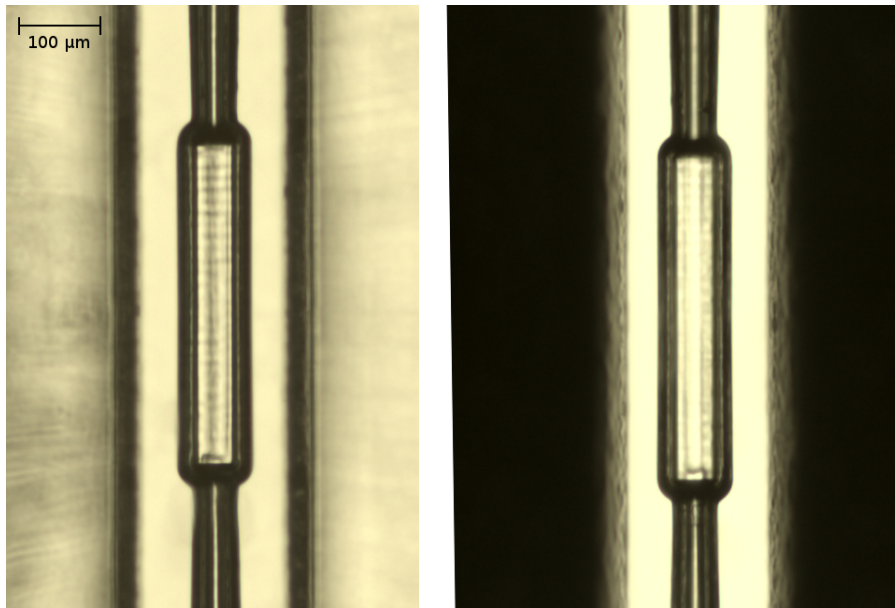


Figura 5.6: Immagini del canale del dispositivo e di una porzione della camera sepolta prima (a sinistra) e dopo (a destra) l'inserimento del metallo. Si può notare come il metallo aderisca bene a tutta la superficie affacciata sul canale.

5.4 Montaggio sul setup di caratterizzazione

Per procedere alle prime misure di caratterizzazione, è stato necessario montare il dispositivo con le superfici dei contatti metallici a contatto con due celle Peltier, che a loro volta scambiano calore con una piastra di rame, e con due termistori, appoggiati sui fori appositamente praticati sull'altro lato.

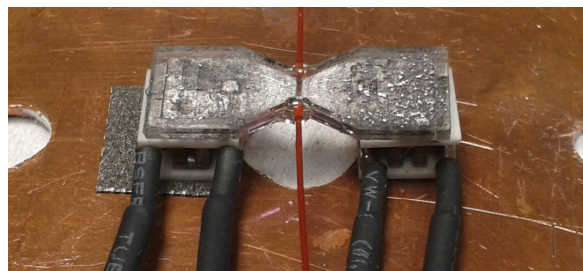


Figura 5.7: Fotografia del dispositivo a stato solido montato sopra le celle Peltier. Il dispositivo è fissato con del nastro termoconduttivo alle celle Peltier che, a loro volta, sono attaccate allo stesso modo ad una piastra metallica. Sulla faccia superiore del chip si notano i fori praticati per avere il contatto termico con i termistori.

La piastra utilizzata ha un foro centrale circolare del diametro di 6 mm per consentire alla luce che attraversa il canale di raggiungere l'obiettivo del microscopio. Le celle

Peltier, che hanno superfici quadrate di 5 mm di lato, sono attaccate da un lato alla piastra e dall'altro al chip tramite nastro adesivo termoconduttivo, come mostrato in Fig. 5.7. Il chip è quindi montato con la superficie dei reservoir riempiti di metallo rivolta verso il basso. I fili dei termistori sono stati prima incollati, con la stessa colla con cui sono stati fissati i tubi, alla superficie superiore del dispositivo perché non potessero muoversi. Successivamente la testa di misurazione di ciascun termistore è stata messa a contatto con il metallo che fuoriesce dal foro apposito utilizzando della pasta termoconduttiva (Fig. 5.8). La piastra metallica è stata quindi montata sul piatto del microscopio a fluorescenza

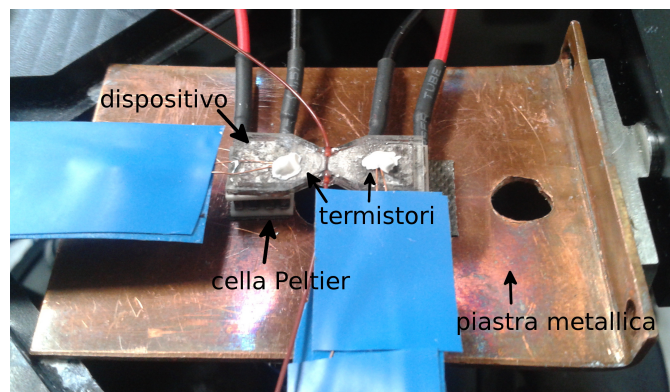


Figura 5.8: *Fotografia del dispositivo a stato solido montato sul piatto del microscopio. Si possono vedere la cella Peltier e i termistori fissati al chip, e la piastra metallica su cui poggiano le celle Peltier e che è bloccata sul piatto del microscopio.*

per effettuare i primi test di funzionamento. Anche in questo caso lo scambio di calore tra la piastra metallica e il piatto del microscopio è stato favorito con pasta termoconduttiva spalmata nei punti di contatto.

5.5 Validazione del dispositivo

Il dispositivo, dopo essere stato montato come descritto nella sezione precedente, è stato testato realizzando esperimenti preliminari volti a verificarne il corretto funzionamento. Per fare ciò sono stati imposti diversi gradienti di temperatura, con 10, 20 e 30 °C di differenza tra i contatti metallici, ed è stato osservato il comportamento di particelle di 240 e 500 nm di diametro inserite nel canale centrale. La Fig. 5.9 mostra il canale del dispositivo in cui sono state inserite particelle di PS da 500 nm di diametro, che possono essere distinte al microscopio a patto di uscire dalla condizione di illuminazione di Kohler.

L'immagine di sinistra è stata catturata prima che venisse applicato il gradiente termico e presenta concentrazione uniforme. In quella di destra invece, che è stata acquisita con 30 °C di differenza tra i contatti termici, si può osservare come la concentrazione di particelle sia chiaramente maggiore sul lato sinistro, quello freddo, e minore su quello destro, caldo. È possibile notare che l'effetto di separazione sembra essere meno efficiente rispetto al caso del dispositivo con sorgenti termiche fluidiche. Questo risultato merita un'indagine più approfondita, tuttavia delle possibili spiegazioni possono essere la diversa distanza del canale dalle pareti e la maggiore concentrazione di particelle.

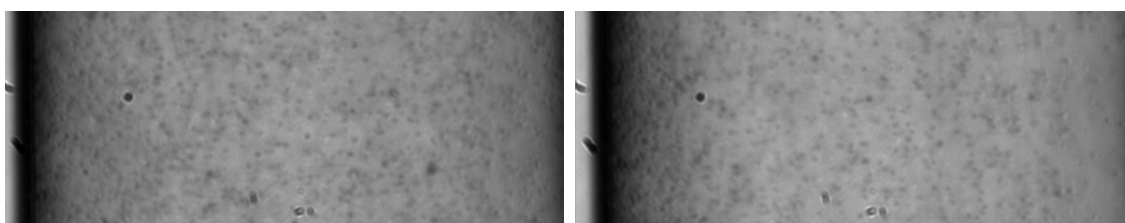


Figura 5.9: *Immagine al microscopio di particelle da 500 nm nel canale del dispositivo a stato solido. A sinistra è mostrato il canale in assenza di gradiente termico, a destra è visibile il canale quando è imposta una differenza di temperatura di 30°C tra i reservoir riempiti di metallo. Nel canale di destra è possibile notare che la concentrazione è maggiore sul lato sinistro e minore su quello destro.*

Per osservare l'effetto della termoforesi su particelle di dimensione ancora minore, e soprattutto per poter estrarre informazioni quantitative, è necessario analizzare le immagini utilizzando la tecnica DDM. In Fig. 5.10 si può vedere, nel pannello superiore, una mappa della concentrazione estratta mediante DDM in una porzione del canale, riempito con particelle di 240 nm di diametro e con 10 °C di differenza tra le temperature imposte nei reservoir. Dall'immagine in falsi colori si riconosce chiaramente un gradiente di concentrazione, più intenso verso il lato freddo, a sinistra. Nel pannello inferiore di Fig. 5.10 è riportata in un grafico la concentrazione mediata lungo la direzione verticale dell'immagine in funzione della coordinata orizzontale, ossia della direzione lungo cui è stabilito il gradiente.

Con queste misure è stato provato l'effettivo funzionamento del dispositivo a stato solido, inoltre sono stati riscontrati diversi vantaggi rispetto a quello precedente, che utilizzava acqua in flusso a due diverse temperature per generare il gradiente termico. La risposta temporale del sistema è risultata migliore rispetto all'altro dispositivo, perché

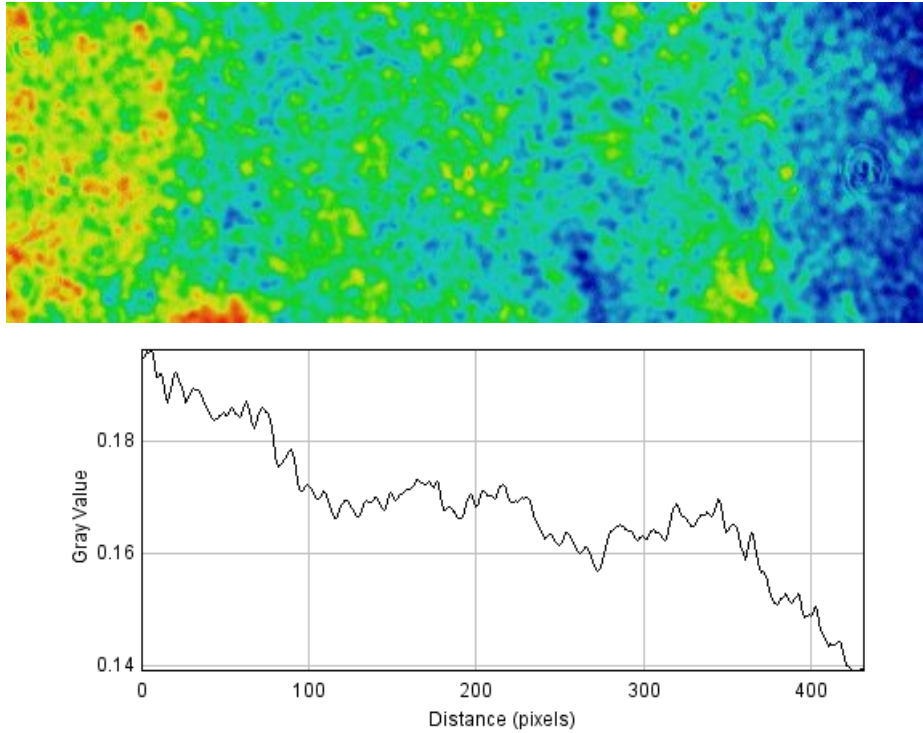


Figura 5.10: *Nel pannello superiore, mappa della concentrazione in una porzione del canale del dispositivo a stato solido ottenuta tramite DDM. In quello inferiore è riportata su un grafico la concentrazione media, in unità arbitrarie, relativa all'immagine del pannello superiore in funzione della coordinata orizzontale*

le celle Peltier di dimensione inferiore scambiano calore in maniera più efficiente con la piastra che le sostiene e necessitano di minore corrente per portarsi alla temperatura indicata. Inoltre le misure non risentono delle vibrazioni introdotte dalle pompe a siringa e delle variazioni della portata. L'eliminazione del circuito fluidico esterno ha anche portato ad una gestione pratica dell'esperimento molto più semplice, perché ha evitato del tutto i problemi della regolazione delle portate e della caduta di temperatura nei tubi tra le celle Peltier e il chip, e la necessità di avere siringhe abbastanza capienti da contenere acqua per tutta la durata della misura.

Conclusioni

Lo scopo di questo lavoro di tesi era la fabbricazione di dispositivi microfluidici per esperimenti di termoforesi. Per fare ciò era necessario riuscire ad ottenere un canale, in cui inserire il campione, ai cui lati fossero presenti due sorgenti di calore uniformi, poste a due diverse temperature. In questo modo sarebbe stato possibile instaurare un gradiente di temperatura all'interno del canale per compiere esperimenti di termoforesi sul campione.

Per questo motivo si è scelto di sviluppare un dispositivo con due canali posti ai lati di quello contenente il campione, in cui far fluire acqua a due temperature diverse. I canali laterali hanno quindi avuto la funzione di sorgenti di calore. L'uniformità delle sorgenti e quindi del gradiente è stata garantita controllando la forma dei canali in corrispondenza della zona dove vengono effettuate le misure. Questo dispositivo è stato caratterizzato per valutare l'effettiva presenza e l'intensità del gradiente di temperatura, e ha permesso di osservare lo spostamento di particelle di polistirene di diverse dimensioni e di valutare quantitativamente la loro concentrazione nel canale centrale grazie all'utilizzo della tecnica ottica nota come Differential Dynamic Microscopy (DDM). Durante le misure sono state notate alcune criticità legate al controllo della temperatura dell'acqua nei canali laterali e più in generale alla gestione del circuito fluidico esterno, che controlla il flusso e il riscaldamento dell'acqua che fluisce in quei canali.

Si è deciso quindi di sviluppare un nuovo prototipo con sorgenti di calore a stato solido, costituite da reservoir riempiti di metallo. I primi esperimenti hanno mostrato che anche in questo dispositivo si ottiene trasporto di massa per effetto della termoforesi; in seguito verrà effettuata una caratterizzazione più accurata per valutare le sue effettive prestazioni.

Sulla base dei risultati ottenuti si può senza dubbio affermare che la tecnica FLICE possiede tutte le caratteristiche necessarie per la realizzazione di tali dispositivi, perché permette di fabbricare strutture sepolte di dimensioni micrometriche in substrati di fused silica con grande controllo sulla loro geometria, e in tempi brevi. Proprio la rapidità di fabbricazione consente di realizzare diversi prototipi a seconda delle esigenze che nascono nel corso degli esperimenti.

A conclusione del lavoro fatto, si prevede in futuro di misurare con tecniche più precise la temperatura all'interno dei canali e di continuare la ricerca di una lega metallica o di una tecnica diversa che permettano di inserire agevolmente il metallo all'interno dei chip, in modo da produrre contatti termici con la geometria desiderata.

Una volta ottimizzate le tecniche costruttive e di caratterizzazione, potranno venire progettati dispositivi per eseguire esperimenti più complessi, come ad esempio la separazione in flusso di particelle, in modo da arrivare a Lab-On-Chip che permettano, oltre allo studio del fenomeno di base della termoforesi, anche la sua applicazione come strumento in altri campi di ricerca.

Bibliografia

- [1] Aigars Piruska, Irena Nikcevic, Se Hwan Lee, Chong Ahn, William R. Heineman, Patrick A. Limbach, and Carl J. Seliskar. The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation. *Lab Chip*, 5:1348–1354, 2005.
- [2] Rajendrani Mukhopadhyay. When pdms isn't the best. *Analytical Chemistry*, 79(9):3248–3253, 2007.
- [3] Gwo-Bin Lee, Shu-Hui Chen, Guan-Ruey Huang, Wang-Chou Sung, and Yen-Heng Lin. Microfabricated plastic chips by hot embossing methods and their applications for {DNA} separation and detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 75(1-2):142 – 148, 2001.
- [4] Jingdong Xu, Laurie Locascio, Michael Gaitan, and Cheng S. Lee. Room-temperature imprinting method for plastic microchannel fabrication. *Analytical Chemistry*, 72(8):1930–1933, 2000. PMID: 10784164.
- [5] D Jed Harrison, Karl Fluri, Kurt Seiler, Zhonghui Fan, Carlo S Effenhauser, Andreas Manz, et al. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 261:895–895, 1993.
- [6] Jatisai Tanyanyiwa, Eva M. Abad-Villar, and Peter C. Hauser. Contactless conductivity detection of selected organic ions in on-chip electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 25(6):903–908, 2004.
- [7] John P Murrehy, Michael C Breadmore, Aimin Tan, Mairead McEnery, John Alderman, Cian O'Mathuna, Alan P O'Neill, Peter O'Brien, Nebjosa Advoldvic, Paul R

- Haddad, and Jeremy D Glennon. Ion chromatography on-chip. *Journal of Chromatography A*, 924(1-2):233 – 238, 2001. jce:title;14th International Symposium on Microscale Separations and Analysis;ce:title;.
- [8] Andreas Lenshof and Thomas Laurell. Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. *Chemical Society Reviews*, 39(3):1203–1217, 2010.
- [9] Yong Jiang, Michael E. Miller, Marcia E. Hansen, Marcus N. Myers, and P.Stephen Williams. Fractionation and size analysis of magnetic particles using {FFF} and {SPLITT} technologies. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194(1-3):53 – 61, 1999.
- [10] Nicole Pamme and Andreas Manz. On-chip free-flow magnetophoresis: Continuous flow separation of magnetic particles and agglomerates. *Analytical Chemistry*, 76(24):7250–7256, 2004. PMID: 15595866.
- [11] Peter R. C. Gascoyne and Jody Vykoukal. Particle separation by dielectrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 23(13):1973–1983, 2002.
- [12] Unyoung Kim, Jiangrong Qian, Sophia A. Kenrick, Patrick S. Daugherty, and H. Tom Soh. Multitarget dielectrophoresis activated cell sorter. *Analytical Chemistry*, 80(22):8656–8661, 2008. PMID: 18939853.
- [13] Filip Petersson, Lena Aberg, Ann-Margret Sward-Nilsson, and Thomas Laurell. Free flow acoustophoresis: Microfluidic-based mode of particle and cell separation. *Analytical Chemistry*, 79:5117–5123, 2007.
- [14] Zhuochen Wang and Jiang Zhe. Recent advances in particle and droplet manipulation for lab-on-a-chip devices based on surface acoustic waves. *Lab Chip*, 11:1280–1285, 2011.
- [15] Masumi Yamada, Megumi Nakashima, and Minoru Seki. Pinched flow fractionation: Continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Analytical Chemistry*, 76(18):5465–5471, 2004. PMID: 15362908.

- [16] Mark M Wang, Eugene Tu, Daniel E Raymond, Joon Yang, Haichuan Zhang, Norbert Hagen, Bob Dees, Elinore M Mercer, Anita H Forster, and Ilona Kariv. Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. *Nature Biotechnology*, (1):83–87, 2004.
- [17] F. Bragheri, P. Minzioni, R. Martinez Vazquez, N. Bellini, P. Paie, C. Mondello, R. Ramponi, I. Cristiani, and R. Osellame. Optofluidic integrated cell sorter fabricated by femtosecond lasers. *Lab Chip*, 12:3779–3784, 2012.
- [18] R. Piazza and A. Parola. Thermophoresis in colloidal suspensions. *J. Phys.: Condens. Matter*, 20, 2008.
- [19] S. A Putnam and D. G. Cahill. Transport of nanoscale latex spheres in a temperature gradient. *Langmuir*, 21:5317–5323, 2005.
- [20] S. Wiegand. Thermal diffusion in liquid mixtures and polymer solutions. *J. Phys.: Condens. Matter*, 16:357–379, 2004.
- [21] D. Vigolo, R. Rusconi, H. A. Stone, and R. Piazza. Thermophoresis: microfluidics characterization and separation. *www.rsc.org/softmatter — Soft Matter*, 2010.
- [22] P. F. Geelhoed, R. Lindken, and J. Westerweel. Thermophoretic separation in microfluidics. *Chemical Engineering Research and Design*, 84:370–373, 2006.
- [23] K. M. Davis, Miura K., Sugimoto N., and K. Hirao. Writing waveguides in glass with a femtosecond laser. *Optics Letters*, 21:1729–1731, 1996.
- [24] A. Marcinkevičius, Juodkasis S., M. Watanabe, M. Miwa, S. Matsuo, H. Misawa, and J. Nishii. Femtosecond laser-assisted three-dimensional microfabrication in silica. *Optics Letters*, 26:277–279, 2001.
- [25] G. Della Valle, R Osellame, and P. Laporta. Micromachining of photonic devices by femtosecond laser pulses. *Journal of Optics A*, 11, 2009.
- [26] R. Osellame, H.J.W.M. Hoekstra, G. Cerullo, and Pollnau. Femtosecond laser microstructuring: an enabling tool for optofluidic lab-on-chips. *Laser & Photon. Rev.*, 5:442–463, 2011.

- [27] R. Taylor, Hnatovsky C., and E. Simova. Applications of femtosecond laser induced self-organized planar nanocracks inside fused silica glass. *Laser & Photon. Rev.*, 2:26–46, 2008.
- [28] C. Hnatovsky, R. S. Taylor, E. Simova, P. P. Rajeev, D. M. Rayner, V. R. Bhardwaj, and P. B. Corkum. Fabrication of microchannels in glass using focused femtosecond laser radiation and selective chemical etching. *Applied Physics A*, 84:47–61, 2006.
- [29] Soo Ho Kim, Jermim Noh, Min Ku Jeon, Ki Woong Kim, Luke P Lee, and Seong Ihl Woo. Micro-raman thermometry for measuring the temperature distribution inside the microchannel of a polymerase chain reaction chip. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(3):526, 2006.
- [30] Naoto Kakuta, Yuko Fukuhara, Katsuya Kondo, Hidenobu Arimoto, and Yukio Yamada. Temperature imaging of water in a microchannel using thermal sensitivity of near-infrared absorption. *Lab Chip*, 11:3479–3486, 2011.
- [31] Debaditya Choudhury, Daniel Jaque, Airan Rodenas, William T. Ramsay, Lynn Paterson, and Ajoy K. Kar. Quantum dot enabled thermal imaging of optofluidic devices. *Lab Chip*, 12:2414–2420, 2012.
- [32] David Ross, Michael Gaitan, and Laurie E. Locascio. Temperature measurement in microfluidic systems using a temperature-dependent fluorescent dye. *Analytical Chemistry*, 73(17):4117–4123, 2001.
- [33] Susanne Ebert, Kort Travis, Bryan Lincoln, and Jochen Guck. Fluorescence ratio thermometry in a microfluidic dual-beam laser trap. *Opt. Express*, 15(23):15493–15499, Nov 2007.
- [34] Roberto Cerbino and Veronique Trappe. Differential dynamic microscopy: Probing wave vector dependent dynamics with a microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 100:188102, May 2008.
- [35] Richard K. P. Benninger, Yasemin Koç, Oliver Hofmann, Jose Requejo-Isidro, Mark A. A. Neil, Paul M. W. French, and Andrew J. deMello. Quantitative 3D map-

ping of fluidic temperatures within microchannel networks using fluorescence lifetime imaging. *Analytical Chemistry*, 78(7):2272–2278, Apr 2006.

Per la realizzazione di questo lavoro di tesi, desidero senz'altro ringraziare la prof.ssa Roberta Ramponi, che mi ha permesso di svolgere questa esperienza nei laboratori del suo gruppo, e il dott. Roberto Osellame, che ha seguito con interesse e attenzione le diverse fasi del progetto in cui è inserito questo lavoro.

Un ringraziamento particolare va a tutte le persone con cui ho potuto collaborare per la realizzazione di questi esperimenti, prima di tutte Francesca, e poi tutti i membri del Soft Matter Lab guidato dal prof. Roberto Piazza, sempre competenti e accoglienti.

Inoltre ringrazio i colleghi del laboratorio, gli amici con cui ho condiviso questi anni di studi al Politecnico, e tutti quelli con cui invece ho avuto modo di dedicarmi ad altro.

Infine ringrazio la mia famiglia per la pazienza ed il supporto fino ad ora.