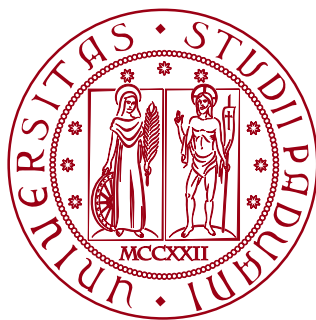




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Fabbricazione di dispositivi microfluidici
per generazione e manipolazione di gocce

Relatore
Prof. Giampaolo Mistura

Laureanda
Beatrice Crestani

Correlatore
Dr. Davide Ferraro

Anno Accademico 2019/2020

Abstract

La microfluidica a gocce sta vivendo un rapido sviluppo grazie alla sua capacità di isolare singole reazioni in volumi ridotti, aumentando così la velocità di analisi ed evitando lo spreco di risorse. In ambito biologico sono già ampiamente utilizzate microparticelle paramagnetiche per la manipolazione e l'estrazione di singole cellule, per la biopsia liquida. Ciò di cui si propone questa tesi è un studio preliminare finalizzato al riscaldamento di tali metodologie all'interno di chip, tramite la fabbricazione di dispositivi microfluidici per la generazione e la manipolazione di gocce.

L'elaborato parte dalla fase di progettazione e produzione dei dispositivi microfluidici, tramite tecniche di fotolitografia e Replica molding. Procede poi con una caratterizzazione delle dimensioni delle gocce, generate tramite un sistema di controllo a pressione. Si conferma in questa fase la crescita lineare del rapporto tra la lunghezza e la larghezza della goccia, in funzione del rapporto tra i flussi della fase dispersa e di quella continua. Viene caratterizzato il miscelamento delle diverse fasi componenti le gocce: fase acquosa e microparticelle paramagnetiche, che forniscono un supporto solido per un'ampia gamma di separazioni biomagnetiche e manipolazioni molecolari. Le gocce si miscelano completamente entro circa 40 *mm* dalla loro produzione, all'interno di un canale di sezione 200 μm per 300 μm . Si conclude con il set-up d'immissione e la successiva estrazione delle microparticelle paramagnetiche dalle gocce, tramite un campo magnetico generato da un magnete permanente. Per la buona riuscita dell'estrazione è necessario un elevato gradiente del campo, nei pressi del sito di estrazione.

Indice

1	Introduzione alla microfluidica a gocce	1
1.1	Produzione delle gocce	1
1.1.1	Co-flow	1
1.1.2	T-junction	2
1.1.3	Flow focusing	2
1.1.4	Scelta della geometria da utilizzare	2
1.2	Trasporto e mixing delle gocce	3
1.3	Utilizzo di microparticelle magnetiche	4
2	Tecniche di fabbricazione e caratterizzazione dei dispositivi microfluidici	5
2.1	Produzione del master	5
2.2	Produzione dei dispositivi microfluidici	5
2.3	Progetto dei dispositivi microfluidici	7
2.4	Caratterizzazione dei dispositivi microfluidici	8
3	Utilizzo dei dispositivi	9
3.1	Set-up sperimentale	9
3.2	Caratterizzazione delle dimensioni delle gocce in funzione delle pressioni d'iniezione	9
3.3	Caratterizzazione del miscelamento interno delle gocce	12
3.4	Sperimentazione con microparticelle paramagnetiche	14
3.4.1	Stima dei tempi di sedimentazione	14
3.4.2	Tecnica d'immissione	16
3.4.3	Produzione e miscelamento interno delle due fasi contenute nelle gocce	17
3.4.4	Estrazione delle microparticelle paramagnetiche	17
	Bibliografia	21

Capitolo 1

Introduzione alla microfluidica a gocce

La microfluidica permette la manipolazione di volumi molto ridotti di fluidi (da 10^{-9} a 10^{-18} litri) [1], avvalendosi dell'utilizzo di canali di dimensioni che vanno dalla decina alle centinaia di micrometri. L'elevato controllo delle grandezze fisiche coinvolte e la sensibilità raggiungibile ne rendono interessante l'applicazione nel campo dell'analisi biomedica.

Di nostro interesse è la produzione di un'emulsione di due fasi immiscibili, di cui la fase dispersa forma una goccia e l'altra è definita fase continua. La risultante microfluidica a gocce permette una serie di ulteriori vantaggi, tra i quali l'incapsulamento di reazioni chimiche all'interno di volumi ridotti, un buon controllo del mescolamento e della dispersione dei soluti all'interno delle gocce, la possibilità di generare emulsioni controllate in dimensione e tasso di produzione, molto più che in qualsiasi altra metodologia [2, 3]. Tra i più interessanti successi in questi ambiti rientra l'implementazione dei cosiddetti *Lab-on-a-Chip*, circuiti microfluidici atti a sostituire gli odierni grandi apparati di diagnostica chimica e biologica. Nel seguito, discuteremo brevemente le tre principali fasi coinvolte nella microfluidica a gocce ovvero produzione, trasporto e fusione delle stesse e concluderemo menzionando l'uso di microparticelle paramagnetiche per favorire il filtraggio selettivo di determinati composti biochimici.

1.1 Produzione delle gocce

I dispositivi microfluidici di interesse diagnostico devono produrre un flusso regolare e stabile ma allo stesso tempo sufficientemente flessibile, così da poter fornire gocce di volumi e velocità variabili. Ciò viene realizzato tramite tecniche passive che sfruttano le linee di flusso al fine di deformare l'interfaccia della fase dispersa e la crescita di instabilità interfacciali.

Un fondamentale parametro è il numero capillare $Ca_d = \frac{\mu V_d}{\gamma}$, ovvero il rapporto tra la velocità della goccia, la viscosità μ della fase continua e la tensione superficiale all'interfaccia γ , il quale confronta le forze viscose agenti sulla goccia con le forze interfacciali della stessa, ovvero la sua tensione superficiale.

I più comuni generatori di gocce presentano tre diverse geometrie, basate su tre diversi meccanismi fisici [2, 4, 5, 6]:

1.1.1 Co-flow

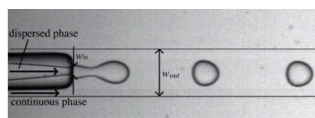


Figura 1.1: Esempio di produzione di gocce in un dispositivo a iniezione coassiale

I due fluidi scorrono lungo direzioni parallele, come mostrato in Figura 1.1, e la rottura del flusso della fase dispersa può essere separata in due regimi distinti:

- **dripping:** in cui le gocce si generano in prossimità della fine del capillare interno
- **jetting:** in cui le gocce si staccano da un'estensione del flusso della fase dispersa all'interno di quella continua

Utada *et al.* [7, 8] e Guillot *et al.* [9, 10] hanno interpretato la transizione tra i due regimi come il passaggio da un'instabilità assoluta a un'instabilità convettiva, terminologie che identificano la capacità delle perturbazioni di crescere e resistere all'avvezione. Le instabilità assolute crescono più velocemente di quanto vengano trasportate, occupando l'intero dominio e producendo delle oscillazioni regolari. Le instabilità convettive sono invece caratterizzate da un'avvezione dominante, comportandosi da amplificatori del rumore che può già essere presente nel sistema. In un dispositivo a iniezione coassiale, una configurazione assolutamente instabile dovrebbe comportare una formazione autosufficiente di gocce all'ingresso del dispositivo, mentre un flusso convettivamente instabile dovrebbe produrre gocce a una distanza finita, solo dopo che l'instabilità ha avuto spazio per crescere. Se ciò venisse applicato nei nostri dispositivi, ci dovremmo porre nel caso di un'instabilità assoluta, producendo gocce che occupino l'intera sezione del canale microfluidico e che si formino nei pressi del canale d'iniezione.

1.1.2 T-junction

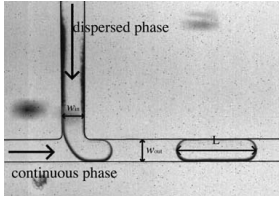


Figura 1.2: Esempio di produzione di gocce in una T-junction

Le due fasi scorrono lungo canali tra loro ortogonali, come si può vedere in Figura 1.2, generando gocce alla giunzione. Anche in questo caso la formazione della goccia può avvenire entro due regimi distinti:

- **dripping**: se il rapporto tra la larghezza del canale contenente la fase dispersa e quella del canale della fase portante $x = w_{in}/w_{out} \ll 1$ e se Ca_d è piuttosto grande, la goccia viene emessa prima che possa bloccare l'intero canale e la sua formazione è interamente dovuta allo stress di taglio
- **squeezing**: il caso contrario, osservato per $x \rightarrow 1$ e per Ca_d sufficientemente basso, produce gocce che ostruiscono completamente il canale, limitando il flusso della fase portante a un film che circonda la goccia

Le gocce vengono trasportate da un fluido immiscibile, il cui flusso, assieme alla geometria della giunzione, contribuisce alla deformazione dell'interfaccia della goccia e così anche alla sua stessa produzione. La dimensione delle gocce sarà dovuta alla competizione tra la pressione e lo stress di taglio dovuti al fluido esterno e la tensione superficiale del fluido in esame, che si oppone alla deformazione.

1.1.3 Flow focusing

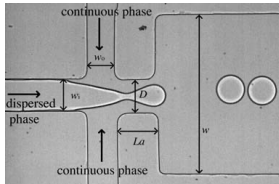


Figura 1.3: Esempio di produzione di gocce in un dispositivo a geometria flow focusing

In quest'ultimo caso la fase dispersa viene schiacciata da due flussi controfluenti della fase continua, come si vede in Figura 1.3. I regimi possibili sono: squeezing, dripping, jetting e thread formation.

L'elevato numero di aspetti caratterizzanti questa geometria ne rende difficile una semplice determinazione delle leggi di scala che determinano i passaggi tra i differenti regimi di formazione, così come la loro dimensione, distribuzione e il rate di produzione.

Sono state implementate, inoltre, tecniche di generazione attiva delle gocce [2], così da averne un più fine e localizzato controllo.

1.1.4 Scelta della geometria da utilizzare

La geometria che andremo a utilizzare per il nostro setup sperimentale sarà una T-junction, generata dal congiungimento di due canali perpendicolari tra loro. Le dimensioni nominali del canale d'ingresso per la fase continua sono $300 \mu m$ per $200 \mu m$, mentre il breve tratto tra la giunzione dei canali di inlet 2 e 3 e l'ingresso nel canale principale presenta sezione pari a $200 \mu m$ per $200 \mu m$.

La scelta della giunzione è dovuta al maggior controllo del rate di produzione, delle dimensioni delle gocce e della monodispersione, rispetto a quello che si avrebbe con una geometria di generazione di tipo co-flow.

Ciò è soddisfatto anche rispetto alla metodologia di flow focusing nel caso in cui ci si trovi a una frequenza di produzione attorno al centinaio di Hz, una volta raggiunto il kHz la tendenza s'inverte. Per quanto concerne i nostri scopi, trovandoci ancora agli inizi del progetto, raggiungere frequenze dell'ordine del kHz complicherebbe la gestione dei numerosi parametri ancora da controllare. Una giunzione di tipo T-junction risulta dunque preferibile rispetto a una di tipo flow focusing.

Lo scopo del progetto nel quale questa tesi si inserisce riguarda la manipolazione di materiale biologico disperso in fase acquosa. A tal fine si sceglie di generare inizialmente gocce d'acqua disperse in una miscela di olio e tensioattivo, così da ottenere emulsioni stabili anche nel caso di gocce a contatto tra loro.

1.2 Trasporto e mixing delle gocce

Una volta avvenuta la produzione, il trasporto viene operato dalla fase continua [2]. Il flusso si può dividere in due categorie, a seconda della dimensione delle gocce. Come si può riscontrare in Figura 1.4, se esse presentano diametri particolarmente inferiori alle dimensioni del canale si parla di "bubby flows", di "slug flows" nel caso le dimensioni siano, invece, comparabili.

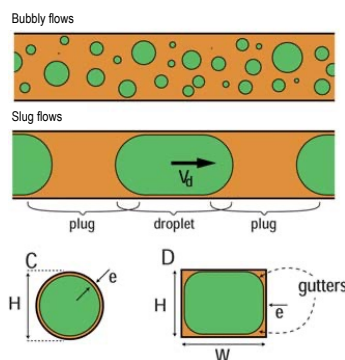


Figura 1.4: Esempi delle due tipologie di flussi sopra citati e sezioni nel caso di canale cilindrico o rettangolare [2]

Nel secondo caso, il nostro, il flusso dello stesso fluido portante è modificato dalla presenza della goccia e il sistema è governato dal numero capillare. Mentre la goccia si muove con una velocità pari a V_d , un sottile film di lubrificazione si viene a creare tra essa e la parete del canale, il cui spessore dipende dalla competizione tra la resistenza viscosa e la pressione capillare.

Tale film permette inoltre di considerare ogni goccia come indipendente in quanto, come si vede in Figura 1.4, esse non toccano le pareti e quindi non si toccheranno mai nemmeno tra loro. Nel caso di microcanali a sezione rettangolare, come il nostro, le gocce non riempiono completamente l'area trasversale, lasciando degli spessori, detti gutters, nei quali il flusso della fase portante procede nella stessa direzione della goccia.

Un ulteriore aspetto importante del trasporto delle gocce è dovuto all'interazione con la fase continua, che segue un profilo simile a Poiseuille, in cui la velocità massima è raggiunta al centro del canale. Quando la fase continua, che viaggia più veloce della goccia, raggiunge l'interfaccia deve quindi cambiare direzione e ciò è causa della nascita di zone di ricircolo e punti di ristagno.

Tutto questo si applica anche all'interno della goccia, portando a un movimento della stessa che si avvicina più a un rotolamento contro le pareti del canale che a un trascinamento, come mostrato in Figura 1.5. Conseguenza diretta della presenza di tali zone di ricircolo è il mixing interno alla goccia, che porta fluidi distinti alla completa miscelazione nonostante, trovandoci nell'ordine di scale micrometriche, i flussi siano tipicamente dominati da bassi numeri di Reynolds e dunque da un regime laminare.

Nel nostro caso avremo due fluidi distinti, del cui mixing verrà fornita una caratterizzazione.

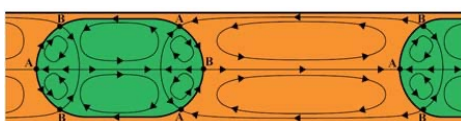


Figura 1.5: Topologia delle zone di ricircolo dovute alla presenza dell'interfaccia [2]

1.3 Utilizzo di microparticelle magnetiche

Un aspetto interessante nell'implementazione di sistemi microfluidici finalizzati alla bioanalisi riguarda l'impiego di microparticelle magnetiche e paramagnetiche. Tali particelle solide, che presentano un elevato rapporto *superficie/volume*, possono essere chimicamente funzionalizzate in modo tale da conferirne proprietà di aggregazione e assorbimento, così da essere impiegate come supporto per acidi nucleici, molecole o cellule, per il loro successivo riconoscimento o separazione [11].

Gli step fondamentali per il loro utilizzo sono:

- arricchimento della fase dispersa tramite l'immissione delle microparticelle
- miscelamento delle due componenti con reazione tra le molecole target e i siti d'attacco
- estrazione delle microparticelle dalla fase in analisi

Un grande vantaggio è rivestito dalla possibilità di manipolare tali sfere paramagnetiche a distanza, attraverso l'utilizzo di un campo magnetico esterno. Il parametro chiave risiede nella forza magnetica $F_{mag} \propto \left(\frac{Q}{\rho}\right) M \cdot \nabla B$, inversamente proporzionale alla densità delle microparticelle ρ , direttamente proporzionale alla loro quantità Q , alla magnetizzazione di una singola unità M e al gradiente del campo magnetico locale ∇B , particolarmente importante per produrre forze più intense lavorando sulle microscale. Il campo magnetico utilizzato per l'estrazione viene tipicamente generato da un magnete permanente o da un elettromagnete posizionato nei pressi del circuito, se non direttamente integrato in esso.

Come detto, nella microfluidica multifase si è, tuttavia, in presenza di interfacce e dunque di forze capillari le quali, per un menisco sferico, possono essere descritte come $F_{int} \propto \gamma \cdot L$, dove γ rappresenta la tensione superficiale tra i fluidi immiscibili e L una grandezza rappresentativa del sistema, nel nostro caso può trattarsi del raggio di curvatura del menisco. Nel caso di dispositivi microfluidici tale forza può raggiungere valori di poche centinaia di μN , sarà sempre direzionata perpendicolarmente all'interfaccia e verso l'interno della goccia. Entra infine in gioco un'ulteriore forza, dovuta al trasporto della goccia per conto della fase continua.

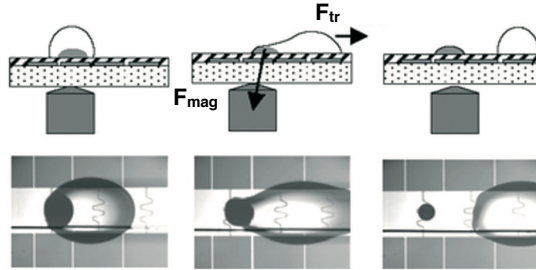


Figura 1.6: Processo di estrazione delle microparticelle tramite l'utilizzo di un magnete permanente [11]

Lo step di purificazione richiede dunque la rottura della goccia stessa, al fine di estrarre le molecole target legate alle microparticelle paramagnetiche. Ciò si traduce nell'applicazione di una forza magnetica che vinca sulle forze interfacciali delle gocce.

Capitolo 2

Tecniche di fabbricazione e caratterizzazione dei dispositivi microfluidici

2.1 Produzione del master

Punto di partenza dei nostri dispositivi è la creazione dei master usati per la replica, mediante tecniche di fotolitografia che, a causa delle microscale utilizzate, hanno luogo all'interno di un ambiente controllato. Nel nostro caso una clean room ISO-7, che limita la quantità di particelle di diametro superiore ai $5\text{ }\mu\text{m}$ presenti nell'aria.

Il nostro substrato di partenza è costituito da un wafer di Silicio, la cui superficie estremamente liscia permette una migliore e più omogenea adesione tra il substrato e ciò che vi viene depositato [12]. Nel nostro caso uno strato di resist negativo SU-8 2050, il quale polimerizza se sottoposto a radiazione UV: $350 - 400\text{ nm}$. Il processo, ripercorribile anche in Figura 2.1, si articola in più fasi: deposito del resist, spincoating (facendo ruotare il wafer di Silicio sul quale è stato depositato lo strato di resist, quest'ultimo viene reso uniforme in altezza, la quale dipenderà dal tempo e dalla velocità di rotazione), precottura, irraggiamento UV, cottura post-esposizione, lavaggio del resist non irraggiato.

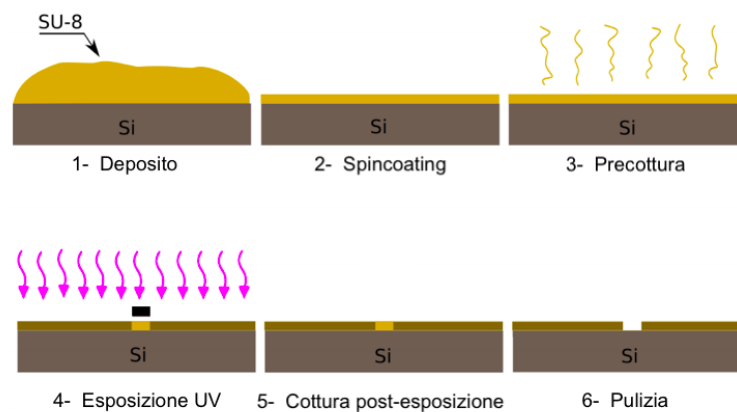


Figura 2.1: Fotolitografia per il trasferimento del pattern dalla maschera al master

L'altezza dello strato di resist si rifletterà nell'effettiva profondità dei canali del circuito finale, dei quali seguirà una caratterizzazione nelle sezioni a seguire.

2.2 Produzione dei dispositivi microfluidici

Il secondo step della fabbricazione sfrutta metodologie di soft-litografia, quella su cui ci focalizzeremo è detta *replica molding*.

Viene preventivamente silanizzato il master, al fine di renderlo facilmente separabile dal successivo strato di PDMS, un polimero silconico utilizzato in campo medico per le micro-applicazioni inerenti alla microfluidica, così da evitarne rotture. A tal scopo vengono utilizzati ca 80 ml di 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl-trichlorosilane, una molecola che forma dei film su una varietà di substrati, e una pompa da vuoto così da portare il suddetto in fase gassosa e permetterne l'uniforme deposizione su tutta la superficie del master, mantenendo quest'ultimo il più possibile in sospensione.

Una volta completata questa fase, si è pronti per l'effettiva produzione dei chip, tramite la riproduzione in negativo della geometria realizzata nel corso della prima fase. Si prepara dunque una soluzione di PDMS e reticolante in rapporto 10:1 tra loro. Il PDMS è composto da una catena di atomi di Silicio e Ossigeno, vinyl-terminated, ai quali sono legati gruppi metili. Esso è già miscelato con un catalizzatore al Platino, immerso in un solvente dall'odore caratteristico, che andrà a rompere il doppio legame del gruppo finale CH_2 . Il reticolante fa in modo che le catene di PDMS si reticolino tramite i gruppi di terminazione e i singoli atomi di Idrogeno legati al Silicio. All'interno del PDMS è, inoltre, già miscelato un inibitore in modo tale che la reticolazione, che avverrà nella fase di cottura del dispositivo microfluidico, possa aver luogo lentamente, così da evitare la repentina formazione di agglomerati. Quanto esposto può essere visualizzato in Figura 2.2.

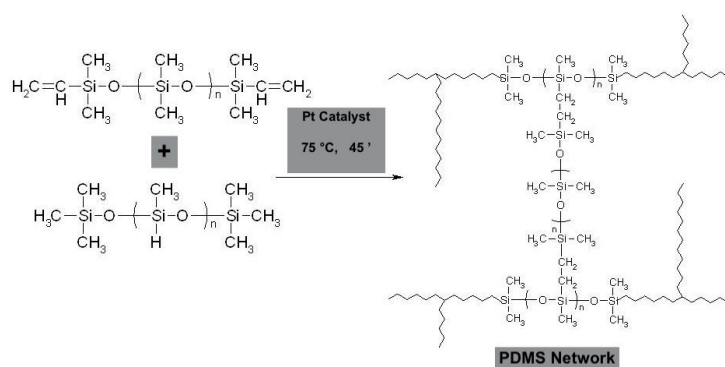


Figura 2.2: Reticolazione del PDMS

Una volta miscelate le due componenti si procede con un processo di degassificazione così da non incorrere, in seguito, nella presenza di bolle d'aria all'interno del chip microfluidico, le quali potrebbero alterare la geometria del circuito nel caso si trovassero in prossimità dei microcanali o potrebbero, se distanti dagli stessi, renderne difficoltosa la visualizzazione tramite microscopio. La miscela degasata è, a questo punto, pronta per essere versata lentamente sul master, come si può vedere in Figura 2.3, in quantità tale da crearne uno spessore di ca 5 mm, resistente alla manipolazione ma al contempo trasparente alla vista.

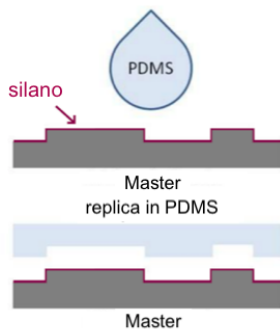


Figura 2.3: Fabbricazione del chip microfluidico tramite replica molding

Dopo una cottura a $75^\circ C$ per un tempo di almeno 45 min, il chip è pronto per la rimozione dal master di cui ha preso forma. Le repliche vengono sagomate in modo tale da essere adatte alla chiusura del circuito tramite un vetrino da microscopia.

All'interno della clean room, si procede alla sigillatura tramite plasma di ossigeno. Una volta iniettato l'ossigeno nella camera, tramite una scarica esso si dissocia producendo un plasma altamente reattivo. Gli

ioni generati bruciano tutto ciò che è inorganico, lasciando la superficie perfettamente pulita e arricchita di gruppi OH. Ponendo il PDMS sul vetrino, si formano ponti ossigeno estremamente resistenti, liberando H_2O . L'assemblaggio si completa inserendo i canali di inlet e di outlet, fissati con della colla a due componenti.

La parte finale della preparazione prevede la silanizzazione, in fase liquida, dei canali microfluidici. A tal scopo si prepara una miscela di FC-40 + 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl-trichlorosilane al 2% P/V, con la quale viene riempito completamente il dispositivo microfluidico sigillato. Durante tale fase si può già notare se i canali non sono stati ben sigillati nella fase di chiusura. Dopo un tempo di riposo di ca 20 *min*, si procede con il lavaggio dei chip utilizzando un'abbondante quantità di FC-40, iniettata grazie a una pompa a siringa, impostata a un flow rate di 8.4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Tale flusso viene scelto in quanto corrispondente alla portata volumetrica stimata del circuito, così da non rischiare di rompere i canali e, al contempo, lasciare che la reazione abbia il tempo sufficiente per avvenire.

Si procede, infine, con un'asciugatura interna del dispositivo in questione.

Il dispositivo microfluidico è, a questo punto, pronto per l'utilizzo.

2.3 Progetto dei dispositivi microfluidici

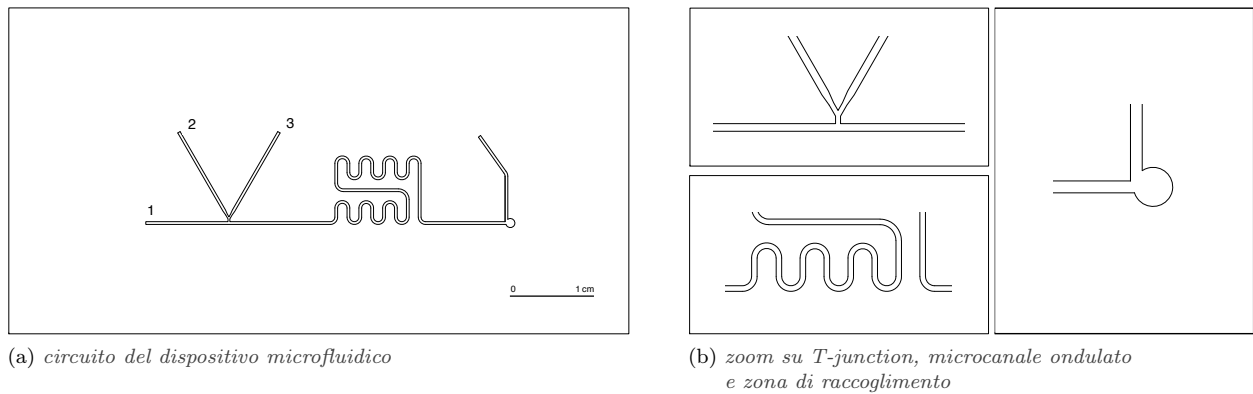


Figura 2.4: Progetto del dispositivo microfluidico

Il progetto in Figura 2.4 prevede tre canali di inlet:

- Il canale 1 permette l'entrata della fase continua, la miscela di Novec 7500 e tensioattivo;
- Il canale 2 l'ingresso del fluido da analizzare;
- Il canale 3 l'immissione delle microparticelle paramagnetiche.

Spostandosi verso il canale principale, la sezione dei canali 2 e 3 si restringe leggermente fino alla loro giunzione, che permette l'iniezione delle microparticelle nella fase dispersa. Si arriva quindi alla T-junction, dove avviene la formazione delle gocce grazie ai meccanismi, sopra citati, di contrasto tra la fase continua e la fase dispersa.

Una volta formate, le gocce proseguono nel loro percorso, nel corso del quale il microcanale ondulato facilita la completa miscelazione tra il liquido in esame e le microparticelle paramagnetiche. Ciò che potrebbe accadere nel caso di un canale lineare è un'inefficace mescolanza delle due parti, in quanto le zone di ricircolo interno sono idrodinamicamente isolate l'una dall'altra. Aggiungendo una perturbazione periodica al flusso si può fare in modo di rompere queste curve invarianti che fungono da barriere. A tal scopo, Song *et al.* [13] hanno utilizzato un microcanale ondulato per ottenere l'omogeneizzazione passiva delle goccioline. Vedremo in seguito una caratterizzazione della miscelazione nel caso dei dispositivi microfluidici che andiamo a realizzare.

Una volta completata questa fase, le gocce si avviano verso il canale di outlet, prima del quale passeranno nel mezzo di un campo magnetico esternamente generato, al fine di raccogliere le microparticelle paramagnetiche nella regione di accumulo.

2.4 Caratterizzazione dei dispositivi microfluidici

Tramite un microscopio Nikon Eclipse Ti e una videocamera Andor Zyla sCMOS si procede a una preliminare caratterizzazione visiva dei dispositivi microfluidici realizzati. I componenti che potrebbero risultare più critici per l'utilizzo del sistema sono la T-junction, il microcanale ondulato e il sito di accumulo delle microparticelle paramagnetiche. Le foto che seguono in Figura 2.5 mostrano al dettaglio queste tre zone. A seguire, in Figura 2.6, è presentata una caratterizzazione delle larghezze e profondità dei canali, acquisite tramite l'utilizzo di un profilometro.



Figura 2.5: Foto dei punti critici per l'utilizzo dei chip (scala = 700 μm)

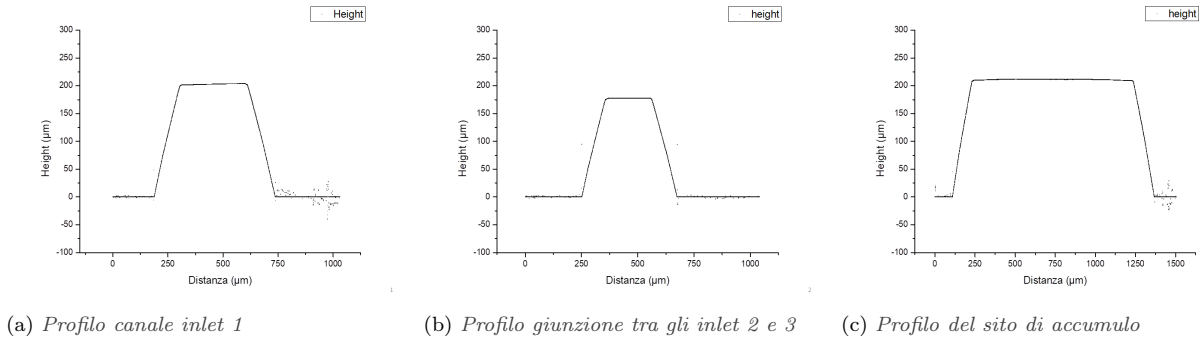


Figura 2.6: Profondità dei canali, ottenuta tramite l'utilizzo del profilometro

Come si può leggere dai grafici riportati, l'altezza dei canali, dovuta alla fase di spin coating durante il processo di fabbricazione, non è perfettamente omogenea: il canale principale presenta una larghezza media attorno ai 309 μm e un'altezza di circa 200 μm . Il canale di giunzione degli inlet 2 e 3 misura circa 213 μm di larghezza e 170 μm di altezza. Infine, la zona di raccoglimento mostra un diametro di circa 800 μm e un'altezza di 211 μm .

I chip microfluidici, dei quali si può trovare un esempio in Figura 2.7, risultano, a una prima analisi, ben realizzati: le pareti sono delineate e i canali puliti. Il PDMS appare trasparente e omogeneo, senza bolle a ostacolarne la vista e senza punti di rottura.

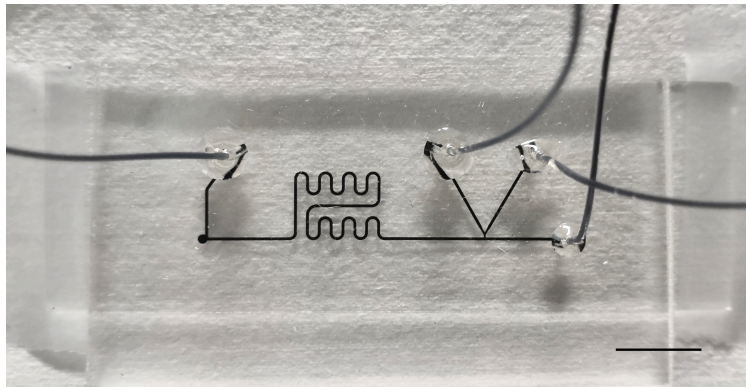


Figura 2.7: Dispositivo microfluidico realizzato (scala = 1 cm)

Capitolo 3

Utilizzo dei dispositivi

3.1 Set-up sperimentale

Per testare il funzionamento dei dispositivi microfluidici realizzati viene utilizzato un set-up sperimentale composto di un microscopio Nikon Eclipse Ti invertito, sul quale vengono montate una luce bianca e una Fast Camera Phantom v7.3, impostata a un sample rate di 1000 *fps* (*frame per secondo*) e un tempo di esposizione pari a 998 μs . Tali parametri sono dettati dalla necessità di un'acquisizione sufficientemente veloce da poter seguire le singole gocce lungo il loro percorso, pur non rinunciando a una qualità accettabile delle immagini, che ne permetta, a posteriori, una buona analisi.

L'iniezione fluidica all'interno del circuito può avvenire tramite controllo in flusso o controllo in pressione. Nel primo caso si utilizza una syringe pump la quale, tramite una vita senza fine, provvede allo spostamento dei liquidi. Nel secondo si utilizza un controllore di flusso Fluigent MFCS. Il principio di funzionamento del controllore si basa sull'iniezione d'aria, a una definita pressione, all'interno del serbatoio contenente il liquido, così da muoverlo con continuità fino ai canali del nostro circuito.

Tra il serbatoio della fase continua e il suo ingresso nel dispositivo viene inserito un flow meter adibito alla misura del suo flusso e della sua densità, pari a $1616,92 \pm 0,01 \text{ kg/m}^3$.

Per calcolare la resistenza idraulica dei canali d'ingresso consideriamo le loro diverse componenti come resistenze in serie, calcolandone ciascun valore come $R_h = \frac{8\mu \cdot L}{\pi \cdot r^4}$ dove μ esprime la viscosità dinamica del fluido, L identifica la lunghezza del tratto di canale in questione ed r il suo raggio. L'uso della formula di Poiseuille per il calcolo della resistenza fluidica è giustificato dai bassi numeri di Reynolds dei flussi studiati, Re , tipicamente inferiore a 20. Da ciò se ne deduce che, al fine di aumentare la resistenza idraulica in ingresso al circuito, si può considerare l'incremento della lunghezza dei canali a raggio minore. Le lunghezze dei canali sono state dunque aggiustate in modo da lavorare in un range di pressioni che stiano a metà del fondo scala del sistema a controllo a pressione Fluigent (ca 345 *mmbar* e 1 *bar*, a seconda del canale utilizzato). Ciò è importante per noi in quanto, optando per un controllo in pressione, i flussi diventano a loro volta funzione di R_h .

Per le prime fasi di utilizzo dei nostri dispositivi viene iniettata nel canale 1 una miscela al 2% di Krytox 157 FSH in Novec 7500. Il primo è un surfattante che rende l'emulsione stabile, anche se le gocce dovessero giungere a toccarsi, il secondo è un olio immiscibile con le fasi acquose e che bagna completamente le pareti dei canali, così che sia garantita la produzione delle gocce [14]. Il canale 2 è attraversato da acqua ultrapura, caratterizzata da una resistività pari a 18,2 $M\Omega \cdot cm$ alla temperatura di 25 °C. Nel terzo e ultimo canale di inlet è iniettata una soluzione acquosa color nero (così da avere parametri confrontabili con quelli del liquido con il quale dovrà miscelarsi) ottenuta utilizzando inchiostro nero Pelikan, al fine di avere un contrasto sufficiente con l'acqua durante la visualizzazione tramite il microscopio.

3.2 Caratterizzazione delle dimensioni delle gocce in funzione delle pressioni d'iniezione

La prima analisi del generatore di gocce riguarda la caratterizzazione del rapporto tra la lunghezza e la larghezza delle gocce, in funzione del rapporto tra le pressioni d'iniezione di acqua e olio.

Per far questo vengono iniettati nel circuito l'acqua ultrapura e l'inchiostro, modificando le pressioni a cui vengono sottoposti i rispettivi serbatoio, fino a che non si raggiunge la produzione delle gocce e una loro buona

composizione (circa al 50% di acqua e al 50% d'inchiostro). Una volta raggiunto questo scopo, vengono registrate delle sequenze d'immagini, tramite la Fast camera, per ogni combinazione di pressioni utilizzata. In Figura 3.1 si può qualitativamente notare come, alla T-junction, le gocce prodotte risultino di dimensioni differenti, a seconda del rapporto tra le pressioni applicate alla fase dispersa e alla fase continua:

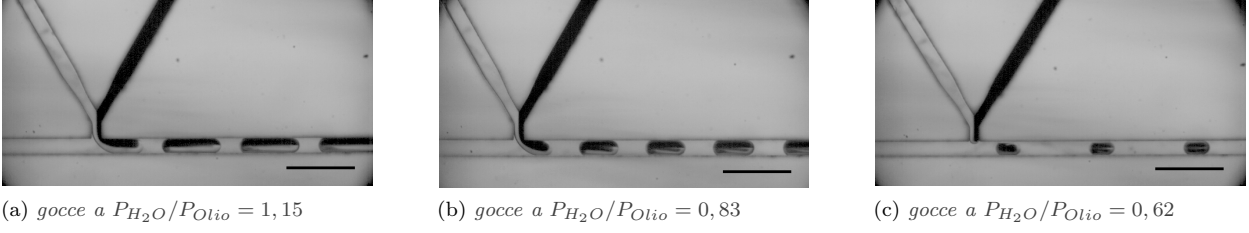


Figura 3.1: Produzione di gocce a diversi rapporti P_{H_2O}/P_{Olio} (scala = 1mm)

Il numero di Reynolds $Re = \frac{\rho u L}{\mu}$, dove ρ è la densità del fluido in gioco, u la sua velocità, μ la sua viscosità dinamica e L la dimensione caratteristica del canale, nel nostro caso i diametri dei capillari, determina, per un flusso, il passaggio dal regime laminare a quello turbolento. Nelle condizioni di lavoro usuali, i due liquidi scorrono in regime laminare fino alla formazione delle gocce, iniziando poi a miscelarsi fino all'uniformità.

Per l'analisi, si scrive un programma LabView che riconosca il front e il rear di ogni goccia, grazie al netto passaggio dai pixel più chiari a quelli più scuri e viceversa. Una volta riconosciute le interfacce, il programma registra gli estremi dei menischi e ricava così la dimensione longitudinale della goccia. Una volta ottenute tutte le misure, esso provvede a fornirne una media corredata d'errore, calcolato come la relativa deviazione standard. Assieme alle dimensioni delle gocce, ne viene stimata la velocità e il rate di produzione, che potrebbero essere utili ai fini di analisi future. Un aspetto importante che si ricava dall'interpolazione gaussiana dei dati, come si può apprezzare in Figura 3.2, è la deviazione standard corredata alle dimensioni delle gocce. Essa, che si attesta tra lo 0,2% e il 2%, ci garantisce la monodispersione delle stesse, ovvero l'uniformità delle dimensioni tra gocce formate nelle medesime condizioni, cioè con le medesime combinazioni di pressioni.

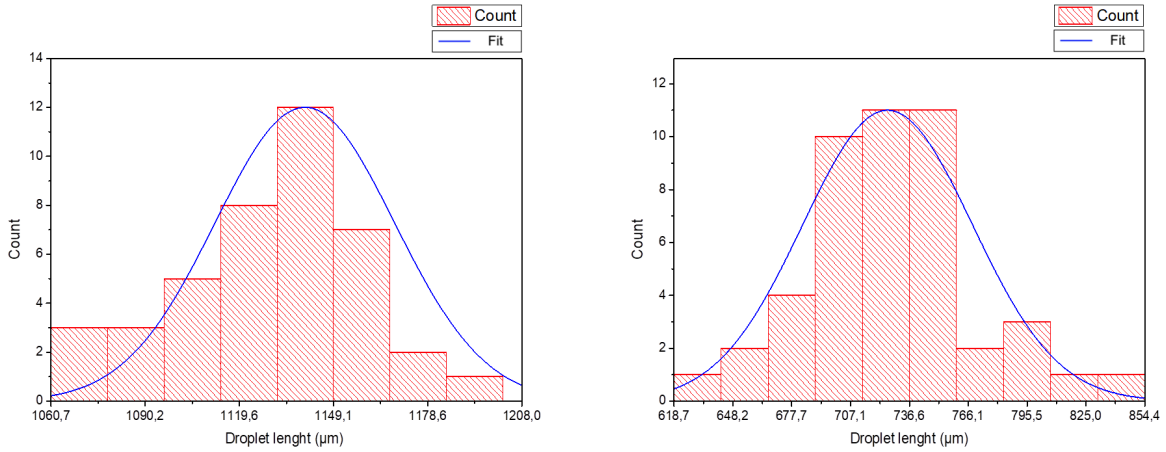


Figura 3.2: Istogrammi con relativi fit gaussiani, riguardanti le dimensioni delle gocce a diversi rapporti tra le pressioni

In Figura 3.3 si può, invece, apprezzare l'andamento del rapporto tra la lunghezza della goccia e la sua larghezza, in funzione del rapporto tra le pressioni applicate alla fase dispersa e alla fase continua, al fine della loro iniezione nel circuito.

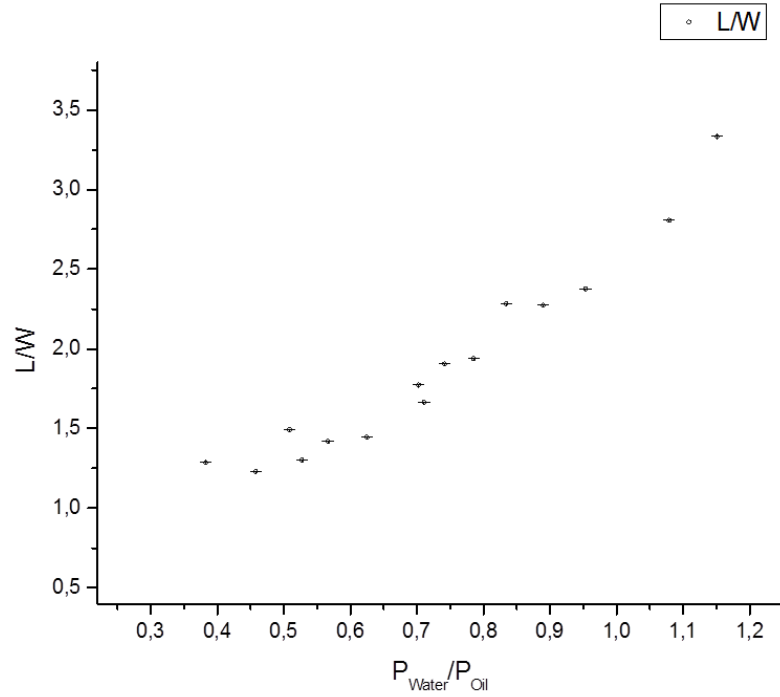


Figura 3.3: Rapporto L/W in funzione del rapporto tra le pressioni d'iniezione

Si nota che a parità di larghezza, la quale viene identificata nella larghezza del canale in cui le gocce scorrono successivamente alla loro produzione, la lunghezza delle stesse tende ad aumentare quando le pressioni applicate alla fase continua e alla fase dispersa divengono paragonabili.

L'andamento ottenuto è in linea con la letteratura, in cui si trovano caratterizzazioni delle dimensioni delle gocce in funzione dei flow rate delle fasi in immissione, un'esempio è apprezzabile in Figura 3.4.

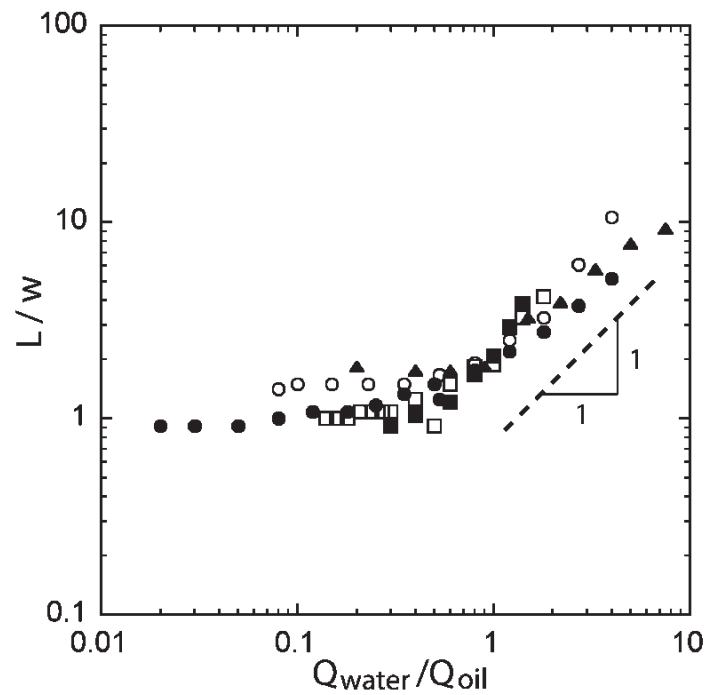


Figura 3.4: Rapporto L/W in funzione del rapporto tra i flow rate delle fasi iniettate (letteratura) [4]

Grazie al flow meter disponiamo, inoltre, del flow rate della fase continua. Stimando la resistenza idraulica incontrata dalla fase dispersa si tenta di ricavare il flow rate anche di quest'ultima, così da ottenere il rapporto L/W in funzione del rapporto tra i due flow rate, direttamente confrontabile con quanto riportato dalla letteratura. Una volta stimata la resistenza dei singoli tratti dei canali d'immissione di acqua e olio come $R_h = \frac{8\mu L}{\pi r^4}$, dove μ è la viscosità dinamica del fluido, L la lunghezza del tratto ed r il suo raggio, i singoli contributi, in serie, vengono sommati per ottenere le resistenze totali. Le resistenze idrauliche dei canali d'ingresso per la fase continua e la fase dispersa si differenziano leggermente a causa delle diverse viscosità dinamiche ma si attestano entrambe nell'ordine di $4 \cdot 10^6 \text{ mPa} \cdot \text{s} \cdot \text{mm}^{-3}$, un risultato ragionevole e coincidente con una caratterizzazione a posteriori della stessa, tramite l'interpolazione dei flow rate della fase continua, in funzione delle pressioni d'iniezione.

A questo punto si ricava il flow rate della fase dispersa come $Q = \frac{\Delta P}{R_h}$, dove R_h indica la resistenza idraulica appena stimata e si assume come ΔP la differenza tra la pressione applicata tramite il Fluigent e la pressione atmosferica in uscita dal circuito. Una volta ottenuti i dati necessari si procede con la costruzione del grafico in Figura 3.5.

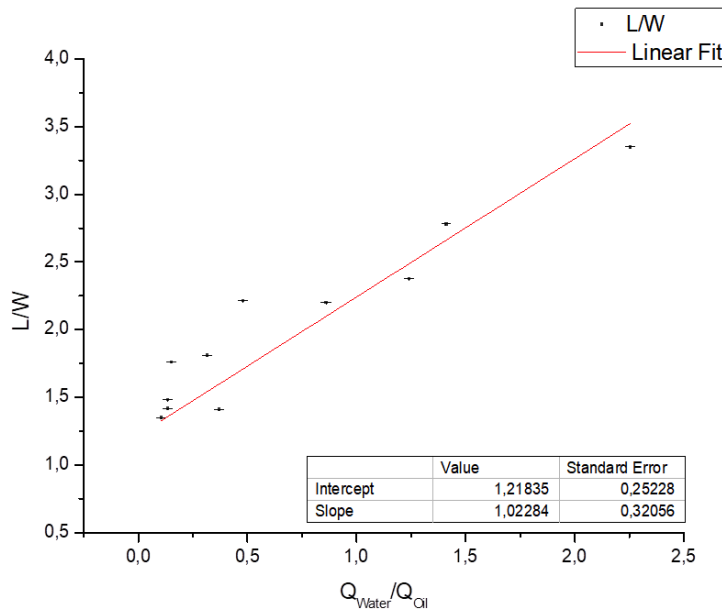


Figura 3.5: Rapporto L/W in funzione del rapporto tra i flow rate delle fasi iniettate

Nonostante i pochi dati, si conferma l'andamento riportato in letteratura. Attraverso un fit lineare degli stessi si ottiene una pendenza pari a $1,0 \pm 0,3$ (la pendenza del grafico in pressioni risulta più elevata ma dello stesso ordine, in linea con la differenza tra le resistenze idrauliche per le due fasi, dipendenti dalle viscosità dinamiche dei fluidi considerati), il cui elevato errore, assieme al chi quadro $\chi^2 = 0,5$ che si discosta particolarmente da 1, sottolinea la dispersione dei dati, già visibile in Figura 3.5. Questa analisi preliminare suggerisce che se si vuole migliorare la determinazione della crescita delle gocce è necessario inserire un secondo flussimetro nell'altro canale d'ingresso della giunzione, così da avere una misura diretta del rapporto dei due flussi.

3.3 Caratterizzazione del miscelamento interno delle gocce

Si è quindi caratterizzata la velocità di mixing dei liquidi interni alle gocce, al fine di ottimizzare la geometria del circuito. Il set-up dei canali d'immissione rimane quello utilizzato per la caratterizzazione delle dimensioni delle gocce. Si continua dunque a miscelare acqua ultrapura e la soluzione acquosa color nero precedentemente descritta.

Si parte da una preliminare analisi del rate di mixing tra le due entrate, nel caso in cui non si andasse incontro alla produzione di gocce: a tal fine ciò che si potrebbe considerare sarebbe il tempo di diffusione di una particella di soluto dal centro della goccia fino al bordo del canale, considerando un processo diffusivo di acqua in acqua. Una volta tenuto conto di questo, tramite la velocità delle gocce (rilevata attraverso il programma LabView

menzionato precedentemente, in Sezione 3.2), si potrebbe calcolare quanto spazio debba percorrere la goccia, prima che la particella di soluto considerata arrivi al bordo della stessa. Disponendo dell'apparato sperimentale, si procede, tuttavia, con una caratterizzazione sperimentale di tutto questo, iniettando nel dispositivo le due fasi acquose, tramite pressioni all'incirca uguali tra loro, e non la fase continua, così da non avere produzione di gocce e poter monitorare quanto tempo ci mettano i due fluidi a miscelarsi, senza uscire dal regime laminare. Quanto osservato è apprezzabile in Figura 3.6 (la disposizione delle figure rispecchia l'ordine delle varie componenti all'interno del dispositivo microfluidico).

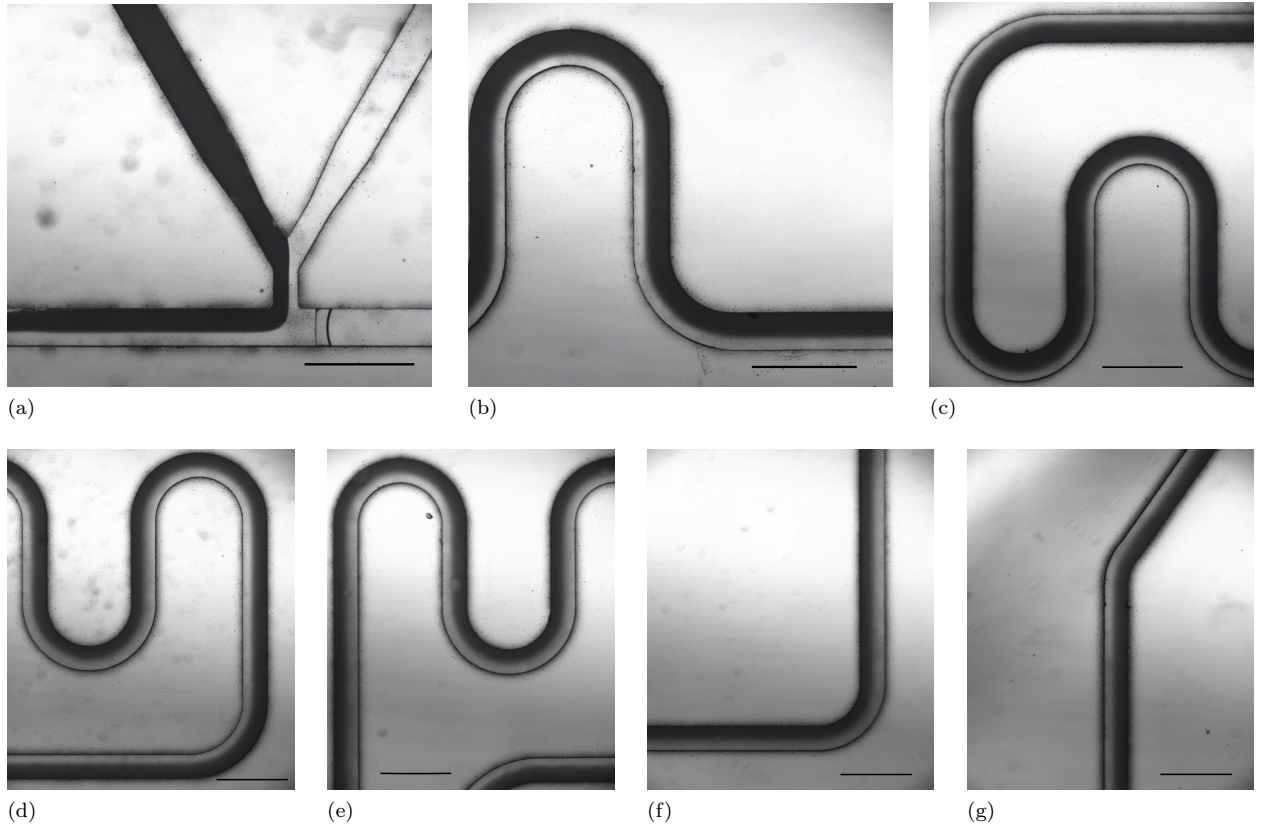


Figura 3.6: Flusso delle due fasi acquose senza la formazione delle gocce (scala = $800\ \mu\text{m}$)

Come risulta evidente dalla sequenza d'immagini in Figura 3.6, le due fasi acquose, nel caso in cui la produzione delle gocce non abbia luogo, proseguono in regime laminare per l'intera lunghezza del nostro circuito microfluidico, non facendo così a tempo a portare a termine, entro le dimensioni di cui disponiamo, il lento miscelamento delle due parti. Questo conferma la necessità di formare le gocce, punto di partenza di questa tesi.

Tramite un'analisi a posteriori delle medesime sequenze d'immagini utilizzate per il paragrafo precedente, apprezzabili in Figura 3.7, si procede quindi con una caratterizzazione del miscelamento effettivo delle due fasi acquose, nel caso di formazione delle gocce. A tal fine si procede con un'integrazione dei pixel componenti l'immagine di ogni goccia.

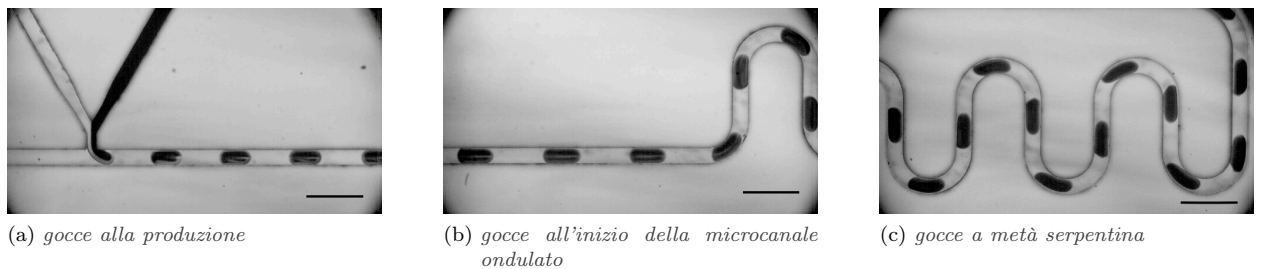


Figura 3.7: Gocce a diversi punti del percorso (scala = $1\ \text{mm}$)

Dal momento in cui esse vengono salvate in formato 8 bit, ciascun pixel possiede un valore tra 0 e 255, a seconda della tonalità di grigio assunta. Ci si aspetta che il valore della loro somma assuma un andamento crescente all'aumentare della distanza dalla T-junction, in quanto si passa da un'immagine contenente pixel pressoché bianchi e pixel neri, a una figura composta di soli pixel grigi, uniformi tra loro. In Figura 3.8, in cui si trova la somma dei pixel componenti la goccia, in funzione della sua distanza dal sito di produzione, si può vedere il risultato della caratterizzazione. Dai grafici si nota che le gocce risultano già ben miscelate a circa 40 mm dalla T-junction dunque, al fine di ottimizzare il circuito, si può ridurre a circa metà il numero delle curve, così da risparmiare materiale sia in fase di fotolitografia e dunque di produzione della maschera, sia nella quantità di PDMS da utilizzare per riprodurre poi il dispositivo finale.

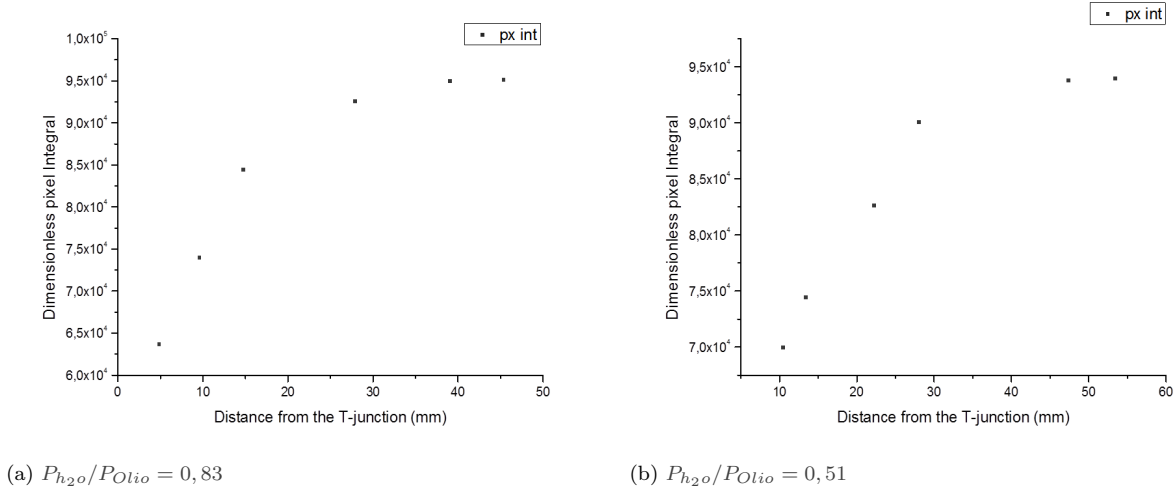


Figura 3.8: Intensità del grigio in funzione della distanza dalla T-junction a diversi rapporti di pressione

3.4 Sperimentazione con microparticelle paramagnetiche

Una volta completate le caratterizzazioni dimensionali di gocce e circuito, si passa ai test di utilizzo delle microparticelle paramagnetiche.

Nel canale 1 è ancora inserita la miscela di Novec 7500 e Krytox 157 FSH e nel canale 2 acqua ultrapura. Nel terzo canale di inlet sono iniettate *DynabeadsMyOneTMCarboxylicAcid*, microparticelle paramagnetiche sospese in acqua purificata, con una concentrazione pari a 10 mg beads/mL . Esse forniscono un supporto solido per un'ampia gamma di separazioni biomagnetiche e manipolazioni molecolari, grazie agli acidi carbossilici superficiali, i quali consentono la formazione di legami ammidici covalenti a proteine e peptidi. Le loro dimensioni, con diametro pari a $1 \mu\text{m}$, le rendono particolarmente adatte per la preparazione di campioni e la manipolazione di acidi nucleici e proteine [15].

3.4.1 Stima dei tempi di sedimentazione

La densità fornita delle microparticelle è pari a $1,8 \text{ g/cm}^3$, ci si aspetta pertanto una loro precipitazione in acqua. Una preliminare verifica riguarda, a tal proposito, i tempi di sedimentazione delle stesse. Le gocce che si andranno a produrre dovranno essere monodisperse, ovvero uniformi tra loro nelle percentuali di composizione di acqua e microparticelle. A tal fine, se le particelle dov'essero precipitare velocemente, si renderebbe necessario lo sviluppo di una metodologia finalizzata alla loro continua risospensione nella fase acquosa in cui sono mediate. L'impiego di un campo magnetico generato da una bobina attorno al serbatoio, oppure la messa in vibrazione del serbatoio, contenente le microparticelle.

Per tale caratterizzazione viene analizzata una quantità pari a $200 \mu\text{l}$ di soluzione, nella quale sono sospese microparticelle paramagnetiche in concentrazione 10 mg/mL , tramite una videocamera impostata a un frame rate di 11,5 fps e con un salvataggio d'immagine ogni 1000 secondi, risultando in un'acquisizione effettiva di 0,01 fps. Il set-up sperimentale esposto è visibile in Figura 3.9.

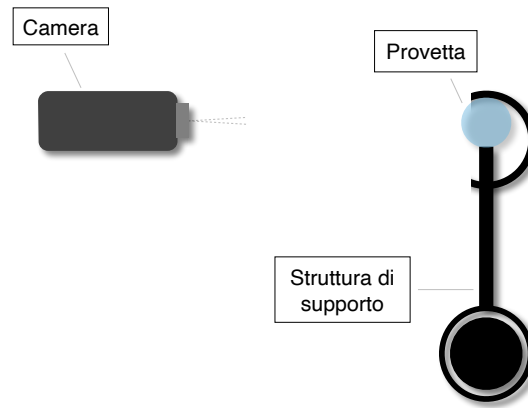


Figura 3.9: Vista dall'alto del set-up per la stima del tempo di sedimentazione delle microparticelle

In Figura 3.10 si può vedere un riassunto di questi frame:

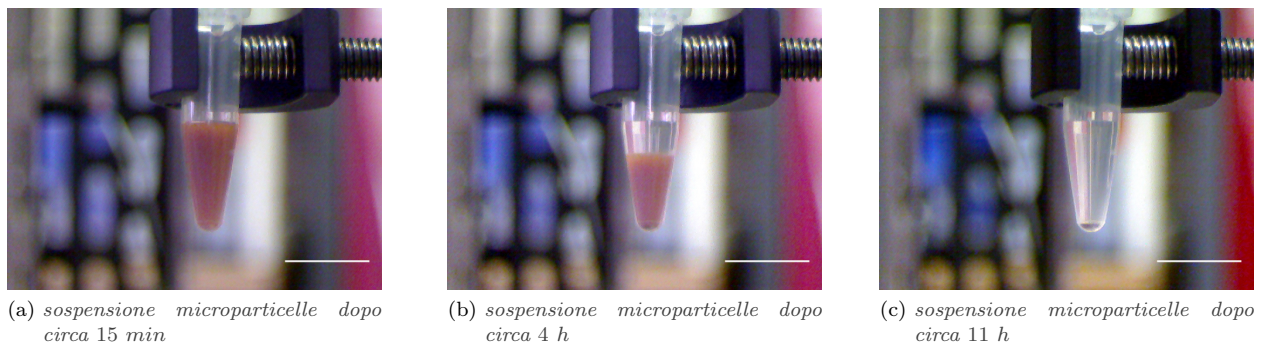


Figura 3.10: Sospensione delle microparticelle allo scorrere del tempo (scala = 1 cm)

Analizzando l'andamento temporale della sedimentazione delle microparticelle se ne ricava la caratterizzazione riportata in Figura 3.11, nella quale per *Beads height* viene intesa l'altezza occupata dalle microparticelle all'interno dell'acqua in cui sono miscelate, occupante un'altezza pari a circa 13 mm:

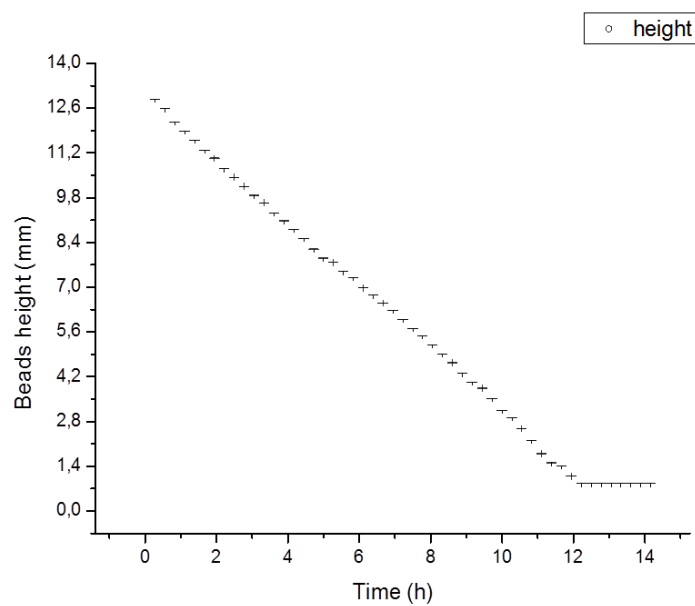


Figura 3.11: Altezza occupata dalle microparticelle allo scorrere del tempo

Come appare evidente, il processo è lineare e, dal grafico, si legge un tempo di totale precipitazione superiore alle 10 ore, più che trascurabile per i nostri scopi. In seguito a tale caratterizzazione si opta quindi per l'utilizzo delle microparticelle come fornite, senza un'ulteriore miscelazione e senza l'utilizzo di tecniche di risospensione.

3.4.2 Tecnica d'immissione

In ambito biologico l'ottimizzazione dei materiali riveste un punto cruciale al fine del risparmio di risorse. A tal proposito si rende necessaria l'ideazione di una differente metodologia d'immissione delle microparticelle, rispetto a quanto fatto per olio, acqua e inchiostro.

Per non avere perdita di materiale viene utilizzata una provetta da laboratorio, mostrata in Figura 3.12 e di capacità 1,5 ml, capovolta, al cui interno sono poste le microparticelle sospese in acqua ultrapura assieme a una quantità d'olio per il volume restante.

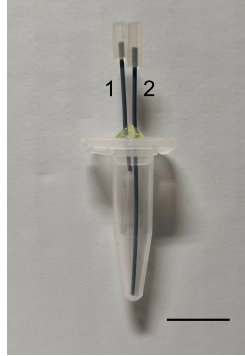


Figura 3.12: Provetta utilizzata per l'immissione delle microparticelle nel circuito (scala = 1 cm)

I due liquidi ovviamente non si mescolano e l'acqua contenente le biglie occupa la parte superiore perchè meno densa. Sul tappo a pressione vengono praticati due fori utilizzando un trapano con punta da 0,8 mm. Il primo foro viene creato nel punto centrale della circonferenza del tappo così che il canale, attraverso cui le microparticelle entrano nel circuito, possa arrivare fino al punto più alto della provetta. Il secondo foro, tramite il quale l'olio entra nel serbatoio, viene praticato più lateralmente e da esso passa un canale da pochi millimetri di lunghezza, così che la miscela di Novec 7500 e tensioattivo rimanga ben separata dalle microparticelle.

In Figura 3.13 si espone il set-up utilizzato per l'immissione delle microparticelle nel circuito: tramite il solito apparato per il controllo in pressione, ulteriore olio è iniettato nella provetta attraverso il canale 3 in ingresso alla stessa (in Figura 3.12 identificato come canale 1), così che le microparticelle vengano spinte nella zona superiore della stessa per essere dunque iniettate nel circuito tramite il canale 4 (corrispondente al canale 2 in Figura 3.12), che arriva fino alla sommità del serbatoio e, successivamente, attraverso il terzo canale di inlet interno al dispositivo microfluidico.

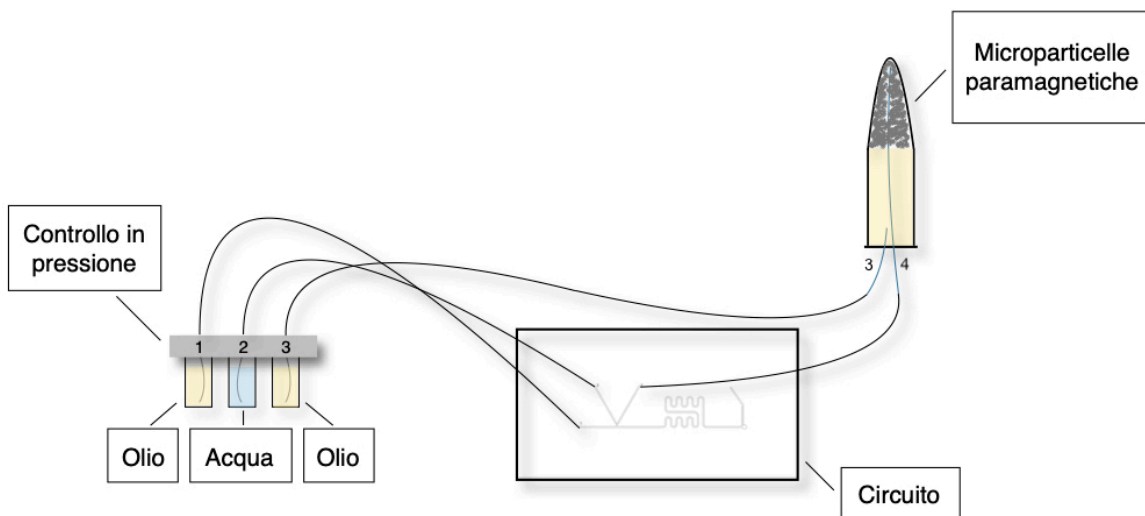
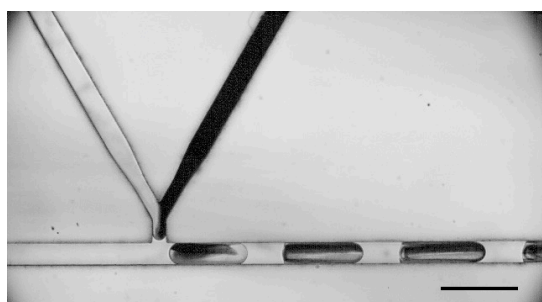


Figura 3.13: Set-up sperimentale per l'immissione delle microparticelle nel circuito

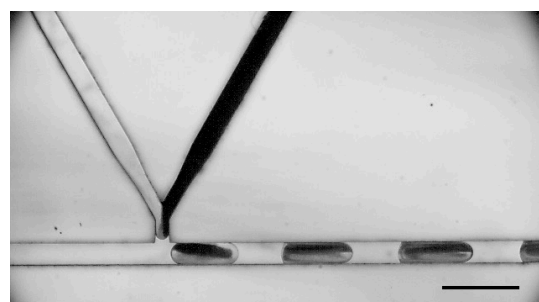
3.4.3 Produzione e miscelamento interno delle due fasi contenute nelle gocce

Trovandoci ancora nel caso di soluzioni acquose, continuano a valere le caratterizzazioni svolte precedentemente riguardo le dimensioni e il mixing delle gocce lungo il circuito.

In Figura 3.14, si nota che la produzione delle gocce e le loro dimensioni continuano a risultare ben controllabili in pressione. Esse si formano per circa la metà di acqua ultrapura e per l'altra metà di microparticelle in soluzione acquosa. I due liquidi scorrono in regime laminare fino alla formazione delle gocce, iniziando poi a miscelarsi fino all'uniformità, su distanze comparabili a quelle percorse dalle gocce composte di acqua e inchiostro.



(a) gocce a $P_{H_2O}/P_{Olio} = 0,36$



(b) gocce a $P_{H_2O}/P_{Olio} = 0,25$

Figura 3.14: Produzione e principio di mixing a diversi rapporti tra le pressioni d'iniezione (scala = 1 mm)

3.4.4 Estrazione delle microparticelle paramagnetiche

Una volta stabilizzata la produzione delle gocce e il miscelamento tra fase continua e fase dispersa, dopo un breve tempo d'incubazione, si procede all'estrazione delle microparticelle.

Viene utilizzato un magnete permanente, ovvero un oggetto formato da materiale ferromagnetico che sia stato magnetizzato, il quale crea un proprio campo magnetico, alla superficie di 0,5 T. Esso viene inizialmente posto in prossimità della zona di raccoglimento. I tentativi d'estrazione in tale area risultano, tuttavia, negativi a causa della svantaggiosa geometria: le gocce non si rompono, mantenendo le microparticelle al loro interno. Un'ipotesi per facilitare l'estrazione in tale zona ricade in una modifica della geometria del circuito, restringendo l'imboccatura del sito. A seguito di tale constatazione, si procede con un nuovo tentativo d'estrazione all'altezza di una delle anse del microcanale ondulado (vedi Figura 3.15).

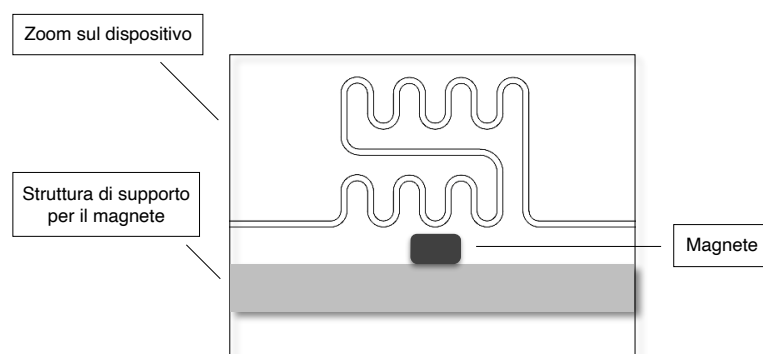


Figura 3.15: Set-up sperimentale per l'estrazione delle microparticelle

Come si può vedere in Figura 3.15, a tal fine, viene predisposto un supporto, fabbricato tramite tecnica di stampa 3D, sul quale poggia il magnete atto all'estrazione delle microparticelle paramagnetiche. Il chip in PDMS viene modellato in modo tale da poter posizionare il magnete il più vicino possibile al circuito. Nonostante questo, come si può notare dalle immagini in Figura 3.16, le particelle risentono della presenza del magnete, accumulandosi nella parte posteriore della goccia, ma non a sufficienza da attraversare l'interfaccia.



Figura 3.16: Tentativo negativo di estrazione (scala = 1 mm, la posizione del magnete è indicata dalle frecce)

Si prosegue quindi con un terzo tentativo con lo stesso magnete utilizzato in precedenza ma inserendo nel supporto una punta magnetizzabile, visibile in Figura 3.17, la quale, una volta avvicinato il magnete, fungerà anche da supporto per lo stesso.

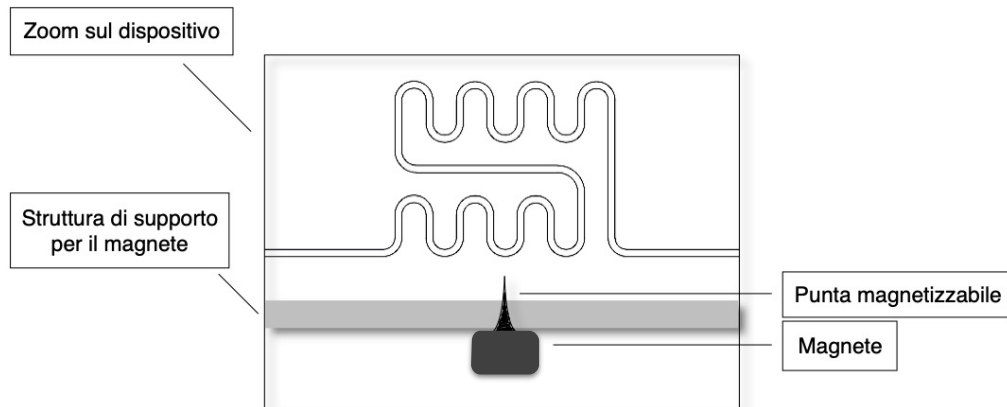
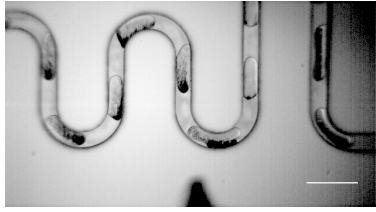
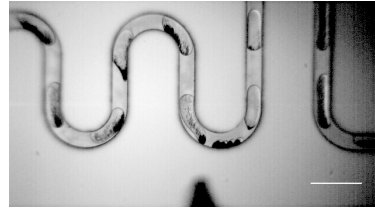


Figura 3.17: Nuovo set-up sperimentale per l'estrazione delle microparticelle

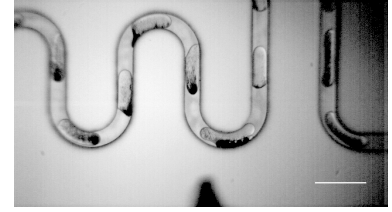
La presenza della punta aumenta il gradiente del campo magnetico ∇B in prossimità del circuito e quindi la forza magnetica esercitata sulle microparticelle. Come desiderato, l'estrazione prende ora luogo. In Figura 3.18, nella quale si può notare la presenza della punta magnetizzata, seguiamo l'estrazione delle microparticelle paramagnetiche da una goccia:



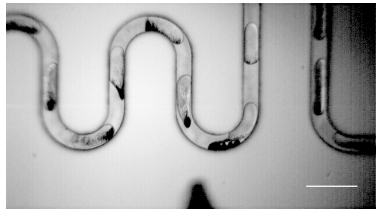
(a) la goccia si avvicina alla punta magnetizzata e le microparticelle si addensano sulla zona frontale della stessa



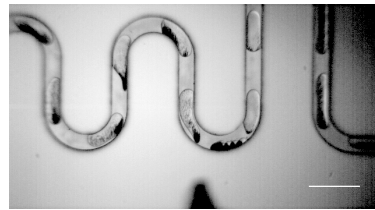
(b) sotto l'azione della forza magnetica, la goccia si deforma



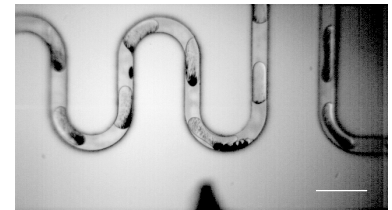
(c) la goccia continua il suo percorso mentre le microparticelle vengono attratte dalla punta magnetizzata



(d) la goccia si rompe, lasciando una sua piccola parte, contenente le microparticelle, in prossimità della punta



(e) la goccia prosegue, depurata



(f) la goccia riprende la sua forma originale

Figura 3.18: Tentativo di estrazione con l'aggiunta delle punta magnetizzata, riuscito (scala = 1 mm)

Nel dispositivo finale si renderà dunque necessario prevedere il posizionamento di una punta magnetizzabile adiacente alla zona di estrazione.

Conclusioni e prospettive

Questa tesi rappresenta uno studio preliminare per la fabbricazione di dispositivi microfluidici per applicazioni biomedicali.

Il punto di partenza è stata la progettazione della maschera, a cui è seguita la fase di realizzazione, attraverso la produzione di un master tramite fotolitografia e la sua replica in PDMS, le tecniche esposte nel Capitolo 2. Si è allestito il set-up sperimentale, testando sia il controllo in flow rate che quello in pressione, decidendo di proseguire con quest'ultimo attraverso un sistema a controllo a pressione (Fluigent). Si sono così prodotte gocce ben controllabili nelle dimensioni e nelle concentrazioni delle due fasi delle quali si componevano. Attraverso l'utilizzo di un microscopio e di una fast camera è stata messa a punto la visualizzazione del sistema, che necessitava di una discreta risoluzione e di un'alta velocità di acquisizione. Inizialmente, si è utilizzata una miscela di olio e tensioattivo come fase continua e, come fase dispersa, acqua ultrapura e inchiostro. Variando i rapporti tra le pressioni di iniezione, si sono prodotte le gocce in olio. È stato inoltre sviluppato un metodo per la valutazione delle dimensioni delle gocce, della loro velocità e del tasso di produzione. I dati così raccolti sono stati analizzati e confrontati con successo con quanto fornito dalla letteratura. Si è osservato un rapido mescolamento delle due fasi liquide iniettate nella goccia.

Si è poi proseguito con le prime prove di utilizzo delle microparticelle paramagnetiche, che avranno in futuro il compito di legarsi alle molecole target per essere poi estratte dalla goccia. La produzione delle gocce non ha presentato problemi e l'estrazione delle microparticelle paramagnetiche è riuscita utilizzando una punta magnetizzabile, che aumenta il gradiente del campo magnetico generato dal magnete permanente.

Sulla base di questo studio preliminare, si possono suggerire una serie di migliorie. Innanzitutto, è necessario usare due flussimetri per misurare i due flussi d'ingresso della giunzione a T. Per facilitare l'estrazione delle biglie è opportuno ridurre le dimensioni del canale in prossimità del campo magnetico e usare un magnete con una punta posta in prossimità della strozzatura.

Il progetto presenta margine di miglioramento e buone prospettive di successo, aprendo magari la strada al suo utilizzo per un ampio range di scopi diagnostici finalizzati all'analisi di diversi liquidi e materiali biologici, oltre che per le tecniche di biopsia liquida per il quale è ideato.

Bibliografia

- [1] George M. Whitesides. «The origins and the future of microfluidics». In: *Nature* 442 (2006).
- [2] Charles N. Baroud, Francois Gallaire e Rémi Dangla. «Dynamics of microfluidic droplets». In: *The Royal Society of Chemistry* 10 (2010).
- [3] Ralf Seemann et al. «Droplet based microfluidics». In: *Rep. Prog. Phys.* 75 (2012).
- [4] Piotr Garstecki et al. «Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction – scaling and mechanism of break-up». In: *The Royal Society of Chemistry* 6 (2006).
- [5] Sujin Yeom e Sang Yong Lee. «Size prediction of drops formed by dripping at a micro T-junction in liquid–liquid mixing». In: *Experimental Thermal and Fluid Science* 35 (2011).
- [6] Chun-Xia Zhao e Anton P.J. Middelberg. «Two-phase microfluidic flows». In: *Chemical Engineering Science* 66 (2011).
- [7] A. S. Utada et al. «Absolute instability of a liquid jet in a coflowing stream». In: *Physical review Journals* 100 (2008).
- [8] A. S. Utada et al. «Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams». In: *Physical review Journals* 99 (2007).
- [9] P. Guillot et al. «Stability of a jet in confined pressure-driven biphasic flows at low reynolds numbers». In: *Physical review Journals* 99 (2007).
- [10] P. Guillot, A. Colin e A. Ajdari. «Stability of a jet in confined pressure-driven biphasic flows at low Reynolds number in various geometries». In: *Physical review Journals* 78(1, Part 2 (2008).
- [11] Marco Serra et al. «The power of solid supports in multiphase and droplet-based microfluidics: towards clinical applications». In: *The Royal Society of Chemistry* 17 (2017).
- [12] Francesca Tesser. «Production of monodispersed droplets in a T-junction device». Tesi di laurea magistrale. Dip. di Fisica Galileo Galilei - Università degli Studi di Padova, 2012.
- [13] Helen Song, Joshua D. Tice e Rustem F. Ismagilov. «A Microfluidic System for Controlling Reaction Networks in Time». In: *Angewandte Chemie International Edition* 42 (2003).
- [14] *3MTM NovecTM 7500 Engineered Fluid*. URL: <https://multimedia.3m.com/mws/media/654960/3m-novec-7500-engineered-fluid.pdf>.
- [15] *Dynabeads® MyOneTM Carboxylic Acid*. URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%5C%3A%5C%2F%5C%2Fassets.thermofisher.com%5C%2FTFS-Assets%5C%2FLSG%5C%2Fmanuals%5C%2F65011_65012_Dynabeads_MyOne_Carboxylic_Acid_PI.pdf&title=RHluYWJlYWRzIE15T25lIENhcmJveHlsaWNgQWNpZA==.