



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

**Studio dei processi per la coalescenza di due o più gocce
in dispositivi microfluidici**

Relatore

Prof. Davide Ferraro

Laureanda

Sara Zambotto

Anno Accademico 2022-2023

Abstract

La microfluidica è la scienza che studia come manipolare piccole quantità di fluidi (dell'ordine dei nanolitri) attraverso canali di dimensioni micrometriche. Grazie alla microfluidica, negli ultimi 20 anni è stato sviluppato il concetto di Lab-on-a-Chip, che consiste nell'integrazione di analisi chimiche e biologiche in piccoli dispositivi. Un settore della microfluidica, detta microfluidica di gocce, prevede la produzione di emulsioni altamente controllate, che permettono di ridurre ulteriormente i volumi manipolati (dell'ordine del picolitro). In ambito biotecnologico, i dispositivi di microfluidica di gocce possono essere utilizzati per incapsulare singole molecole o singole cellule. Per garantire la separazione delle gocce, vengono tipicamente impiegati tensioattivi (o surfattanti) specifici che ne impediscono la coalescenza. Tuttavia, per mescolare reagenti contenuti in gocce diverse, a volte risulta necessario destabilizzare localmente la loro interfaccia, ottenendo l'unione di più gocce. Questa procedura può essere ottenuta tramite varie strategie, per esempio applicando campi elettrici, onde acustiche o metodi ottici. In questa tesi si approfondiranno queste metodologie da un punto di vista bibliografico, per andare infine ad applicare quella più promettente con un'attività sperimentale di laboratorio.

Indice

Abstract.....	3
Capitolo 1: Introduzione alla microfluidica.....	5
Microfluidica di gocce.....	5
Generazione e moto di gocce in microcanali.....	7
Utilizzo dei surfattanti.....	8
Capitolo 2: Coalescenza di gocce.....	11
Coalescenza mediante onde acustiche superficiali.....	13
Coalescenza mediante metodi ottici.....	15
Elettrocoalescenza.....	16
Capitolo 3: Fabbricazione ed utilizzo di dispositivi per la coalescenza di gocce tramite campi elettrici in laboratorio.....	19
Gocce prodotte con canale a T e campo generato con aghi metallici.....	19
Assottigliamento capillare.....	20
Gocce a contatto tramite produzione manuale.....	21
Campo elettrico prodotto con elettrodi di rame.....	21
Utilizzo di un chip con degli elettrodi interdigitati.....	22
Replica con PDMS su master di silicio.....	22
Considerazioni e conclusioni.....	25
Bibliografia.....	27

Capitolo 1: Introduzione alla microfluidica

La microfluidica è la disciplina che si occupa dello studio e della manipolazione di fluidi confinati in canali di dimensioni micrometriche [1]. Per manipolare volumi di fluidi piccoli è necessario disporre di strumenti capaci di gestire quantità così piccole di liquidi o gas con estrema precisione, detti dispositivi microfluidici (Figura 1). Quest'ultimi sono oggi utilizzati in molti ambiti scientifici come la biologia, la chimica, la medicina e l'ingegneria.

Infatti, tramite i dispositivi microfluidici, è possibile eseguire una serie di operazioni come reazioni chimiche su piccola scala, generazione di gradienti di concentrazione di prodotti chimici molto precisi, rivelazione di agenti patogeni ed altre sostanze, miscelazione e separazione, e, in particolar modo per quanto riguarda la branca della microfluidica di gocce, analisi e manipolazione di cellule, molecole di DNA o particelle.

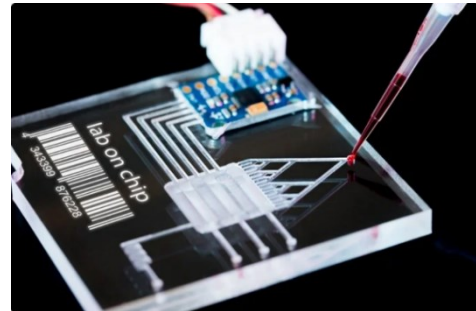


Figura 1 [10]: esempio di dispositivo microfluidico

L'utilizzo della microfluidica in ambito biologico e farmaceutico, presenta infatti numerosi vantaggi come, per esempio, la riduzione del consumo di campioni e reagenti, richiedendone piccole quantità, e di conseguenza, la riduzione degli sprechi e dei costi ad essi associati. A questo si aggiunge anche una riduzione dell'impatto ambientale dovuta alla minor quantità di rifiuti prodotti. Altri vantaggi sono una precisione ed un controllo molto alti del flusso dei fluidi e delle reazioni chimiche dovuti alla dimensione dei canali, alla velocità ed alla reattività dei processi chimici che accelerano la ricerca e lo sviluppo di nuovi prodotti.

Infine, è interessante sottolineare come la microfluidica si presenti come un campo di ricerca interdisciplinare: i dispositivi microfluidici possono, infatti, essere integrati con tecnologie come la microelettronica ed i sensori, aprendo nuove possibilità per applicazioni avanzate in vari settori scientifici e industriali.

Microfluidica di gocce

Uno specifico ambito di ricerca della microfluidica è la microfluidica di gocce, che si concentra sulla manipolazione di piccole gocce di fluidi immiscibili all'interno di dispositivi microfluidici. Questa tecnologia permette di gestire con grande precisione e controllo il flusso,

la separazione e le reazioni chimiche all'interno di gocce di dimensioni di poche centinaia di micron.

Sono due le motivazioni principali che rendono la manipolazione di gocce in canali microfluidici una materia di ricerca fondamentale nel panorama scientifico e tecnologico: da una parte il desiderio di produrre gocce ben calibrate per applicazioni di scienza dei materiali; in questo caso, infatti, la microfluidica ha gli strumenti adatti a fornire la possibilità di implementare un processo di produzione di gocce controllato e riproducibile che permetta l'esecuzione di operazioni anche molto complesse. Dall'altra parte troviamo tutte le applicazioni di tipo biochimico in cui le gocce vengono trattate come microreattori che regolano le reazioni chimiche tra analiti incapsulati all'interno delle gocce prodotte [1].

Per di più, l'utilizzo di gocce semplifica ulteriormente la manipolazione di piccoli volumi: l'introduzione di gocce comporta, infatti, la creazione di nuovi contrasti fisici e chimici con il mezzo esterno, come la variazione della costante dielettrica e della tensione interfacciale, permettendo la manipolazione di piccoli volumi in modo più agevole.

Questi vantaggi, tuttavia, portano con sé altrettante difficoltà relative, soprattutto, all'interfaccia deformabile delle gocce, che influenza in modo significativo i processi di coalescenza e separazione delle stesse.

Rifacendosi ad un linguaggio più fisico, si può dire che le gocce introducono leggi non lineari nei flussi di Stokes, altrimenti lineari [1].

Possiamo descrivere la miscela in cui sono presenti delle gocce come un'emulsione composta da due fasi immiscibili, in cui la fase dispersa forma le gocce nella fase continua. Tipicamente per applicazioni biomedicali, le gocce sono in fase acquosa, mentre la fase continua è composta da un olio.

La principale modifica al flusso in microcanale apportata dalle gocce riguarda l'introduzione della tensione interfacciale γ . Essa può essere considerata come un'energia per unità di superficie ($J m^{-2}$) che agisce per minimizzare l'area superficiale totale in modo da ridurre l'energia libera all'interfaccia. Uno squilibrio spaziale nel valore di γ comporta un flusso lungo l'interfaccia da una zona a bassa tensione interfacciale ad una ad alta tensione interfacciale. Tale fenomeno è noto come *effetto Marangoni* [1].

Si vedrà successivamente come l'introduzione di tensioattivi vada a modificare il valore della tensione interfacciale e abbia importanti conseguenze per la generazione e la coalescenza di gocce.

Generazione e moto di gocce in microcanali

Esistono diverse possibilità per la generazione di gocce in microcanali; le gocce prodotte durante la fase sperimentale descritta in seguito, sono caratterizzate da un diametro superiore al diametro interno del microcanale, configurazione che provoca la loro deformazione rispetto ad una alla forma sferica. Per produrle si sono utilizzati i primi due dei tre metodi qui descritti:

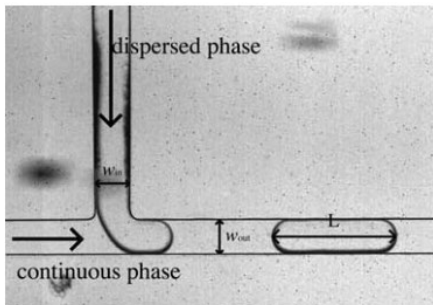


Figura 2 [1]: T-junction

T-junction (Figura 2): in questo metodo due fluidi immiscibili (uno continuo ed uno disperso) sono fatti confluire in un canale a forma di T. L'instabilità di trasporto nell'area di giunzione del canale porta alla generazione di gocce a intervalli regolari. Questo metodo è relativamente semplice e permette una generazione di gocce omogenee e controllate. Variando le condizioni di

flusso, le proprietà dei fluidi o la geometria dei canali, infatti, è possibile ottenere gocce di dimensioni specifiche e con una frequenza desiderata [1].

Produzione manuale: in questo metodo le gocce vengono generate manualmente attraverso l'utilizzo di pompe a siringa che possono sia iniettare che aspirare le fasi continua e dispersa contenute in due distinte siringhe o provette. In questo modo è possibile

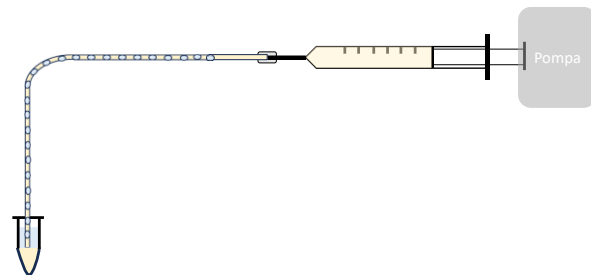


Figura 3: produzione manuale di gocce

generare gocce a distanze molto ravvicinate, utili per effettuare esperimenti di coalescenza. Lo schema in Figura 3 fa riferimento al metodo utilizzato durante la parte sperimentale: si collega una siringa, già riempita con la fase continua, ad una pompa che agisca sul suo pistone tramite un'azione aspirante. All'estremità della siringa viene collegato un capillare che funge da canale microfluidico, anch'esso già pieno di olio in modo tale che non si creino bolle di aria. L'altra estremità del capillare, lungo una trentina di centimetri, viene inserita in una provetta riempita per metà di olio e per metà di acqua (le due fasi restano ben separate perché non miscibili). Si procede aspirando una piccola quantità di olio e, dopo aver immerso l'estremità del capillare nella fase acquosa, una quantità di acqua più o meno grande in base al volume delle gocce che si vogliono generare.

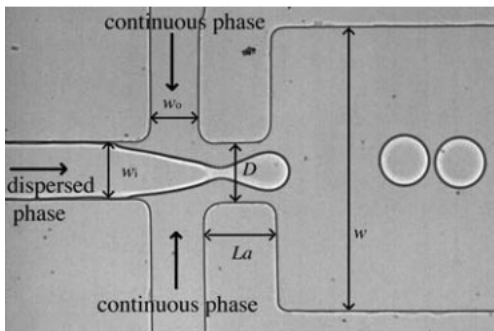


Figura 4 [1]: flow-focusing

Flow-focusing: in questo metodo la fase dispersa viene schiacciata da due flussi contro-fluenti di fase continua, forzando la generazione delle gocce, come illustrato in Figura 4.

Per quanto riguarda il moto delle gocce nel microcanale, esso dipende fortemente dalla dimensione di queste: gocce di dimensione minore si muoveranno con una velocità maggiore, rispetto a gocce di dimensioni maggiori. La ragione fisica di tale comportamento è riscontrabile in due principali fattori: la resistenza viscosa, che agisce maggiormente sulle gocce più grandi avendo esse una maggiore superficie in contatto con il fluido circostante e l'effetto delle pareti che possono rallentare il movimento delle gocce più grandi a causa della maggiore interazione di queste con la superficie del canale [1]. Questo principio verrà sfruttato per portare a contatto gocce inizialmente separate; si vedrà infatti che il contatto tra gocce consecutive è una configurazione necessaria, ma non sufficiente, per ottenere coalescenza tra esse.

Utilizzo dei surfattanti

I surfattanti, noti anche come tensioattivi, sono composti chimici che hanno la capacità di ridurre la tensione superficiale tra due fasi immiscibili, una delle quali, nel caso della microfluidica a gocce, costituisce le gocce stesse.

Il vantaggio nell'utilizzo volontario di essi risiede nella loro capacità di stabilizzare le gocce, risultando, così, fondamentali per i processi di generazione e trasporto di gocce.

Come dice il nome, essi sono degli "agenti attivi in superficie": molecole anfifiliche, contenenti, quindi, sia un gruppo idrofilo, in testa, che una lunga coda, costituita da un gruppo idrofobo [2]. Questa configurazione spinge le molecole di tensioattivo a legarsi all'interfaccia delle gocce, diminuendo la tensione superficiale tra le due fasi.

In dettaglio, la diminuzione della tensione superficiale è proporzionale alla quantità di molecole di tensioattivo assorbite dall'interfaccia. La concentrazione sulla superficie delle gocce di tali molecole può essere quantificata dalla formula $\Gamma = -\frac{c}{RT} \frac{d\gamma}{dc}$ [2], dove c è la concentrazione

massiva del tensioattivo, T la temperatura, R la costante dei gas e γ la tensione superficiale. Questa proprietà risulta molto utile nel processo di generazione di gocce, per esempio tramite la T-junction, in cui è necessario rompere l'interfaccia acqua-olio al fine di creare le gocce; se il valore della tensione interfacciale, infatti, viene ridotto attraverso l'aggiunta di tensioattivi, la rottura dell'interfaccia avverrà più facilmente.

Un fenomeno che si crea durante il moto delle gocce di acqua in olio che riguarda anche la presenza di tensioattivi è il già citato effetto Marangoni. Quest'ultimo prevede che, quando la goccia si muove, le molecole di tensioattivo si spostino lungo l'interfaccia, come mostrato in Figura 5(B) [2], aumentando la loro concentrazione nella parte posteriore.

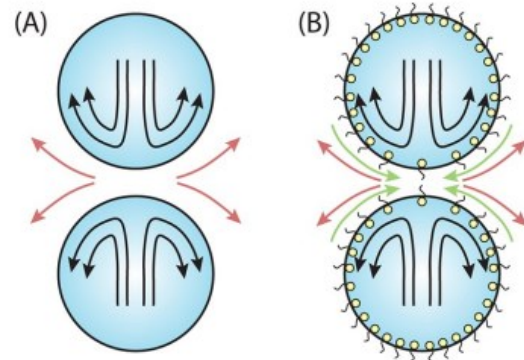


Figura 5 [3]: effetto Marangoni; (A): assenza tensioattivo, (B): presenza tensioattivo

Questo movimento genera un gradiente di tensione superficiale (la tensione è minore nella parte posteriore) dovuto alla diversa concentrazione di tensioattivo sulla superficie della goccia. Il gradiente di tensione, generando una forza che si oppone al moto della goccia (evidenziata dalle frecce verdi in Figura 5(B)), ha, così, l'effetto di rallentarla.

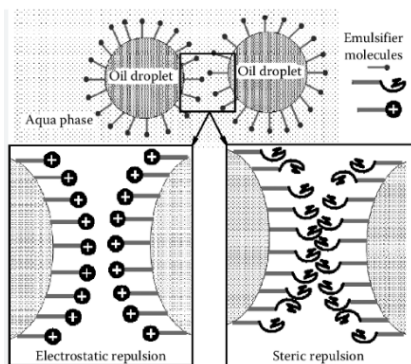


Figura 6 [11]: repulsione elettrostatica e repulsione sterica

Per quanto riguarda la coalescenza di gocce, invece, il tensioattivo ostacola il processo di coalescenza, stabilizzando le gocce di acqua in olio, attraverso due meccanismi non mutuamente esclusivi: la repulsione sterica e la repulsione elettrostatica, schematizzate in Figura 6.

La repulsione elettrostatica sfrutta la formazione di cariche elettriche sulla superficie delle molecole di tensioattivo che tenderanno a respingersi. Essa è tipica dei tensioattivi ionici.

La repulsione sterica, invece, è dovuta alla presenza stessa delle code idrofobe del tensioattivo, che ostacolano fisicamente il contatto tra le gocce di acqua. Approfondendo questo aspetto, si può immaginare come due gocce di acqua a contatto, in assenza di stabilizzanti, si uniscano, creando un'unica goccia sferica per ridurre l'energia libera all'interfaccia. Se però, vengono aggiunte le molecole di tensioattivo che andranno a posizionarsi lungo la superficie delle gocce, avendo una testa polare, le superfici di due gocce

vicine non riusciranno a venire a contatto, ostacolate dalle lunghe catene di molecole idrofobe interposte tra loro e quindi non riusciranno ad unirsi.

Capitolo 2: Coalescenza di gocce

La coalescenza di gocce è l'operazione che consente di realizzare reazioni chimiche mettendo a contatto i reagenti precedentemente isolati nelle singole gocce. Si osserva però, che il semplice contatto tra le gocce non comporta sempre la loro coalescenza spontanea, specialmente se in presenza di surfattanti, come esposto nel precedente capitolo [3].

In dettaglio, due gocce si fondono quando il sottile film di olio tra di loro diventa instabile e viene drenato. La coalescenza di due gocce dipende, quindi, dal superamento degli effetti stabilizzanti, come l'utilizzo di tensioattivi nell'emulsione, per rompere il film che le separa. Affinché avvenga la coalescenza è necessario che si venga a creare un ponte localizzato tra due gocce adiacenti: la generazione di questo ponte, infatti, crea nella goccia una regione con curvatura concava, che corrisponde ad una regione di bassa pressione all'interno della goccia. A questo punto, il fluido interno alla goccia è portato a fluire verso la zona a bassa pressione, aumentando le dimensioni della goccia finale, come mostrato in Figura 7 [1].

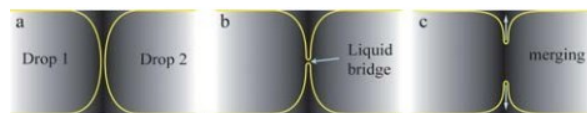


Figura 7 [1]: coalescenza di gocce

La coalescenza dipende da vari parametri, tra cui il tipo di tensioattivi utilizzati, l'angolo di contatto, il numero capillare Ca , la viscosità del fluido e la geometria del canale [3]. Il numero capillare Ca è definito come il rapporto tra le forze viscosive e le forze capillari che agiscono su un fluido in un canale o in un capillare, e può essere calcolato utilizzando la seguente formula $Ca = \frac{\mu v}{\gamma}$, dove μ è la viscosità maggiore che agisce sul sistema e v rappresenta una scala di velocità caratteristica [1].

In assenza di tensioattivi, gocce acquose in mezzo oleoso si fondono spontaneamente. Esiste una formula che regola i tempi di coalescenza in assenza di tensioattivi: $t = 40r \sqrt{\frac{\mu}{\gamma u}}$ dove r è il raggio delle gocce, μ la viscosità, γ la tensione interfacciale e u la velocità di avvicinamento costante delle gocce. In questo caso, semplicemente, il film di olio interposto tra le gocce viene drenato, come mostrato dalle frecce nere in Figura 5(A), le forze intermolecolari si rafforzano e portano alla rottura dell'interfaccia goccia-goccia e quindi alla coalescenza. Tempi

caratteristici per questo processo corrispondono a decine di millisecondo [3]. Diversamente, in presenza di tensioattivi, si sviluppano gli effetti repulsivi illustrati nel paragrafo precedente, che impediscono la coalescenza spontanea delle gocce.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi metodi per ottenere la coalescenza tra gocce in microcanali in presenza di tensioattivi. Essi prevedono di portare prima le gocce a contatto e, successivamente introdurre una perturbazione del film che le separa, portando alla loro coalescenza.

Avvicinamento delle gocce

Per avvicinare le gocce in moto all'interno di un canale microfluidico si può procedere in diversi modi, suddivisibili in due categorie: metodi attivi e metodi passivi. Tra i metodi passivi si annoverano la modulazione della geometria del canale atta a rallentare la goccia in testa e farla raggiungere dalla goccia successiva e la produzione di gocce di diversa dimensione, cosicché le gocce di dimensione minore possano avere velocità maggiore e raggiungere le gocce di dimensione maggiore, più lente. Un metodo attivo, invece, può essere rappresentato dall'utilizzo dell'attrazione elettrostatica tra gocce cariche [1].

Metodi di coalescenza passivi

Un esempio di metodo di coalescenza passiva è stato studiato da Bremond *ed at.* [4] (Figura 8) utilizzando un canale che inizialmente si allarga e successivamente torna alla dimensione iniziale, provocando la coalescenza di due gocce consecutive in corrispondenza del restringimento del canale. Questo tipo di coalescenza viene detto “a decompressione”: quando una goccia entra nella sezione di diametro maggiore,

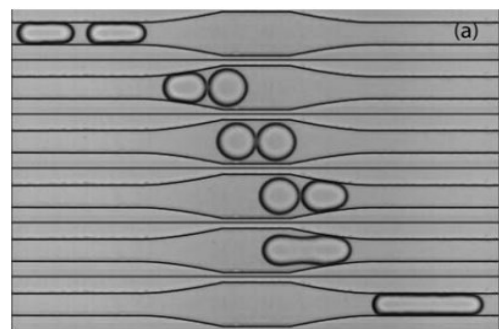


Figura 8 [1]: metodo di coalescenza passivo

rallenta e viene raggiunta dalla goccia successiva; le due gocce quasi a contatto arrivano, quindi, nella regione di restringimento dove si osserva la formazione di strutture appuntite sulla superficie delle gocce, che, diminuendo la distanza tra quest'ultime, inducono la formazione di ponti liquidi, agevolandone, così, la coalescenza. Si ipotizza anche che la formazione di queste protuberanze, provocando un rapido aumento dell'area superficiale a livello locale, provochi

una temporanea riduzione della concentrazione di tensioattivo in questa regione, favorendo la coalescenza.

Metodi di coalescenza attivi

Sono stati testati diversi metodi per unire attivamente le gocce. I tre principali ritrovati in letteratura utilizzano le onde acustiche, i laser e i campi elettrici. Si riportano di seguito le caratteristiche principali dei tre metodi studiati accompagnati dai loro vantaggi e svantaggi.

Coalescenza mediante onde acustiche superficiali

Nello studio di Sesen *et al.* [3], un'onda acustica superficiale a fascio stretto, applicata in modo mirato al canale microfluidico, provoca la coalescenza di due gocce vicine, precedentemente stabilizzate grazie all'utilizzo di tensioattivi.

Le onde acustiche utilizzate in questi esperimenti prendono il nome SAW (Surface Acoustic Waves) e sono onde di tipo Rayleigh che si propagano su substrati piezoelettrici, materiali aventi la capacità di generare una tensione elettrica quando vengono sottoposti ad uno sforzo meccanico, o di deformarsi quando viene applicata una tensione elettrica.

Le SAW sono generate da un campo elettrico AC, generato dagli elettrodi posizionati sullo strato di materiale piezoelettrico; gli elettrodi (IDTs) sono distanziati di $\lambda/2$, dove λ è la lunghezza dell'onda acustica, come mostrato in Figura 9. Le onde vengono prodotte quando la frequenza del segnale elettrico soddisfa $f = \frac{c_s}{\lambda}$, con c_s velocità del suono nel substrato, grazie all'accoppiamento tra quest'ultimo e gli elettrodi. Le onde prodotte hanno ampiezza nanometrica e non penetrano in profondità, conservando la loro energia (proprietà delle onde Rayleigh), questo gli permette di arrivare alla zona di applicazione con perdite minime.

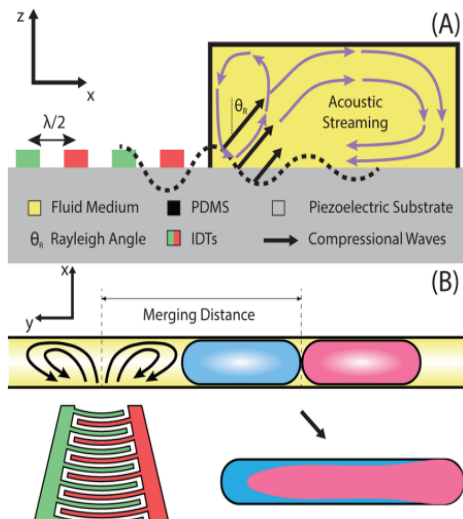


Figura 9 [3]: produzione flusso circolatorio nel piano xz (A) e xy (B)

Le SAW, al contatto con il fluido, rifrangono con l'angolo di Rayleigh, provocando delle onde di compressione in quest'ultimo; tale accoppiamento può essere utilizzato per destabilizzare l'interfaccia delle gocce. La trasmissione delle onde nel fluido è causata dalla rifrazione dell'angolo di Rayleigh e dall'aumento della pressione man mano che ci si allontana dagli elettrodi, questo, infatti, determina un flusso circolatorio nel piano xz, come mostrato in Figura 9(A) e nel piano xy, come mostrato in Figura 9(B).

La velocità del flusso acustico così prodotto è influenzata dall'ampiezza delle onde, dalla loro frequenza, dalla lunghezza di attenuazione del fascio e dalla conformazione geometrica del dispositivo microfluidico, come l'altezza e lo spessore della parete del canale.

Gli effetti mediati nel tempo delle onde SAW possono essere considerati analoghi a quelli di un impulso di pressione generato tramite una valvola a membrana: la pressione locale aumenta in modo significativo e in breve tempo, provocando il frenamento del flusso del liquido in corrispondenza del punto di produzione delle onde. L'effetto che, secondo lo studio analizzato [3], potrebbe essere responsabile del processo di coalescenza delle gocce è da ricercarsi nel disturbo che il flusso acustico genera sul flusso del fluido e sull'interfaccia goccia-goccia: onde da 126 MHz e 1W, indirizzate sull'olio per 50 ms, accoppiandosi con il liquido ed influenzando l'interfaccia tra le gocce, la destabilizzano, fino a portare le gocce a coalescenza.

Un'altra ipotesi è, invece, basata sulla possibilità di modificare la distribuzione di surfattanti all'interfaccia della goccia. In dettaglio, in Figura 10 è possibile vedere come il flusso generato dalle onde acustiche deformi la prima goccia facendole assumere una forma asimmetrica, che sembra seguire le linee di flusso. Questo potrebbe provocare il momentaneo trasporto del tensioattivo che circonda le gocce e quindi causare coalescenza secondo la spiegazione fisica fornita in precedenza.

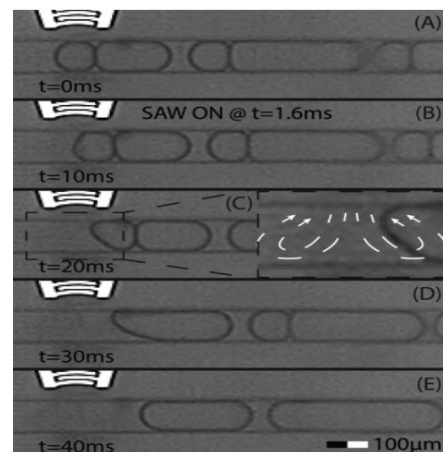


Figura 10 [3]: effetto onde acustiche sulle gocce

Un'altra ipotesi è che la deformazione dell'interfaccia causi un cambiamento della tensione superficiale all'interfaccia, ottenendo così, il medesimo risultato.

Il vantaggio principale nell'utilizzo di questa tecnica è la selettività. La mancanza di esposizione diretta della gocciolina allo stimolo di eccitazione, inoltre, rende questo metodo particolarmente adatto per lo studio di campioni sensibili, non provocando nessun danno al campione. Altro vantaggio è rappresentato dall'utilizzo di un canale rettilineo, senza particolari configurazioni, che rende questa tecnica di facile progettazione e integrazione in sistemi microfluidici più complessi.

La sua funzionalità non è, infine, influenzata dalla concentrazione di tensioattivi e dal volume delle gocce, caratteristiche che la rendono molto versatile [3].

Coalescenza mediante metodi ottici

Come già spiegato in precedenza, per giungere alla coalescenza delle gocce in presenza di surfattanti è necessario evacuare le molecole di tensioattivo, e con esse lo strato di olio, giacente tra le interfacce. Tale risultato è ottenibile per mezzo del riscaldamento localizzato in prossimità delle interfacce quasi a contatto. Si rende fondamentale, prima di tutto, mantenere ferma una goccia all'interno del capillare microfluidico. Quest'ultima operazione può essere eseguita sempre tramite il riscaldamento localizzato; è possibile, infatti, produrre una forza dell'ordine dei mN riscaldando, per mezzo di un laser, l'interfaccia goccia-olio-surfattante [5]. Come si può osservare in Figura 12, una volta fermata la goccia interessata alla coalescenza, essa verrà raggiunta dalla successiva e si verrà a creare la configurazione di due gocce ferme separate da uno strato lipidico. A questo punto, il riscaldamento dovuto al laser, destabilizza il film lipidico presente tra le gocce, spostando le molecole di tensioattivo presenti tra di esse e favorendone, così, la coalescenza.

Nell'esperimento considerato [5] in Figura 12 si osserva che la tensione superficiale aumenta all'aumentare della temperatura; questo fenomeno anomalo si suppone essere associato alla presenza di tensioattivi. Ciò porta la goccia ad allontanarsi dal punto caldo e quindi a frenare il suo moto. Una volta che la goccia rallenta e viene raggiunta dalla successiva, le due gocce avanzano a contatto fino a quando non sono in prossimità del laser; a questo punto si nota l'azione del riscaldamento che drena il film di olio tra le gocce portandole ad unirsi (Figura 12).

Nella Figura 11, invece, è possibile vedere un treno di gocce, in cui due gocce consecutive si fondono in prossimità della zona riscaldata dal laser.

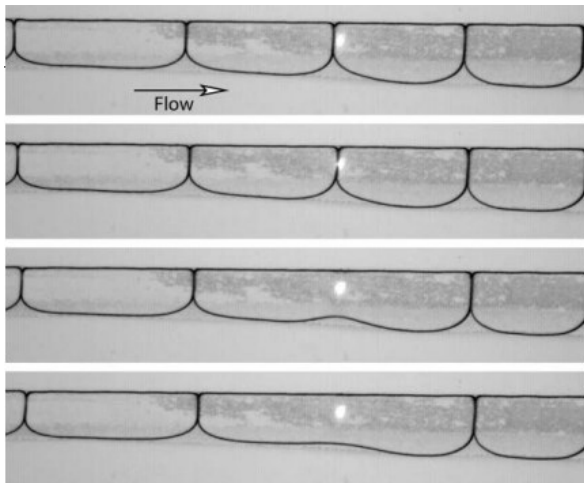


Figura 12 [5]: coalescenza tramite laser di un treno di gocce

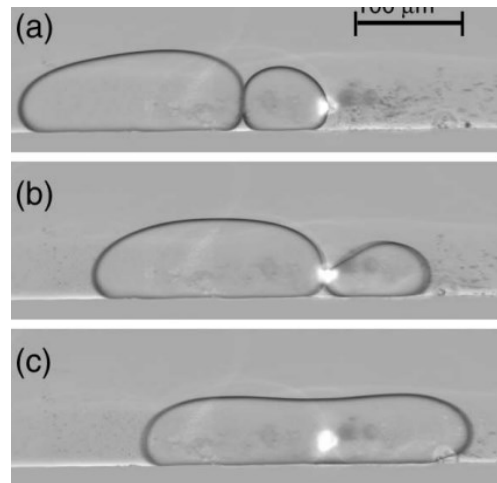


Figura 11 [5]: coalescenza di gocce tramite laser

Questa tecnica può essere applicata in modo relativamente semplice e consente di implementare parallelamente diversi sistemi di canali con configurazioni anche complesse. Potendo, inoltre, agire sulla lunghezza d'onda del laser, si può variare in modo accurato il riscaldamento dell'olio e quindi l'effetto desiderato. Dal momento che questa tecnica sfrutta la dominanza degli effetti di superficie, è in aggiunta, possibile miniaturizzare ulteriormente il sistema: tale approccio consentirebbe anche di aumentare la forza prodotta dal riscaldamento che si è provato scalare come $\frac{1}{R}$, dove R è il raggio della goccia e di ridurre il tempo di risposta che sembrerebbe scalare con la grandezza del sistema [5].

Elettrocoalescenza

L'elettrocoalescenza si verifica quando gocce ad alta conducibilità immerse in un mezzo a bassa conducibilità vengono sottoposte ad un campo elettrico. I due criteri fondamentali per la creazione di un sistema efficace sono la facilità della sua implementazione e la minimizzazione del rischio di contaminazione del contenuto biologico eventualmente presente nelle gocce coinvolte [6].

Nello studio presentato da Chabert *et al.* [6] vengono utilizzati due elettrodi esterni collegati ad una corrente alternata (campi elettrici tipici di 10 kV/cm e 500 Hz) e non a contatto con le gocce, per soddisfare il secondo criterio sopra esposto.

Un vantaggio dell'utilizzo dei campi elettrici risiede nella funzione delle forze elettriche generate di frenare le gocce, non dovendo in questo modo ricorrere ad altri espedienti meccanici per posizionare le gocce a contatto.

Principi fisici dell'elettrocoalescenza in sistemi non vincolati

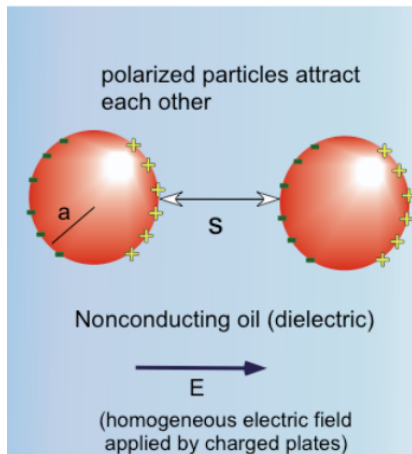


Figura 13 [12]: elettrocoalescenza in sistemi non vincolati

Per studiare la fisica dei fenomeni di elettrocoalescenza si considerano sistemi non vincolati di gocce libere di muoversi lontane dalle pareti. Il fenomeno prevede che le gocce abbiano conducibilità molto più alta di quella del mezzo circostante. In questo modo il campo elettrico si annulla all'interno delle gocce, rimanendo presente nella fase oleosa, in cui le gocce generano un effetto che può essere approssimato da perturbazioni dipolari situate al centro delle stesse (Figura 13). Tale approssimazione è valida solo se il campo elettrico (inteso come quello che

sarebbe presente nella fase oleosa in assenza delle gocce) è uniforme lontano dalle gocce, configurazione talvolta difficile da ottenere per sistemi microfluidici.

Quando due gocce si trovano in prossimità del campo elettrico i loro dipoli si allineano generando una forza coulombiana attrattiva tra loro. Tale forza è proporzionale al quadrato del campo elettrico e ciò consente di applicare quest'ultimo sia in corrente continua che alternata [6].

Quando le due gocce sono distanti la forza attrattiva decade come $\frac{1}{r^4}$, dove r è la distanza tra i centri delle gocce. Al contrario, quando due gocce sono vicine, il riarrangiamento delle cariche superficiali e il potenziamento del campo elettrico dovuto alle cariche di polarizzazione, provocano un aumento della forza attrattiva.

Elettrocoalescenza in presenza di surfattanti

Nel caso in cui le gocce da unire siano stabilizzate da tensioattivi, la funzione principale dell'utilizzo dei campi elettrici diventa quella di destabilizzare il film lipidico presente tra le interfacce delle gocce per portarle alla coalescenza.

Ciò viene fisicamente spiegato secondo un principio che prevede che il campo elettrico sia capace di riorientare le molecole polari del tensioattivo ed allinearle lungo le linee di campo, esercitando una forza elettrica sui loro dipoli. Tale riarrangiamento dei tensioattivi può portare a variazioni della tensione superficiale o, addirittura, svuotare certe zone della superficie delle gocce. Questo effetto va a sommarsi ad altri due effetti dovuti al campo elettrico: la deformazione del campo stesso in corrispondenza della superficie delle gocce, dovuta al contrasto fisico tra la soluzione acquosa e quella lipidica, e la variazione della forma dell'interfaccia in risposta ad un flusso interno ed uno esterno generato al confine tra la goccia ed il mezzo continuo. Quest'ultimo flusso descritto è dovuto ad una sollecitazione tangenziale ed una normale indotte dalle cariche libere che si accumulano all'interfaccia. La somma di questi fenomeni può portare alla coalescenza delle gocce [7].

In Figura 14(a) è possibile vedere un esempio di dispositivo per l'elettrocoalescenza, al quale ci si è ispirati durante la fase sperimentale: gocce di diversa dimensione vengono prodotte tramite la tecnica della T-junction e vengono condotte in un unico canale, in cui la più piccola raggiunge la più grande. Una volta a contatto, vengono trasportate in una regione compresa tra due elettrodi posizionati perpendicolarmente alla direzione del flusso e distanti tra loro $200\ \mu\text{m}$ con cui viene applicato un potenziale elettrico di $100\ \text{V}$ in corrente alternata a $1\ \text{kHz}$ [8]; in questa zona si può osservare la coalescenza delle gocce (Figura 14(c)).

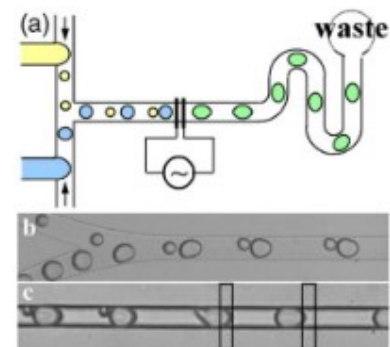


Figura 14 [8]: esempio di dispositivo per elettrocoalescenza

Capitolo 3: Fabbricazione ed utilizzo di dispositivi per la coalescenza di gocce tramite campi elettrici in laboratorio

Dopo aver studiato alcune possibilità di configurazione per lo studio della coalescenza di gocce tramite l'utilizzo di campi elettrici, abbiamo tentato di replicare in laboratorio questo fenomeno seguendo diversi approcci di seguito illustrati.

Gocce prodotte con canale a T e campo generato con aghi metallici.

Come primo passo per la produzione delle gocce si preparano le soluzioni per la fase continua e quella dispersa. Per la fase continua viene utilizzato un olio (Novec 7500) mescolato con il surfattante Krytox al 2% v/v; la fase dispersa è invece costituita da acqua ultra-pura e inchiostro nero (Pelikan), al fine di visualizzare più facilmente le gocce generate.

Si utilizza un dispositivo per la generazione di gocce a T-junction, con i canali di 200 μm in altezza e 300 μm in larghezza come quello mostrato in Figura 2, in cui si collega al canale A, tramite un capillare microfluidico, una pompa a siringa che inietti la soluzione acquosa, precedentemente preparata, ed al canale B una seconda pompa a siringa che inietti la fase continua. Impostando, poi, le pompe a velocità differenti si generano gocce di diversa grandezza a diverse distanze, ma mai a contatto, che vengono flussate in un capillare di uscita di PTFE avente un diametro interno di 0,5mm ed esterno di 1mm. Esso viene poi fissato ad un supporto per l'applicazione del campo elettrico e la visualizzazione delle gocce. Ciò è rappresentato in Figura 15.

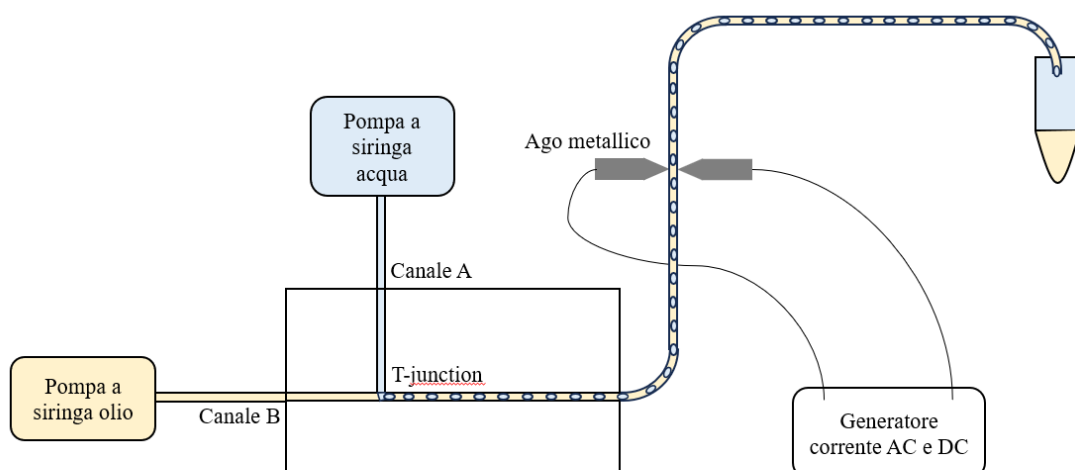


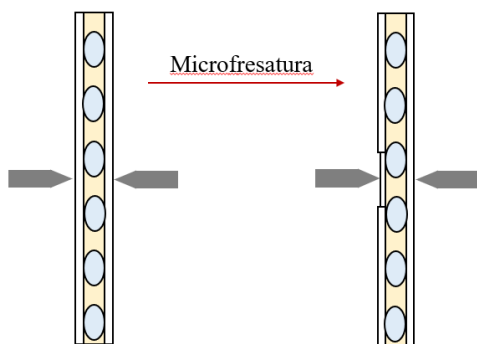
Figura 15: gocce prodotte con canale a T e campo generato con aghi metallici

L'applicazione del campo elettrico, in questa configurazione, viene fatta tramite due punte metalliche, costruite utilizzando due aghi da insulina G25 in cui sono stati inseriti due fili di rame dal diametro di circa 0.1 mm, le cui punte vengono avvicinate quanto più possibile al capillare in cui scorrono le gocce generate, se possibile, toccandolo. Le punte metalliche, che costituiscono gli elettrodi, vengono collegate ai generatori di corrente continua o alternata, tramite cavi elettrici, come mostrato in Figura 15.

Per l'osservazione si utilizza inizialmente una telecamera digitale (Dinolite) e, successivamente, una telecamera Basler con un sensore CMOS accoppiato con un obiettivo da microscopio 10x e 4x, illuminando il canale dal basso.

Vengono applicati campi elettrici sia in corrente continua, tramite un generatore che eroga un massimo di 400 V, sia in corrente alternata, tramite un generatore di funzioni collegato ad un trasformatore a 38 spire. Il voltaggio massimo raggiunto è di 200 V (rms) e la frequenza di circa 11 kHz, ma non si nota nessuna modifica nel moto e nella forma delle gocce, sia che esse scorrano nel canale, sia che siano ferme nella regione sottoposta al campo elettrico.

Assottigliamento capillare



Si decide, allora, di cercare di diminuire l'effetto attenuante sul campo elettrico dato dallo spessore del PTFE di cui è costruito il capillare microfluidico. Per ottenere ciò si sostituisce il canale in uscita con uno che abbia un tratto assottigliato tramite microfresatura e si posizionano gli aghi in corrispondenza di quel

Figura 16: microfresatura in corrispondenza punto (Figura 16). Si fanno scorrere le gocce degli aghi metallici all'interno di questo canale e, applicando nuovamente i campi elettrici della precedente configurazione, non si nota nessun effetto sulle gocce.

Si ipotizza, allora, che le cause possano risiedere sia nella distanza tra le gocce, sia nella non uniformità del campo elettrico prodotto con le punte metalliche.

Gocce a contatto tramite produzione manuale

Si procede, quindi, a diminuire quanto più possibile la distanza tra le gocce, fino a produrle a contatto, condizione ritenuta necessaria affinché avvenga la coalescenza. Per ottenere ciò si opera su due fronti: in primo luogo si passa alla produzione manuale di gocce ed in secondo luogo si modifica la composizione delle fasi continua e dispersa.

Le gocce vengono prodotte manualmente, come spiegato nel relativo paragrafo, in un capillare di PTFE (diametro interno 0,5mm ed esterno 1mm). Per generare gocce molto piccole, che nel canale risultino quasi sferiche, il metodo risultato più efficace, è quello di non aspirare mentre l'entrata del microcanale si trova immersa in acqua, ma spostarla solamente tra le due fasi quando si vuole generare una goccia ed aspirare solo nella fase continua.

Per la fase dispersa si sostituisce dapprima l'inchiostro con un colorante alimentare verde, in quanto si suppone che all'interno dell'inchiostro siano presenti dei tensioattivi che stabilizzino ulteriormente le gocce e poi, si utilizza solamente acqua pura; mentre, per la fase continua, si diminuisce la concentrazione di Krytox nell'olio dal 2% al 0,5% v/v.

In questo modo, sempre riferendosi al paragrafo relativo alla produzione manuale di gocce (pagina 7), è possibile intervallare la generazione di gocce più lunghe (aspirando anche quando l'entrata del microcanale è immersa in acqua) alla generazione di gocce quasi sferiche (immergendo l'entrata del microcanale in acqua senza aspirare). Facendo, poi, scorrere le gocce nel microcanale, grazie all'utilizzo di una pompa a siringa, le gocce di dimensione minore, avendo velocità maggiore, raggiungono quelle più lunghe per il principio fisico spiegato nel paragrafo relativo a pagina 8 e proseguono a contatto fino alla zona di applicazione del campo elettrico.

Campo elettrico prodotto con elettrodi di rame

Per generare un campo elettrico uniforme si sostituiscono gli aghi metallici con due piastrine di rame di circa 2 x 0,5 x 0,5 cm posizionate attorno al canale microfluidico in cui si sono state prodotte manualmente le gocce (Figura 17).

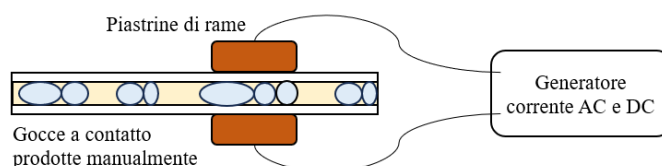


Figura 17: campo elettrico prodotto con elettrodi di rame

Anche in questa configurazione si applicano tutte le intensità e frequenze del campo elettrico sopra elencate, sia con le gocce in moto nel canale che ferme nella regione tra gli elettrodi, senza osservare alcuna modifica nel moto e nella forma delle gocce.

Utilizzo di un chip con degli elettrodi interdigitati

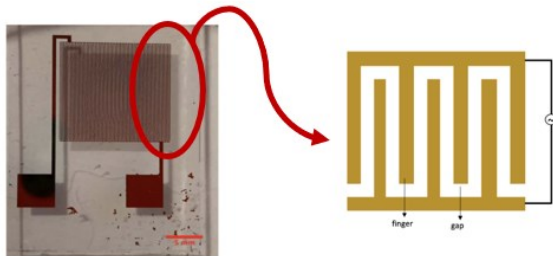


Figura 18: elettrodi interdigitati

Come successivo tentativo, si posiziona il capillare in cui sono presenti le gocce in contatto precedentemente generate, su un dispositivo già costruito che prevede degli elettrodi interdigitati su un vetrino da laboratorio. In dettaglio, il dispositivo, mostrato in Figura 18, è costituito da una serie di elettrodi a striscia complanare, creati da strati di oro e cromo, la cui altezza varia da 40 nm a 70 nm. La larghezza media delle dita degli elettrodi è stimata essere pari a $102 \pm 2 \mu\text{m}$ ed il quadrato formato da esse ha dimensioni totali di 1,5 x 1,5 cm.

Si posiziona sopra l'area coperta dalla serpentina elettrica il canale in cui vengono fatte scorrere le gocce, il modo tale che il flusso sia parallelo alle dita degli elettrodi.

Per la visualizzazione delle gocce si utilizza la stessa configurazione dei precedenti tentativi. Anche in questo caso l'intensità massima del potenziale applicato è di 400 V in corrente continua e 200 V (rms) con frequenza di circa 11 kHz in alternata, sia su gocce in movimento che ferme, sempre a contatto.

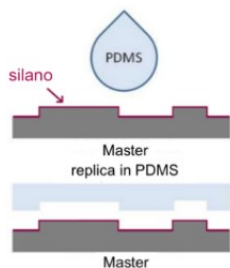
Non si osserva nessuna modifica evidente su forma e moto delle gocce.

Replica con PDMS su master di silicio

Per diminuire ulteriormente la distanza tra gocce ed elettrodi si pensa di utilizzare l'interdigitato descritto nel paragrafo precedente, ma applicando su di esso un canale microfluidico vero e proprio. In dettaglio il dispositivo microfluidico utilizzato è una replica in PDMS, da un master già presente in laboratorio che prevede la geometria T-junction precedentemente utilizzata.

Per la realizzazione del chip microfluidico si usa la tecnica del replica molding a partire da una master. In dettaglio, si prepara una soluzione di PDMS (Polidimetilsilossano) e reticolante, in rapporto 10:1. Il PDMS è un composto formato da una catena di atomi di silicio e ossigeno a cui sono attaccati gruppi di terminazione metili, tramite i quali il PDMS reticola per azione del reticolante, come mostrato in Figura 19.

Dopo aver miscelato le due componenti, si procede a degassificare il composto, utilizzando una pompa a vuoto: la miscela viene posta in un contenitore cilindrico ermetico in cui viene fatto il vuoto, in modo da permettere alle molecole di aria immerse nel composto di salire in superficie ed evitare così, che possano modificare la geometria del chip nella vicinanza dei microcanali o peggiorarne la visualizzazione durante le misure.



Una volta degassificato il composto, lo si fa colare sul master, creando uno spessore di circa 5mm come illustrato in Figura 19 e lo si pone in forno a circa 70°C per un'ora e mezza, cosicché si solidifichi. A questo punto la replica ottenuta deve essere fissata sul vetrino con l'interdigitato, sopra il quale viene precedentemente creato uno strato di 1 μm di PDMS, in modo da chiudere i canali e renderli percorribili dal fluido.

Figura19: tecnica del replica molding

A questo scopo si procede alla sigillatura tramite plasma di ossigeno, in ambiente controllato (camera bianca classe 8). Dopo aver esposto al plasma sia il PDMS che il dispositivo con gli interdigitati, i due vengono messi a contatto prestando attenzione che la parte conduttiva del chip corrisponda con il canale percorso dalle gocce: in questo modo si forma un legame covalente e irreversibile tra le due parti.

Il dispositivo si completa inserendo i tubi di entrata e uscita dei liquidi, fissandoli con della colla bicomponente. La parte finale della preparazione prevede la silanizzazione tramite una miscela di 500 μL di olio FC-40 e 15 μL di tricloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silano (da Alfa Aesar) con la quale viene riempito completamente il dispositivo microfluidico sigillato. Dopo un tempo di riposo di circa 20 min, si procede con il lavaggio del chip utilizzando 500 μL di FC-40 puri, iniettati grazie ad una pompa a siringa, a 30 $\mu\text{L}/\text{s}$ per 15 minuti. Tale flusso viene scelto per assicurare il corretto lavaggio del canale dall'eventuale silano non reagito. Questa procedura assicura l'idrofobicità del PDMS e l'affinità di bagnamento con la fase continua. Il dispositivo è quindi pronto all'uso.

Utilizzando sempre le gocce a contatto prodotte manualmente, si collega il microcanale in cui esse sono contenute, all'entrata B del chip, andando a chiudere l'entrata A, in modo tale che le gocce possano scorrere dall'entrata B all'uscita come se fosse un solo canale rettilineo (Figura 20).

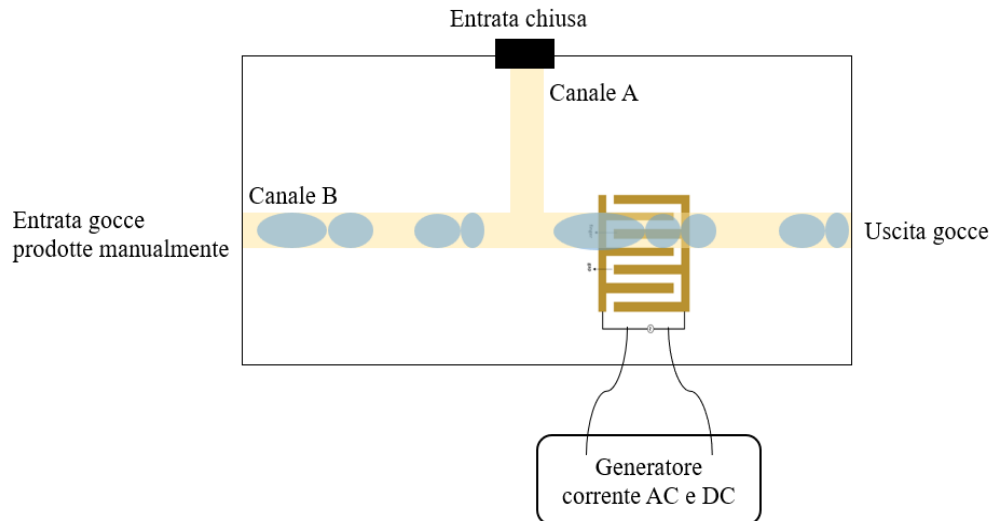


Figura 20: replica in PDMS su chip elettronico

Si collega il chip elettronico prima al generatore di corrente continua e, successivamente, al generatore di corrente alternata andando a visualizzare l'effetto di tale applicazione sulle gocce prodotte nel chip.

Per la visualizzazione si utilizza lo stesso metodo precedente.

Anche in questa configurazione si applicano potenziali fino ad un massimo di 400 V in corrente continua e 200 V (rms) con frequenza di circa 11 kHz in alternata, non riuscendo a visualizzare nessuna modifica nel moto e nella forma delle gocce sia che esse scorrano nel canale sia che siano ferme nella regione sottoposta al campo elettrico.

Considerazioni e conclusioni

Si ipotizza, anche nel confronto con i risultati studiati in letteratura, che la ragione principale della non coalescenza delle gocce durante i tentativi sopra illustrati, risieda nel valore del campo elettrico all'interfaccia tra le gocce, il quale non sembrerebbe sufficientemente grande.

Per verificare questa ipotesi si stima l'entità del potenziale effettivo V_{eff} che agisce sulle gocce di acqua nel caso del capillare posizionato sopra gli elettrodi interdigitati (pagina 22). Si suppone, infatti, che il potenziale applicato agli elettrodi venga ridotto notevolmente a causa dello spessore del capillare.

Una stima del massimo valore di V_{eff} viene fatta attraverso il calcolo del fattore di riduzione C_l moltiplicato per il massimo valore del potenziale applicato agli elettrodi in corrente alternata, secondo la formula $V_{eff} = C_l V$.

Per calcolare C_l si usa la relazione: $C_l = \frac{(1 + \frac{\epsilon_d - \epsilon_l}{\epsilon_d + \epsilon_l}) e^{-\frac{2d}{\delta}}}{1 + (\frac{\epsilon_d - \epsilon_l}{\epsilon_d + \epsilon_l}) e^{-\frac{4d}{\delta}}}$, dove d è lo spessore del capillare,

$\epsilon_d = 2,1$ la costante dielettrica del PFTE, ϵ_l la costante dielettrica del liquido, che viene approssimata con quella dell'aria, e δ la profondità di penetrazione, data da $\delta = \frac{4w}{\pi}$, con w larghezza tra le dita degli elettrodi interdigitati [9].

Il valore ottenuto per C_l è $C_l = 0,028$; ed essendo il massimo valore del potenziale in corrente alternata applicato in questa configurazione pari a 200 V, si stima che, in tal caso, il potenziale massimo agente sulla goccia sia $V_{eff} = 5,77 V$.

Per renderlo confrontabile con i risultati in letteratura, si calcola il potenziale agente sulle gocce nella configurazione riportata a pagina 18, considerando l'effetto attenuante di uno spessore $d = 30 \mu m$ di PDMS ($\epsilon_d = 2,7$) sopra gli elettrodi [8].

Si ottiene il valore $V_{eff} = 89,61 V$, che risulta, effettivamente, superiore a quello ottenuto nella prova in laboratorio.

Nella possibilità di fare successive prove, si suggerisce di cercare di minimizzare il più possibile l'effetto schermante sul potenziale. Nel farlo è necessario, però, porre attenzione all'effetto degli elettrodi, non solo sulle gocce, ma anche sul contenuto di esse, ricordando

che il fine ultimo del processo può essere quello di ottenere delle reazioni chimiche tra gli analiti incapsulati nelle gocce.

Si propone, inoltre, di cambiare l'orientazione degli elettrodi al fine di generare un campo che sia parallelo al flusso, quindi con gli elettrodi perpendicolari al moto delle gocce, perché tale configurazione risulta essere la più efficace per la coalescenza [8].

Bibliografia

- [1] C. N. Baroud, F. Gallaire and D. Rémi, "Dynamics of microfluidic droplets," *Lab Chip*, pp. 2032-2045, 2010.
- [2] J.-C. Baret, «Surfactants in droplet-based microfluidics,» *Lab Chip*, pp. 422-433, 2012.
- [3] M. Sesen, A. Fakhfouri e N. Adrian, «Coalescence of Surfactant-Stabilized Droplets Using Surface Acoustic Waves,» *Analytical Chemistry*, pp. 7538-7545, 2019.
- [4] N. Bremond, A. R. Thiam e J. Bibette, «Decompressing Emulsion Droplets Favors Coalescence,» *Physical Review Letters*, p. 024501, 2008.
- [5] C. N. Baroud, M. R. de Saint Vincent e J.-P. Delville, «An optical toolbox for total control of droplet microfluidics,» *Lab Chip*, pp. 1029-1033, 2007.
- [6] M. Chabert, K. D. Dorfman e J.-L. Viovy, «Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels,» *Electrophoresis*, pp. 3706-3715, 2005.
- [7] M. Zagnoni, C. Baroud e J. Cooper, «Electrically initiated upstream coalescence cascade of droplets in a microfluidic flow,» *Physical Review E : Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, p. 046303, 2009.
- [8] K. Ahn, J. Agresti, H. Chong, M. Marquez e D. A. Weitz, «Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels,» *Appl. Phys. Lett.* **88**, 2006.
- [9] Y. J. e. al., «Dielectrowetting control of capillary force between floating objects and wall for dielectric fluid,» *Micromachines*, 2021.
- [10] T. Liji, «Benefits of Using a Microfluidic Device,» *News medical life sciences*, 2023.
- [11] H. Cesiulis, Surfactants in Tribology. Vol. 2 (pp.149-172), Girma Biresaw, K.L. Mittal, 2010.
- [12] S. A. Habib, «A Study of the Electrocoalescence on spherical droplets in a flow,» *CUNY Academic Works*, 2012.