



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Fabbricazione e caratterizzazione di un dispositivo
per la realizzazione di cristalli microfluidici

Relatore

Dr. Davide Ferraro

Correlatore

Prof. Giampaolo Mistura

Laureando

Tommaso Camponogara

Anno Accademico 2023/2024

Abstract

La tesi, di carattere sperimentale, prevede la realizzazione e la caratterizzazione di un dispositivo microfluidico per la produzione di emulsioni formate da gocce d'acqua disperse in una fase immiscibile a base di olio. Questa tesi rientra quindi nell'ambito della microfluidica di gocce, una disciplina attualmente in rapido sviluppo, soprattutto grazie alla possibilità di poter manipolare in modo controllato piccole quantità di liquidi; tale qualità ne permette l'applicazione anche in ambito chimico e biologico. In questa tesi si vuole sfruttare questa tecnologia per la realizzazione di un cristallo microfluidico, ossia una dispersione di gocce organizzate su un piano bidimensionale con lo scopo di mimare un reticolo cristallino. Questa attività è da considerarsi uno studio preliminare facente parte di un progetto di più ampia portata, attualmente in corso di sviluppo all'interno del laboratorio LaFSI del Dipartimento di Fisica e Astronomia.

La tesi inizia con la descrizione delle procedure e delle tecniche di microfabbricazione utilizzate per la fabbricazione di un chip microfluidico per la produzione di gocce. Si procede con l'identificazione di due possibili geometrie di canali del chip, rispettivamente la T-junction e la giunzione detta flow-focusing. Le gocce ottenute con entrambe le geometrie sono state caratterizzate valutandone la monodispersità in taglia e la frequenza di produzione, variando i flussi in ingresso di acqua e olio imposti al dispositivo microfluidico. Successivamente vengono descritte diverse strategie testate per confinare le gocce in modo da creare un cristallo microfluidico in una regione determinata. Infine, vengono riportate delle conclusioni relative al lavoro svolto, con varie prospettive future per migliorare diversi aspetti legati soprattutto la realizzazione del cristallo.

Indice

Abstract	iii
1 Introduzione	1
1.1 Microfluidica	1
1.2 Microfluidica di gocce	2
2 Fabbricazione del chip	7
2.1 Progettazione	7
2.2 Fabbricazione	8
2.2.1 Fabbricazione del master	9
2.2.2 Produzione della replica	14
3 Misure e analisi dati	17
3.1 Apparato sperimentale	17
3.1.1 Hardware – materiali e dispositivi	17
3.1.2 Software – analisi delle acquisizioni	18
3.2 Caratterizzazione delle giunzioni	19
3.3 Cristallo microfluidico	21
4 Conclusioni	23

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Microfluidica

La microfluidica é la branca della fluidodinamica che si occupa dello studio dei fluidi a scale micrometriche, con volumi compresi tra 10^{-9} e 10^{-18} litri [5]; a quella scala i flussi sono caratterizzati da una dinamica differente rispetto ai flussi a scala macroscopica, a causa della dipendenza lineare dalle dimensioni caratteristiche del sistema di uno dei parametri fondamentali della fluidodinamica, chiamato numero di Reynolds \mathbf{Re} (1.1):

$$\mathbf{Re} = \frac{\rho UL}{\mu} \quad (1.1)$$

dove ρ è la densità del fluido studiato, U è la velocità caratteristica del fluido, L è una dimensione caratteristica del sistema considerato e μ è la viscosità dinamica del fluido.

\mathbf{Re} rappresenta il rapporto tra il contributo inerziale e il contributo viscoso alla dinamica del flusso considerato [2]. Un numero di Reynolds inferiore a 1, come quello che si ha a scale micrometriche, indica che la dinamica del sistema è governata dalle forze di natura viscosa. Questo implica che, lavorando a scale così ridotte e quindi a bassi numeri di \mathbf{Re} , i flussi siano caratterizzati da linee di flusso parallele e siano esenti da turbolenze. I flussi che possiedono tali caratteristiche vengono detti “laminari”. In contrapposizione, i flussi turbolenti sono tipici dei sistemi macroscopici, quindi ad alti numeri di \mathbf{Re} , e sono caratterizzati dalla presenza di turbolenze, vorticità e caoticità su diversi ordini di grandezza. I due flussi sono rappresentati in Figura 1.1.

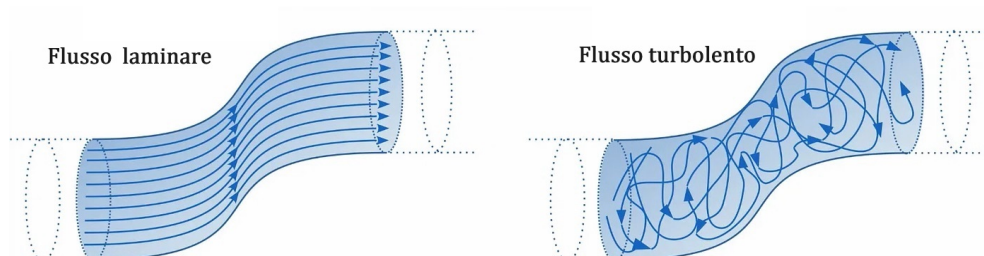


Figura 1.1: Schematizzazioni di flussi laminari e turbolenti all’interno di un condotto.

Le soluzioni dell’equazione di Navier-Stokes (1.2) approssimata a bassi numeri di Reynolds - detta equazione di Stokes (1.3) - oltre a godere di simmetria temporale, assumono spesso espressioni semplici dal punto di vista matematico. Il flusso laminare tipico delle scale micrometriche rappresenta quindi una condizione ideale di studio grazie alla semplicità e l’alta controllabilità di tali flussi.

Equazione di Navier-Stokes per fluidi incomprimibili ($\vec{\nabla} \cdot \vec{U} = 0$):

$$\rho \frac{D\vec{U}}{Dt} = \rho \vec{g} - \vec{\nabla} P + \mu \nabla^2 \vec{U} \quad (1.2)$$

Equazione di Stokes per fluidi incomprimibili:

$$0 = \rho \vec{g} - \vec{\nabla} P + \mu \nabla^2 \vec{U} \quad (1.3)$$

Dal punto di vista sperimentale, la microfluidica si serve di dispositivi di piccole dimensioni, comprese tra i 10 e i 100 μm , in grado di manipolare minuscoli volumi di fluido, dell'ordine dei microlitri e picolitri. Questi "dispositivi microfluidici" (a cui ci si riferirà più semplicemente con chip) sono composti da una specifica rete di canali e strutture comunicanti: i condotti sono in collegamento tra loro tramite strutture chiamate "giunzioni" e comunicano con l'esterno tramite dei capillari. I chip possono presentare anche strutture più articolate, come vasche, filtri o strettoie in base allo specifico scopo per cui vengono costruiti. In Figura 1.2 è presente un esempio di un chip microfluidico.

È possibile un alto controllo dei piccoli volumi di fluidi contenuti nei chip grazie alla piccola dimensione dei canali, infatti la loro larghezza può variare tra le centinaia di nanometri e le centinaia di micrometri.

Negli ultimi decenni, lo studio dei chip microfluidici ha assunto una grande rilevanza, grazie alla versatilità di utilizzo dei chip e al basso costo necessario alla loro produzione; è nato quindi il concetto di "Lab on a chip", dispositivi che racchiudono tutte le strutture necessarie allo studio di uno o più processi sperimentali al loro interno.

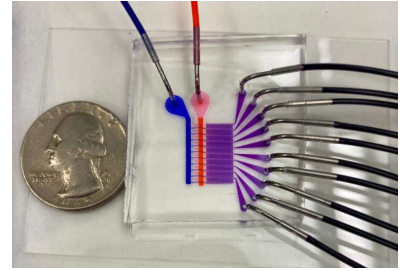


Figura 1.2: Esempio dispositivo microfluidico classificabile come "lab on a chip".

1.2 Microfluidica di gocce

Uno dei campi applicativi della microfluidica è la microfluidica di gocce, che si occupa dello studio e della caratterizzazione di emulsioni, ossia sistemi composti da fluidi immiscibili di tipo liquido-liquido o liquido-gas, e dei loro metodi di produzione [6].

Nonostante si possano ottenere facilmente delle emulsioni anche per mezzo di metodi più rudimentali, ad esempio agitando vigorosamente un miscuglio di due liquidi immiscibili, per aumentare l'efficienza di produzione è necessario introdurre alcune tecniche di microfluidica. L'utilizzo di chip permette di produrre direttamente una emulsione monodispersa, ossia composta da gocce dalle dimensioni idealmente identiche tra loro, evitando qualsiasi eventuale procedura di selezione e scarto delle gocce con dimensioni diverse da quella desiderata, necessaria se l'emulsione è generata manualmente, quindi aumentando l'efficienza temporale e migliorando la qualità del risultato ottenuto in confronto all'impiego di metodi classici. Inoltre, l'alta controllabilità dei flussi con cui si lavora e la possibilità di riutilizzare gli strumenti di produzione garantiscono una eccellente riproducibilità dei processi di generazione di emulsioni.

Lo studio di emulsioni monodisperse è un campo in rapido sviluppo a causa dei molteplici campi di applicazione che possiede, tra cui si contano diversi progetti legati alle scienze farmaceutiche, mediche e biologiche [9, 10], principalmente grazie alla possibilità di trattare le emulsioni come un grande numero di micro-reattori indipendenti e isolati dall'ambiente esterno. Incapsulando al loro interno sostanze chimiche, molecole, cellule o microorganismi è possibile studiare i fenomeni fisici, processi chimici e biologici che avvengono mediante la loro interazione.

Le strutture più importanti dei chip che generano emulsioni sono le giunzioni, infatti racchiudono tutta la dinamica di funzionamento utile alla produzione di gocce, essendo le regioni in cui le due fasi entrano a contatto. La loro geometria possiede un ruolo cruciale nel meccanismo di formazione

delle gocce: l'inclinazione più o meno accentuata con cui si incontrano i canali, il numero dei canali confluenti, le dimensioni degli stessi e la presenza di eventuali espedienti per facilitare il distacco delle gocce sono tutti aspetti che hanno una grande influenza sulle caratteristiche fisiche dell'emulsione prodotta dal chip. Le geometrie più efficienti permettono di avere un altissimo controllo sulle dimensioni (da qualche decina a svariate centinaia di micrometri di diametro) delle gocce prodotte.

Complessivamente, possono essere individuate tre famiglie principali di giunzioni: *T-junction*, *flow-focusing* e *co-flow*. Sono differenziate per geometria di costruzione e, di conseguenza, anche per principio di funzionamento.

• T-junction

La giunzione T-junction, come suggerisce il nome, è una giunzione a forma di T. Come è possibile osservare in Figura 1.3, il canale orizzontale della T è quello che trasporta la fase continua, mentre il canale che si innesta lateralmente è quello che trasporta la fase dispersa verso la giunzione; possiede dunque due canali in ingresso e uno in uscita.

Il funzionamento della giunzione per la produzione di gocce si basa principalmente sullo sforzo di taglio applicato dal flusso di fase continua sul volume di fase dispersa all'ingresso della giunzione e sui gradienti di pressione che si vengono a formare in corrispondenza dello stesso. In base ai flussi e alle viscosità di fase dispersa e continua in ingresso nella T-junction, è possibile osservare due regimi di produzione di gocce [4, 7]:

- *Dripping regime*: Le gocce prodotte si distaccano prima che riescano ad occupare interamente la sezione del canale dove scorre la fase continua. La produzione di gocce è compiuta ad opera del solo sforzo di taglio applicato dalla fase continua sul volume di fase dispersa che è confluito nel canale principale.
- *Squeezing regime*: Le gocce prodotte si distaccano dopo aver occupato interamente la sezione del canale dove scorre la fase continua. La produzione di gocce in questo regime è compiuta principalmente dal gradiente di pressione che si forma all'interno del canale, in corrispondenza del volume non ancora separato di fase dispersa.

• flow-focusing

La giunzione flow-focusing è una giunzione a forma di croce, raffigurata in Figura 1.4. Il lato sinistro del canale orizzontale della croce è quello che trasporta la fase dispersa verso la giunzione, mentre entrambi i canali verticali della croce trasportano la fase continua verso la giunzione; possiede dunque tre canali in ingresso e uno in uscita. Spesso, il design di una Flow-focusing comprende anche una strizione sul lato destro del canale orizzontale della croce, attraverso il quale fluiscono le gocce generate.

La sua presenza aiuta la formazione delle gocce: in corrispondenza di una riduzione della sezione del condotto, per il teorema di Bernoulli, si ha un aumento della velocità del liquido trasportato. Di conseguenza, il volume di fase dispersa risente di un gradiente di pressione, che lo attira all'interno della strizione, verso il canale di uscita dalla giunzione. Nel frattempo, i due flussi di fase continua applicano uno sforzo di taglio sul "collo" che ancora collega il piccolo volume al resto della fase dispersa nel proprio canale, fino alla sua eventuale rottura. Si ottiene in questo modo una "focalizzazione di flussi" a tutti gli effetti, con una conseguente produzione di gocce di fase dispersa sospese nella fase continua.

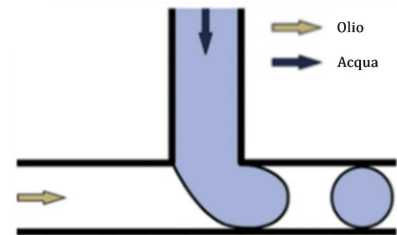


Figura 1.3: Schema di funzionamento di una T-junction.

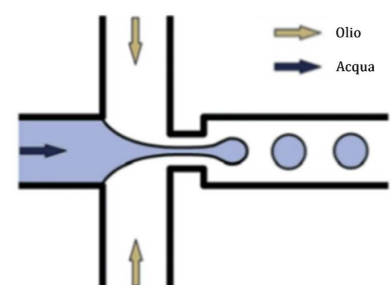


Figura 1.4: Schema di funzionamento di una flow-focusing.

In base ai flussi e alle viscosità di fase dispersa e continua in ingresso nella flow-focusing, è possibile osservare tre regimi di produzione di gocce [4, 7]:

- *Dripping regime*: Le gocce prodotte si distaccano prima che riescano ad occupare interamente la sezione della strizione. La produzione di gocce è compiuta ad opera del solo sforzo di taglio applicato dalla fase continua sul volume di fase dispersa che è confluito nel canale principale.
- *Squeezing regime*: Le gocce prodotte si distaccano dopo aver occupato interamente la sezione della strizione, formando un tappo. La produzione di gocce in questo regime è compiuta principalmente dal gradiente di pressione che si forma all'interno della giunzione, in corrispondenza della strizione.
- *Jetting regime*: Il distacco del volume di fase continua avviene quando il “collo” è molto lungo e attraversa, almeno parzialmente, la strizione della giunzione. Nel momento della sua rottura, vengono prodotte più gocce di diverse dimensioni, generalmente una goccia principale seguita da un certo numero di gocce molto più piccole.

• co-flow

La giunzione co-flow è una giunzione lineare; come la flow-focusing è dotata di tre canali in ingresso e di uno in uscita, ma in questo caso i canali di ingresso alla giunzione sono paralleli e, in corrispondenza del loro termine, vanno a formare il canale in uscita dalla giunzione, senza alcuna strizione.

Il funzionamento della giunzione per la produzione di gocce si basa principalmente sullo sforzo di taglio applicato dal flusso di fase continua sul volume di fase dispersa all'uscita del suo canale di ingresso e sull'instabilità.

Quando la fase dispersa esce dal suo canale/condotto, ne viene separata una goccia a causa degli sforzi di taglio applicati dai due flussi laterali di fase continua.

In base ai flussi e alle viscosità di fase dispersa e continua in ingresso nella co-flow, è possibile osservare due principali regimi di produzione di gocce [4, 7]:

- *Dripping regime*: Le gocce prodotte si distaccano a piccola distanza dal termine del canale, il collo non si allunga e non forma una colonna stabile di fase dispersa.
- *Jetting regime*: Le gocce prodotte si distaccano a una distanza maggiore, seguite da una colonna stabile di fase dispersa, a causa dell'allungamento del collo.

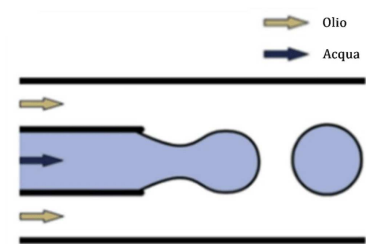


Figura 1.5: Schema di funzionamento di una co-flow.

In questa tesi si propone di studiare un fenomeno di interesse prettamente fisico, quello dei cristalli microfluidici. Un cristallo microfluidico può essere definito come un raggruppamento o cluster ordinato di gocce dalle dimensioni micrometriche. In questa tesi verrà studiato in particolare il caso di un cristallo microfluidico bidimensionale planare e ci si focalizzerà sulla sua realizzazione all'interno di un chip.

In dettaglio, un modo per ottenere cristallo microfluidico planare può essere quello di accumulare gocce all'interno di una regione confinata del chip con altezza minore o uguale al loro diametro; in questo modo le gocce sono vincolate a muoversi sul piano di confinamento, come mostrato nelle Figure 1.6 e 1.7.

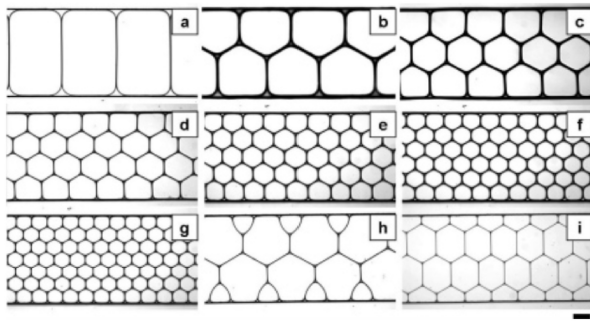


Figura 1.6: Array bidimensionali assunti da gocce all'interno di un chip. La scale-bar di riferimento equivale a 200 μm [3].

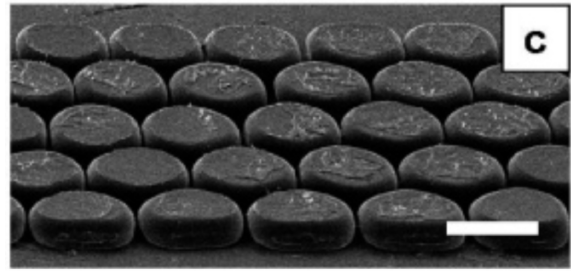


Figura 1.7: Fotografia di un array di gocce prodotte all'interno di un chip e poi solidificate tramite fotopolimerizzazione. La scale-bar di riferimento equivale a 200 μm [3].

In Figura 1.6 sono raffigurati diversi array bidimensionali assunti da gocce prodotte all'interno di un chip. È possibile notare come sia presente un singolo strato di gocce che compone un cristallo microfluidico planare. In base alla loro dimensione, occupano il canale disponendosi secondo diverse geometrie.

In Figura 1.7 è presente un array di gocce prodotte all'interno di un chip e poi solidificate tramite fotopolimerizzazione. È possibile notare come le loro superfici superiori e inferiori siano state appiattite dal loro diretto contatto con le pareti del chip.

Questa tesi fa parte di un progetto di più ampia portata sullo studio dei cristalli microfluidici in analogia con i reticoli cristallini. I vantaggi di lavorare con i cristalli microfluidici invece che con i reticoli cristallini sono legati principalmente all'assenza degli effetti ottici presenti intrinsecamente nelle misure di sistemi in scala nanometrica; lavorare a scala micrometrica, infatti, permette di ottenere misure in tempo reale usando un semplice microscopio.

L'obiettivo di questa tesi, quindi, è la costruzione e caratterizzazione di un chip microfluidico in grado di generare emulsioni monodisperse e la realizzazione di un cristallo microfluidico al suo interno.

Capitolo 2

Fabbricazione del chip

2.1 Progettazione

Il primo passo necessario alla fabbricazione di un chip è la fase di progettazione dello stesso. La progettazione di un chip consiste nell'ideazione delle strutture che compongono un chip microfluidico, ossia nel loro dimensionamento, nell'identificazione della loro geometria e nella scelta della loro disposizione all'interno del chip, in base alla funzione che sono destinate a svolgere.

Il design di tutti i chip prodotti è stato eseguito utilizzando il software di progettazione 2D "AutoCAD 2024". La progettazione è partita dal dimensionamento dei canali, assieme alla scelta dell'altezza delle strutture. È stato usato come riferimento l'articolo [8] per il dimensionamento dei canali dei chip. Sono stati disegnati dei canali larghi $120\ \mu\text{m}$ ed è stata individuata una altezza ottimale di $40\ \mu\text{m}$ per tutte le strutture del chip.

Consultando la letteratura scientifica del settore, tra tutte le geometrie di giunzione possibili, sono state individuate le due migliori; grazie alla loro semplicità di costruzione e alla loro efficienza, la T-junction e la flow-focusing sono le giunzioni più utilizzate nel campo della microfluidica di gocce. Sono quindi stati inizialmente progettati due chip, identici per quanto riguarda le dimensioni delle strutture, ma con giunzioni diverse, in modo da condurre uno studio parallelo e poter così caratterizzare le due giunzioni, per scegliere poi la più adatta al conseguimento dell'obiettivo di questa tesi.

Per il dimensionamento della strizione e del canale di uscita della Flow-focusing è stato nuovamente usato come riferimento l'articolo [8].

Nelle Figure 2.1 e 2.2 sono riportati nel dettaglio i progetti delle due giunzioni considerate.

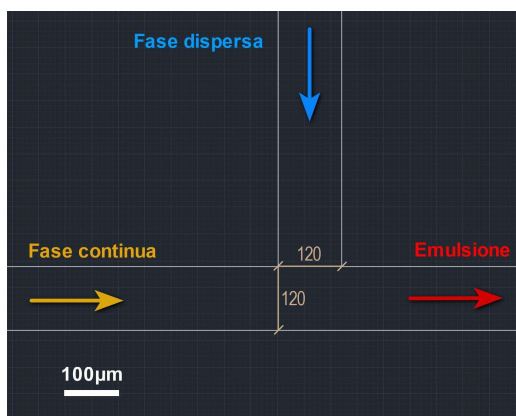


Figura 2.1: Design della T-junction

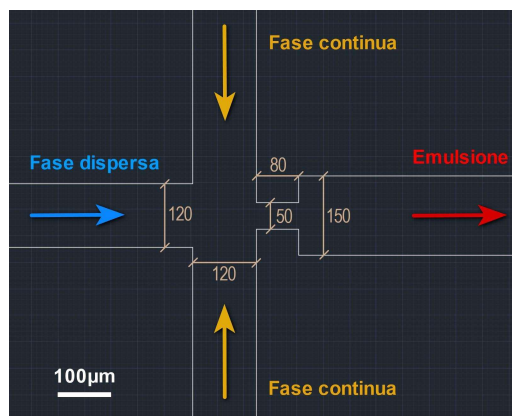


Figura 2.2: Design della flow-focusing

È stata disegnata una struttura specifica all'interno del chip per ospitare il cristallo microfluidico; essa corrisponde a una vasca dalle dimensioni molto maggiori rispetto a quelle dei canali.

Sugli inlet sono stati inseriti diversi ostacoli che fungono da sistema di filtraggio per corpi estranei. È stato impiegato lo stesso design di filtro per tutti gli inlet di tutti i chip prodotti, come è possibile

osservare nelle Figure 2.3, 2.4 e 2.5.

Le ultime attenzioni da avere in fase di progettazione del chip sono dovute principalmente alla gestione degli spazi: fissando come dimensione massima del chip quella di un vetrino coprioggetto (24 mm × 60 mm) e considerando una distanza minima di circa 5mm tra gli inlet/outlet e qualsiasi altra struttura del chip è possibile procedere con la disposizione definitiva delle diverse strutture.

Tutti i parametri progettuali dei diversi chip da me prodotti sono riportati in Tabella 2.1, mentre le immagini dei progetti sono riportate nelle Figure 2.3, 2.4 e 2.5.

Nome chip	1ff	1Tj	2Tj
Numero inlet	3	3	3
Numero outlet	1	1	2
Tipo giunzione	flow-focusing	T-junction	T-junction
Larghezza strizione (μm)	50	-	-
Lunghezza strizione (μm)	80	-	-
Numero canali ingresso vasca	3	3	3
	120	120	120
Larghezza canali ingresso vasca (μm)	150 (principale)	120 (principale)	120 (principale)
	120	120	120
Lunghezza vasca (mm)	16	16	5.62
Larghezza vasca (mm)	3	2.97	1.98
Numero canali uscita vasca	1	1	3
	-	-	25
Larghezza canali uscita vasca (μm)	150	120	100 (principale)
	-	-	25

Tabella 2.1: Parametri di progettazione dei chip costruiti

2.2 Fabbricazione

Tra le diverse possibili modalità di fabbricazione di un chip microfluidico, quella adoperata in questa tesi è basata sulla costruzione di una matrice di stampo, detto “master”, e la creazione di una replica, da cui si ottiene il chip finale. Le operazioni necessarie possono essere quindi suddivise in due sottogruppi: una prima parte di operazioni atte alla costruzione del master tramite processi di fotolitografia e una seconda parte di operazioni atte alla creazione di una replica secondo la tecnica REM (replica molding), concludendo l’iter con l’assemblaggio del chip. [6]

In Figura 2.6 è raffigurato uno schema dei principali passaggi necessari alla costruzione di un chip microfluidico. I primi due rappresentano processi di fotolitografia, mentre i restanti quattro rappresentano processi di replica molding e di chiusura e assemblaggio del chip.

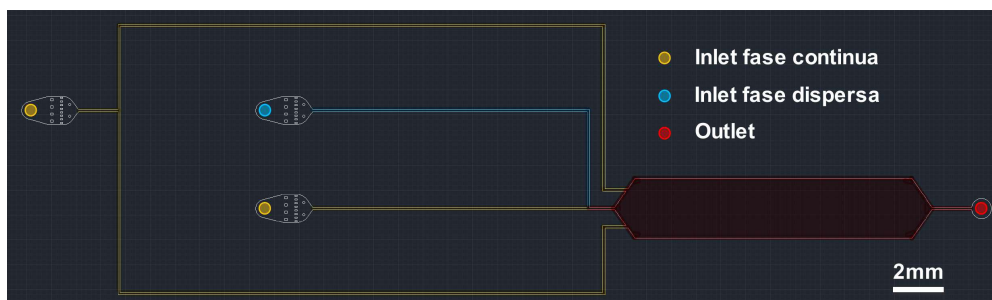


Figura 2.3: Progetto del chip 1Tj

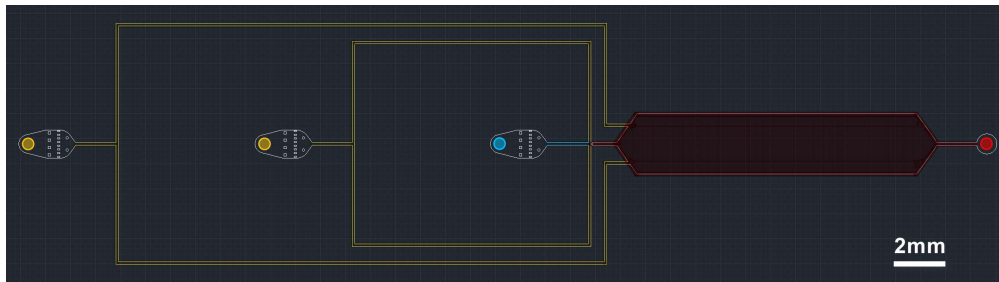


Figura 2.4: Progetto del chip 1ff

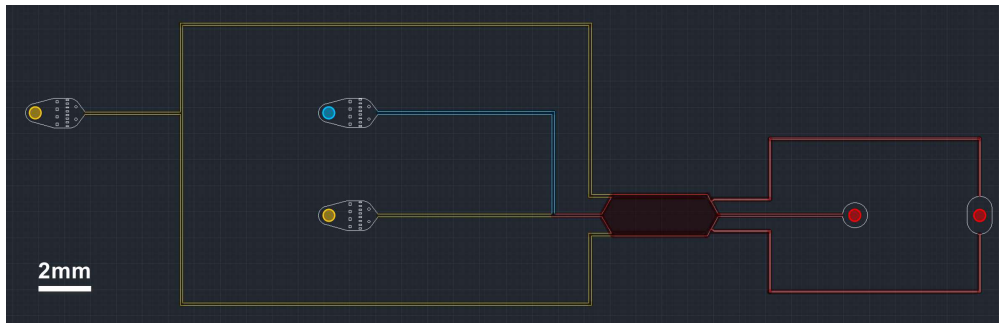


Figura 2.5: Progetto del chip 2Tj

Di seguito verranno espone nel dettaglio tutte le operazioni necessarie alla fabbricazione di un chip microfluidico, suddivise nei due sottogruppi individuati precedentemente.

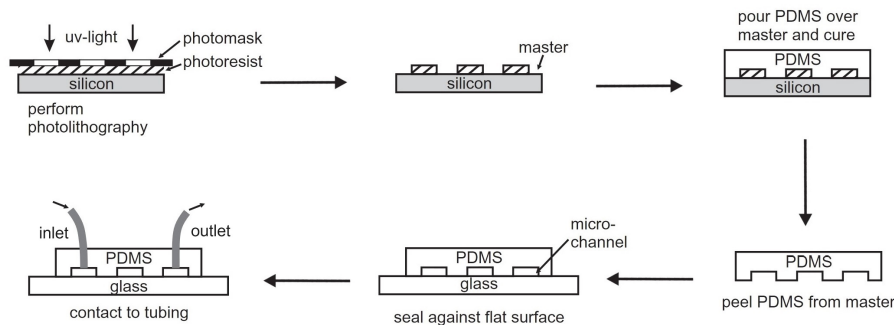


Figura 2.6: Schema raffigurante i principali step di fabbricazione di un chip.

2.2.1 Fabbricazione del master

Per fabbricazione del master si intende l'insieme dei processi necessari alla realizzazione di uno stampo in rilievo con impressa la geometria dei canali e delle strutture che compongono il chip che si vuole produrre. Un master è composto da due strati: un substrato e uno stampo. In base alla necessità, lo stampo può essere strutturato anche su più livelli.

I master che ho prodotto sono composti da un substrato di silicio su cui è depositato uno strato di "fotoreist", un polimero fotosensibile in grado di polimerizzare solo in caso di una irradiazione esterna, con frequenza appartenente a un intervallo di sensibilità specifico per il fotoreist usato. Esso può essere di tipo positivo o negativo: un fotoreist positivo polimerizza solo dove non è stato irradiato, mentre un fotoreist negativo polimerizza in seguito all'esposizione. Nel mio caso è stato scelto un fotoreist negativo, il SU-8 2050, sensibile all'esposizione a radiazione UV, tra i 350 nm e i 400 nm di lunghezza d'onda (precisamente, il picco di sensibilità si raggiunge a 365 nm).

Il processo di incisione del master avviene tramite fotolitografia, una particolare tecnica di incisione appartenente alla famiglia delle tecniche litografiche. Etimologicamente, il termine deriva dal greco

e può essere tradotto come incisione (-lito-grafia) luminosa (foto-). Essa consiste nell'esposizione di uno strato di fotoresist depositato sul substrato a una radiazione luminosa con una certa frequenza. In seguito all'esposizione e a un processo di sviluppo del master, sul substrato rimane uno strato di fotoresist solamente nelle regioni precedentemente irradiate.

La tecnica classica di incisione del fotoresist prevede l'utilizzo di una maschera con stampate le strutture del chip. Durante l'esposizione, la luce attraversa solo le regioni non trasparenti della maschera, determinando la polimerizzazione del fotoresist solo in tali regioni e replicando quindi la geometria stampata, come mostrato in Figura 2.7. Questa tecnica presenta dei limiti sulla precisione della stampa sul foglio e di conseguenza anche sulla precisione dell'incisione sul master.

Nel mio caso invece è stata usata una tecnica all'avanguardia, tramite l'utilizzo della μ MLA, una macchina per la fotolitografia senza maschera, rappresentata in Figura 2.8. La geometria del chip viene fornita alla macchina su un file CAD. L'incisione viene compiuta da un led, che imprime il disegno del chip sul fotoresist. Questa tecnica risulta essere molto precisa nell'incisione di strutture in scala micrometrica, inoltre facilita di molto la multipla esposizione del master, nel caso in cui sia necessario produrre uno stampo su più livelli.

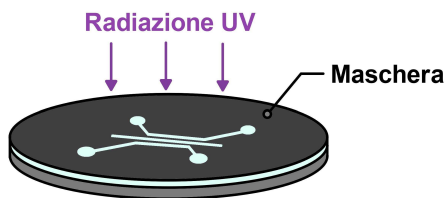


Figura 2.7: Tecnica classica di fotolitografia, mediante esposizione selettiva del fotoresist attraverso una maschera stampata.



Figura 2.8: La macchina per la fotolitografia senza maschera, la μ MLA, di Heidelberg Instruments, utilizzata per la costruzione dei chip studiati.

Parte dei processi necessari alla costruzione del master richiedono una particolare attenzione per quanto riguarda la pulizia dell'ambiente di lavoro. Senza adeguate contromisure, la polvere sospesa nell'aria può interferire con alcuni processi delicati come la deposizione del fotoresist o l'esposizione con la μ MLA, infatti le strutture che si vogliono costruire sono dello stesso ordine di grandezza delle particelle sospese. Tali processi verranno svolti all'interno di stanze pulite, dette clean rooms, dotate di sistemi di filtraggio dell'aria e di alto controllo di temperatura e umidità. In particolare, nel dipartimento di fisica sono presenti due clean room di diverse classi¹: una clean room ISO-8 e, all'interno di essa, una clean room ISO-6. La clean room ISO-6 ospita tutti i macchinari destinati all'applicazione e alla lavorazione del fotoresist; essa è separata dall'esterno da strisce in PVC arancione, che filtrano la componente blu di radiazione luminosa esterna, in modo che non venga innescata una polimerizzazione indesiderata.

Preparazione del substrato

Si parte con il taglio di un wafer di Silicio utilizzando una punta diamantata (Fig. 2.9). I wafer utilizzati hanno un diametro di 4", hanno una faccia lappata (polished) e una non lappata (non-polished). La faccia lappata è estremamente liscia (la sua rugosità è stata stimata essere attorno ai 200 nm) ed è la faccia su cui verrà depositato il fotoresist.

In seguito è necessario un trattamento di pulizia del Silicio, composto da diversi processi, per poterlo usare come substrato del master. Il primo passo consiste in un processo di baking: portare il substrato ad alte temperature rimuove il vapore acqueo depositato sulla sua superficie a causa dell'umidità ambientale. È stato posizionato il substrato su una piastra riscaldante accesa a 250°C per circa 35 minuti.

¹La tabella contenente tutte le specifiche di classificazione delle clean rooms è disponibile al link <https://www.americancleanrooms.com/cleanroom-classifications/>

Il passo successivo consiste in un trattamento al plasma del wafer (Fig. 2.10). Questo processo ha due obiettivi: eliminare qualsiasi residuo organico rimasto sul substrato e "attivare" la superficie del Silicio per favorire l'adesione del fotoresist su di essa. Viene utilizzata per questo scopo una macchina di produzione di plasma d'ossigeno (*Femto plasma cleaner* – Diener Electronic), presente all'interno della clean room ISO-8. I parametri di funzionamento utilizzati sono il risultato di un processo di fine tuning effettuato precedentemente presso il gruppo LaFSI:

Pressione	Flusso	Potenza	Durata
0.8 mbar	22 sccm	70%	5'

Tabella 2.2: Parametri del *plasma cleaner* per il trattamento del substrato



Figura 2.9: Taglio del wafer in Silicio con punta diamantata. L'incisione va effettuata sulla faccia non lappata.



Figura 2.10: Plasma cleaner in funzionamento. La bombola di ossigeno è nascosta al di sotto del ripiano d'appoggio.

Fotolitografia

Questi processi vengono svolti interamente all'interno della clean room ISO-6, in quanto è necessaria la massima pulizia dell'aria per minimizzare le imperfezioni sulla sua superficie del fotoresist causate da polvere o particolato sospeso nell'aria.

Si parte con la deposizione del fotoresist sul substrato. Come fotoresist negativo è stato utilizzato SU-8 2050, di densità $\rho = 1.233 \text{ g/ml}$ e di viscosità cinematica $\nu = 129 \text{ St}$. Tale fotoresist, a temperatura ambiente, si presenta come liquido molto viscoso. Maggiori specifiche sono descritte all'interno del datasheet ², dove sono presenti le linee guida sui processi da eseguire e vengono forniti dei valori di riferimento dei parametri da impostare (ad esempio per la cottura e l'esposizione).

Si versa il fotoresist sul substrato e si sparge su tutta la superficie del wafer, inclinandolo.

Il substrato deve essere poi posizionato all'interno dello spin coater (*WS-650MZ-23NPP* – Laurell Technologies Corporation).

Durante gli anni di utilizzo di SU-8 2050 sono state raccolte misure di spessore di fotoresist ottenuto in seguito allo spin coating in funzione della massima frequenza di rotazione impostata; a partire da queste è stata ricavata una curva empirica, usata come riferimento per impostare il programma di spin coating per i master prodotti.

Volendo raggiungere uno spessore di circa $40 \mu\text{m}$, per tutti i master prodotti è stato impostato lo stesso programma, esposto nella Tabella 2.3.

Vanno effettuati due cicli di spin coating, in modo uniformare il più possibile lo spessore del fotoresist. In seguito, va eseguito un primo riscaldamento del substrato, chiamato *soft bake*, necessario all'evaporazione del solvente mischiato al fotoresist depositato sul Silicio. La durata e la temperatura ideali dipendono dal tipo di fotoresist utilizzato e dallo spessore di fotoresist depositato sul Silicio.

²È possibile visualizzare il datasheet in formato pdf al link <https://kayakuam.com/wp-content/uploads/2019/09/SU-82000DataSheet2025thru2075Ver4.pdf>

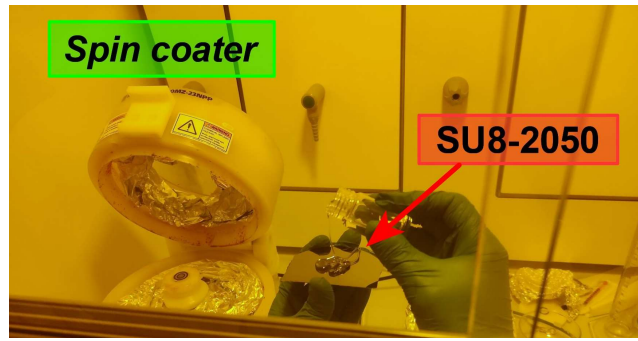


Figura 2.11: Deposizione del fotoresist SU-8 2050. Sullo sfondo è possibile notare lo *spin coater*.

Per tutti i master prodotti è stato impostato lo stesso programma, esposto nella Tabella 2.4.

<i>Spin coating</i>			
Step	I	II	III
frequenza (rpm)	150	750	1500
durata (s)	30	30	90

Tabella 2.3: Programma di *spin coating*

<i>Soft bake</i>		
Step	I	II
temperatura (°C)	45	75
durata (h)	1	4

Tabella 2.4: Programma di *soft bake*

A questo punto va inserito il campione all'interno della μ MLA. Dopo aver caricato il file del progetto del chip, è necessario inserire il valore dei due parametri di esposizione, ossia la *dose* e il *fuoco*:

- la *dose* indica la densità superficiale di energia rilasciata dal laser. Per tutti i master prodotti è stata impostata su 260 mJ/cm^2 .
- il *fuoco* regola la distanza di messa a fuoco dell'immagine impressa con il laser. Per tutti i master prodotti è stato impostato su -60% (il segno negativo indica che la quota di fuoco è interna allo strato di SU-8).

Per entrambi i parametri esistono delle tabelle di riferimento, contenenti i dati raccolti sulle esposizioni effettuate e gli esiti ottenuti. La scelta dei valori di dose e fuoco per le esposizioni è stata basata su quelle tabelle, optando per configurazioni già testate con successo in passato.

Si prosegue con il *post exposure bake*, ossia un ulteriore riscaldamento di breve durata con temperature progressivamente più alte. La temperatura e l'intervallo di tempo sono tabulati all'interno del data-sheet del fotoresist e dipendono dallo spessore depositato sul substrato. Nel mio caso, usando SU-8 2050 con uno spessore previsto di circa $40 \mu\text{m}$, è stato impostato il programma descritto nella Tabella 2.5.

In seguito al *post exposure bake* è necessario sviluppare il master per rimuovere il fotoresist che non ha polimerizzato in seguito all'esposizione, tramite un solvente specifico per il fotoresist utilizzato. Prima di procedere, è importante controllare che il master si sia raffreddato.

La procedura di sviluppo consiste nel versare il solvente sul master (Fig. 2.12); in seguito, va versato isopropanolo per rimuovere il solvente rimasto sulla superficie e va asciugato il master con l'aria com-

<i>Post exposure bake</i>		
Step	I	II
temperatura (°C)	65	95
durata (min)	5	15

Tabella 2.5: Programma di *post exposure bake*

pressa (Fig. 2.13). La procedura va ripetuta fino a quando sul master non è visibile alcun residuo di fotoresist non polimerizzato. In Figura 2.14 è mostrato un master correttamente sviluppato e asciugato.

Questa è l'ultima procedura che va effettuata all'interno della clean room ISO-6 per quanto riguarda l'intera fabbricazione del chip microfluidico.

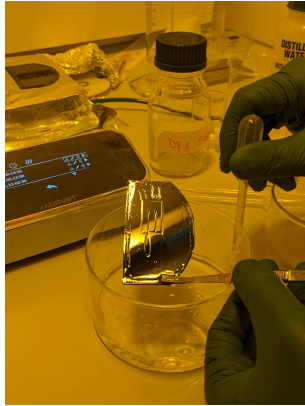


Figura 2.12: Applicazione del solvente sul fotoresist esposto.



Figura 2.13: Asciugatura del master con aria compressa.



Figura 2.14: Master correttamente sviluppato e asciugato.

Finalizzazione del master

Con il processo di *post exposure bake*, la fabbricazione del master è conclusa, ma sono necessari due ulteriori trattamenti per ultimarli e poterli utilizzare come stampo. Entrambe preparano il master al processo di *replica molding*, in cui deve essere scaldato e deve entrare in contatto con il PDMS (polidimetilsilossano), il polimero che comporrà il corpo della replica, chimicamente compatibile con il substrato in Silicio.

Per evitare che lo stampo in rilievo del master si deformi, è necessario sottoporlo a un riscaldamento ad alte temperature, in modo da rendere il master più resistente agli sbalzi termici. Nel mio caso, è stato riscaldato a 120°C per 30 minuti su una piastra riscaldante, per preparare il master al riscaldamento a 80°C in fase di *replica molding*.

In seguito, per evitare che il substrato crei legami covalenti con il PDMS, è necessario procedere con la silanizzazione del master. Il processo consiste nella deposizione per evaporazione di un sottile strato di silano (*1H,1H,2H,2H-Perfluoroctyltrichlorosilane*, 97%, Thermo Scientific Chemicals), sulla superficie del master. A tale scopo viene utilizzata una pompa a vuoto collegata a un essiccatore, con al suo interno i master da silanizzare e una boccetta contenente circa 120 μL di silano (Fig. 2.15).

È prevista un'ora di esposizione con la pompa a vuoto accesa, seguita da un'ora di esposizione con la pompa a vuoto spenta. La silanizzazione viene svolta interamente sotto cappa chimica, dato che il silano è una sostanza tossica.

Una volta eseguiti questi due trattamenti, il master è ultimato e, se ben conservato, può essere riutilizzato un numero indefinito di volte come stampo per la produzione di repliche in PDMS.



Figura 2.15: Silanizzazione del master con pompa a vuoto ed essiccatore.

Sono stati analizzati tutti i master prodotti con un profilometro a contatto (*P-17* – KLA Tencor). Nella Tabella 2.6 sono riportate le misure di altezza media delle diverse strutture analizzate. Come si può notare, il master 2Tj presenta delle strutture molto più alte dei due master iniziali, nonostante siano state seguite le stesse identiche procedure in fase di fabbricazione rispetto agli altri due master.

Master	1ff	1Tj	2Tj
Strizione (μm)	40.0 ± 0.1	-	-
Canale in ingresso (μm)	41.0 ± 0.1	40.0 ± 0.1	62.6 ± 0.2
Vasca (μm)	41.4 ± 0.1	40.0 ± 0.1	63.0 ± 0.3

Tabella 2.6: Misure di altezza media delle strutture del master con il profilometro

La causa di questa differenza è da imputare a una maggiore viscosità del fotoresist, determinata da una minore temperatura durante la fabbricazione di quel master. Maggiori dettagli verranno forniti nella Sezione 3.3.

2.2.2 Produzione della replica

Per produzione di una replica si intende l'insieme dei processi necessari alla realizzazione di un oggetto che replichi le geometrie impresse sullo stampo in rilievo di un master. Questi processi sono riconducibili a uno specifico insieme di tecniche litografiche che permettono la produzione di strutture tridimensionali in scala micro e nanometrica, chiamate tecniche soft-litografiche. Un generico dispositivo microfluidico è composto da un substrato, una replica e dei capillari di ingresso al chip, detti inlet, e di uscita, detti outlet (Fig. 2.6). Per tutti i chip fabbricati, come substrato è stato utilizzato un vetrino coprioggetto, mentre la replica è stata prodotta in PDMS.

Dal punto di vista fisico, il PDMS è un elastomero, ossia un cristallo amorfo con una temperatura di transizione vetrosa inferiore alla temperatura ambiente. Un cristallo amorfo non possiede una transizione di fase in senso classico, ma una transizione vetrosa, ossia una transizione durante la quale la temperatura della sostanza non è costante ma subisce variazioni; di conseguenza, non esistendo una precisa temperatura di fusione, viene definita una temperatura di glassificazione come temperatura "intermedia" della transizione vetrosa in cui la sostanza non è né liquida né cristallina. Questo implica che, a temperatura ambiente, il PDMS è elastico e non rigido. Questa caratteristica facilita il processo di rimozione della replica; in particolare, fa in modo che durante l'estrazione non vengano danneggiate le strutture stampate sul PDMS.

Dal punto di vista chimico, il PDMS è un polimero siliconico (Fig. 2.16) ampiamente utilizzato in diversi ambiti grazie alle sue numerose proprietà, tra cui il fatto di essere biocompatibile e chimicamente inerte. Le due proprietà per cui è diventato il materiale standard per la produzione di chip microfluidici sono la trasparenza, che semplifica le osservazioni dei chip al microscopio, e la sua alta capacità di replicazione delle strutture con cui viene a contatto, caratteristica cruciale per poter fungere efficacemente da corpo di un chip con strutture dalle dimensioni micrometriche.

Tuttavia, il PDMS possiede anche alcuni limiti, ai quali bisogna prestare particolare attenzione in fase di progettazione del chip. Il maggiore tra tutti è la bassa capacità di autosorreggimento: nel caso in cui il rapporto tra l'altezza e la larghezza delle strutture sia molto alto o molto basso è probabile che il PDMS, una volta che abbia reticolato, non sia in grado di sostenere il proprio peso, a causa della sua elasticità a temperatura ambiente, e presenti strutture distorte e poco fedeli al progetto iniziale, come mostrato nello schema in Figura 2.17.

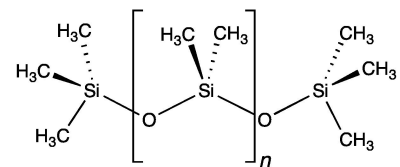


Figura 2.16: Formula chimica del polidimetilsilossano (PDMS)

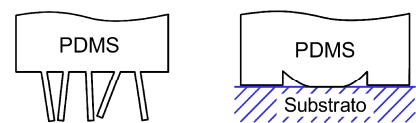


Figura 2.17: Due possibili casi di deformazione di strutture in PDMS con fattore di forma estremo.

Un ulteriore limite del PDMS è dato dal fenomeno dello *swelling*: in seguito a un prolungato contatto con liquidi, a causa della sua porosità, il PDMS è soggetto a un rigonfiamento delle superfici bagnate; questo fenomeno prende il nome di swelling ed è un effetto di grande disturbo sul funzionamento di un qualsiasi chip microfluidico, specialmente nei casi in cui il chip debba essere utilizzato più volte. Lo swelling trasforma le dimensioni delle strutture del chip, alterando l'andamento del campo di pressione al suo interno e modificando quindi le caratteristiche delle emulsioni prodotte dal chip, variandole rispetto a quelle previste in fase di progettazione.

Preparazione del pdms

Il primo passo per la costruzione di una replica è la preparazione del PDMS; per il suo corretto impiego, va mischiata una base (*184 Silicone Elastomer Base*) assieme ad un suo specifico catalizzatore (*184 Silicone Elastomer Curing Agent*) in proporzione di massa 10 : 1.

Conoscendo la densità del PDMS ($\rho = 0.965 \text{ g/cm}^3$) e le dimensioni del master, è possibile calcolare la quantità necessaria di PDMS da produrre. Nel caso dei chip da me prodotti, è stato considerato uno spessore del corpo di circa 5mm, di conseguenza sono stati mischiati 13g di base e 1.3g di catalizzatore.

Una volta pesati, gli ingredienti vanno mischiati e, affinché il passaggio successivo avvenga rapidamente, è conveniente intrappolare più bolle d'aria possibili all'interno del miscuglio.

Per effettuare il degasamento del PDMS, ossia la rimozione di tutte le bolle d'aria rimaste intrappolate all'interno del miscuglio nel recipiente, si usa una pompa a vuoto (Fig. 2.18). Nel momento in cui non sono più visibili bolle d'aria nel recipiente, il PDMS è stato completamente degasato ed è pronto per essere versato sullo stampo.



Figura 2.18: Degasamento del PDMS.

Replica molding

Il processo di replica molding è il processo grazie al quale le strutture del master vengono incise sul corpo in PDMS. Dopo aver creato una camera di stampo, ad esempio avvolgendo il master con dei fogli di carta di alluminio, è possibile versare il PDMS al suo interno.

Si procede con il riscaldamento della camera di stampo in un forno per circa 45' a 80°C. Il tempo e la temperatura sono stati scelti sulla base di sperimentazioni effettuate precedentemente all'interno del laboratorio, questi parametri incidono soprattutto sulla rigidità (*stiffness*) del corpo della replica. Durante questo processo il PDMS va incontro a una reticolazione, replicando tutte le strutture sullo stampo.

In seguito, una volta raffreddato lo stampo, è possibile separare il corpo della replica in PDMS dal master, processo chiamato distacco del PDMS. In seguito, è necessario procedere con la sagomatura del PDMS; viene utilizzato un cutter per ritagliare il corpo della replica, eliminando le regioni di PDMS ai bordi, lontane dalla zona stampata. Infine, viene eseguita la foratura del corpo della replica nelle zone destinate al collegamento di inlet o outlet (Fig. 2.19). È stato usato un punzonatore con diametro esterno di 1mm, combaciante con il diametro esterno dei capillari a disposizione per il chip.

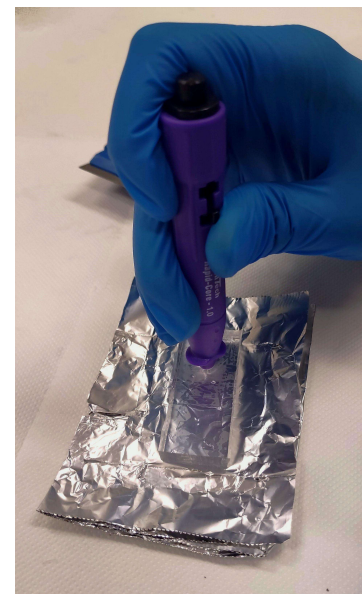


Figura 2.19: Foratura di una replica in PDMS con un puncher.

Chiusura e ultimazione del chip

La chiusura del chip avviene con l'adesione tra il vetrino coprioggetto e la faccia incisa della replica. Il PDMS è un composto inerte, dunque è necessario procedere con un trattamento al plasma per attivare la superficie del vetrino e del corpo della replica in PDMS e rendere possibile la formazione di legami covalenti tra le due superfici, una volta messe a contatto. Il trattamento viene eseguito con la macchina al plasma d'ossigeno presente all'interno della clean room ISO-8, con un ciclo di circa 50 s. Dopo il trattamento, si può procedere con la chiusura del chip.

Vengono usati dei capillari in Teflon (politetrafluoroetilene), con diametro interno di 0.5 mm e diametro esterno di 1 mm, da infilare negli appositi fori eseguiti sul corpo della replica in PDMS; inoltre, vengono usati dei capillari in silicone con diametro interno di 0.7 mm come giunzioni tra capillari, da infilare alle loro estremità. In seguito, è conveniente fissare i capillari in Teflon al corpo in PDMS applicando una colla attorno al capillare, in corrispondenza del foro sulla superficie esposta della replica.

Una volta applicati e fissati i capillari, per ultimare il chip e renderlo utilizzabile, è necessario un ultimo trattamento, la silanizzazione dei canali.

Questo processo prevede la deposizione di un film d'olio in prossimità delle pareti dei condotti per renderle idrofobe e ha lo scopo di impedire che le gocce rimangano attaccate alle superfici dei canali durante l'uso del chip. Per fare questo, si effettua un'infusione del chip usando una pompa a siringa; viene utilizzata una soluzione composta da olio FC-40 (*3M™ Fluorinert™ Electronic Liquid FC-40*) con disciolto il 3% di silano (lo stesso utilizzato per la silanizzazione del master, descritta nella Sezione 2.2.1), in rapporto volume/volume. Ad infusione completata, si tappano tutti gli inlet e gli outlet del chip e si attendono circa 15', in cui viene lasciato il chip a riposo (Fig. 2.20).

Infine, viene rimossa la soluzione contenente silano lavando i canali con olio NOVEC 7500 (*3M™ Novec™ 7500 Engineered Fluid*), utilizzato in seguito come fase continua.

È importante che venga effettuato un lavaggio interno completo del chip: nel caso in cui il lavaggio sia parziale o troppo rapido, è possibile che il silano in eccesso, rimasto all'interno dei canali, cristallizzi e formi dei agglomerati, che potrebbero in un secondo momento otturare i canali del chip, durante il suo utilizzo. Se un agglomerato di silano occlude un condotto fondamentale per il funzionamento del chip, come potrebbe essere una giunzione o una strettoia, e risulta impossibile rimuoverlo, il chip è irrimediabilmente compromesso e deve essere gettato.

Concluso il processo di silanizzazione dei canali, il chip microfluidico è ultimato ed è pronto ad essere usato (Fig. 2.21).

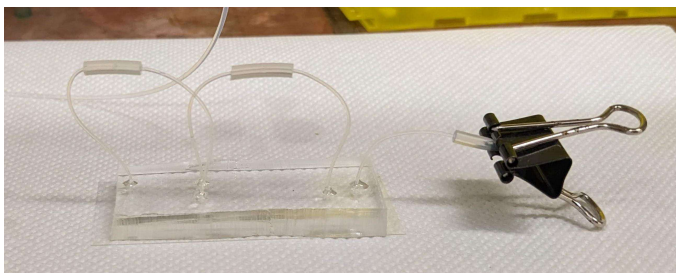


Figura 2.20: Silanizzazione dei canali.

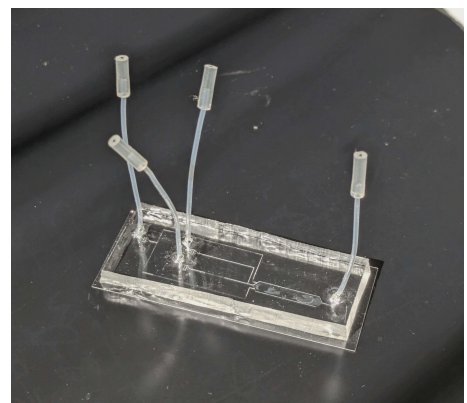


Figura 2.21: Chip ultimato (1Tj).

Capitolo 3

Misure e analisi dati

3.1 Apparato sperimentale

3.1.1 Hardware – materiali e dispositivi

Come fase continua da immettere nel chip è stata usata una soluzione di olio HFE 7500 (*3M™ Novec™ 7500*) miscelato con il 2% di Krytox (*Krytox™ 157 FSH Oil*), un surfattante che diminuisce la tensione interfacciale tra acqua e l'olio impiegato e quindi aiuta la formazione di gocce d'acqua e ne limita la coalescenza.

Come fase dispersa è stata usata acqua ultrapura (*Arioso UP900* – Montreal Biotech Inc.). Entrambe le fasi, dispersa e continua, sono state ulteriormente filtrate utilizzando un filtro in Teflon da 0.2 μm , in modo da eliminare impurità in grado di ostruire i canali. La viscosità della fase continua è $\mu = 1.61$ cP, mentre la tensione interfacciale tra le due fasi è $\gamma = 0.543$ mN/m [11].

Le due fasi sono state immesse negli inlet del chip attraverso dei capillari collegati a delle pompe a siringa. I capillari, in Teflon, sono dello stesso tipo di quelli utilizzati durante la fabbricazione del chip, con diametro interno di 0.5 mm e diametro esterno di 1 mm (Fig. 3.1).

Le pompe a siringa utilizzate (*NE-300* – KF Technologies) (*Pico 11 Elite* – Harvard Apparatus) permettono di immettere nel chip un flusso costante di liquido, impostabile manualmente, tramite un meccanismo a vite senza fine che spinge lo stantuffo della siringa caricata (Fig. 3.2).

Per osservare le gocce all'interno del chip è stato utilizzato un microscopio invertito (*Eclipse Ti* – Nikon); le ottiche, poste al di sotto del piatto del microscopio, permettono di visualizzare il chip dal lato trasparente del vetrino, così da poter ottenere immagini nitide delle gocce (Fig. 3.2).

Sono stati usati principalmente due obiettivi: un obiettivo 4 \times , per avere una visione d'insieme della vasca e delle rete di canali del chip, e un obiettivo 10 \times , per osservare nel dettaglio le singole gocce prodotte dalla giunzione.

Per osservare in tempo reale cosa accade nel chip e catturare sequenze di immagini è stata usata una telecamera (*Eosens CL MC1362* – Mikrotron) (Fig. 3.2) agganciata a uno slot di uscita ottica del microscopio e collegata a un computer.

Ogni volta che viene modificato un flusso in ingresso di una pompa, il sistema necessita di un certo tempo per stabilizzarsi per raggiungere un nuovo equilibrio. Durante l'intervallo di transizione, le dimensioni delle gocce prodotte e la frequenza di produzione subiscono una variazione continua; di conseguenza, per osservare una produzione stabile di gocce, è necessario attendere qualche minuto dall'accensione delle pompe, oppure dall'ultima modifica dei flussi in ingresso. Una volta che il sistema è stabile, si può procedere con l'acquisizione delle immagini.

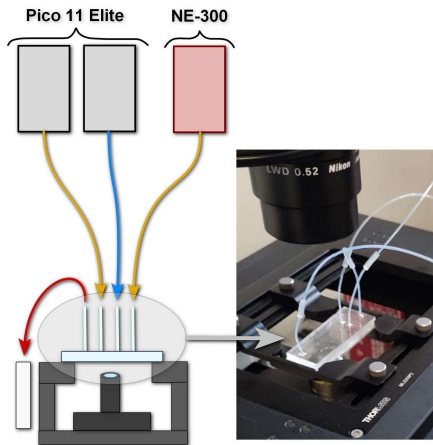


Figura 3.1: Schema del setup.



Figura 3.2: Apparato strumentale completo.

3.1.2 Software – analisi delle acquisizioni

La telecamera è comandata dal software *MC ControlTool* (vers. 1.5.127.2), dal quale è possibile impostare diversi parametri, come la frequenza di acquisizione, il tempo di apertura, la dimensione del buffer di acquisizione per il salvataggio delle immagini e molti altri. Per visualizzare in tempo reale il chip e gestire le acquisizioni è stato adoperato il software *microDisplay* (vers. 5.5.1), tramite il quale è anche possibile scegliere se usare la telecamera per acquisire un singolo fotogramma, oppure per acquisire una sequenza di immagini.

Per effettuare misure delle grandezze caratteristiche del chip a partire dalle acquisizioni è stato usato il software di analisi *ImageJ* (vers. 1.53c). Una volta caricate immagini o sequenze, questo programma permette di impostare un fattore di conversione da metri in pixel ed effettuare misure di lunghezza e di superficie. Il fattore di conversione, da ricavare per ogni obiettivo, è stato ottenuto misurando in pixel le strutture stampate su un vetrino di calibrazione: un vetrino da microscopio con impresse delle figure dalle dimensioni note. Per l'obiettivo $10\times$ è stato misurato un fattore di conversione di $(1.396 \pm 0.002) \mu\text{m}/\text{pixel}$.

Una volta ultimati i chip prodotti, la prima analisi è stata una misurazione delle dimensioni effettive delle loro strutture, per confrontarle con quelle del progetto (Tab. 2.1). Le misure sono riportate nella Tabella 3.1.

Chip	1ff	1Tj	2Tj
Canale acqua (μm)	121 ± 1	121 ± 1	121.5 ± 5
Canale olio (superiore)(μm)	121 ± 1	120 ± 1	121.2 ± 0.8
Canale olio (inferiore)(μm)	121.7 ± 0.6	–	–
Strizione (μm)	48.5 ± 0.4	–	–
Canale di uscita (μm)	148.8 ± 0.8	121 ± 1	120.9 ± 0.6

Tabella 3.1: Misure di larghezza (μm) delle strutture caratteristiche dei chip prodotti.

L'analisi delle sequenze di immagini è stata effettuata adoperando un software programmato in *Labview 2022*. Il programma è in grado di individuare automaticamente le gocce passanti all'interno di un canale tramite il riconoscimento dei loro menischi ed è in grado di fornire valor medio delle dimensioni, la variazione percentuale della dimensione e altri parametri che caratterizzano dell'emulsione generata.

3.2 Caratterizzazione delle giunzioni

In seguito ad alcune di prove di acquisizione con entrambi i primi due chip fabbricati, 1ff e 1Tj, sono state identificate delle configurazioni di coppie di flussi in ingresso per fase continua confluyente direttamente nella giunzione (ϕ_{fc}) e fase dispersa (ϕ_{fd}). Esse sono state usate per caratterizzare la T-junction e la flow-focusing e individuare la giunzione più adatta alla produzione di un cristallo microfluidico. Tutte le configurazioni sono state riportate nella Tabella 3.2. Per quanto riguarda l'olio confluyente nella vasca, è stato impostato un flusso di $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$ ed è stato mantenuto invariato per tutte le configurazioni.

ϕ_{fd} ($\mu\text{L}/\text{min}$)	ϕ_{fc} ($\mu\text{L}/\text{min}$)
0.1	0.3 ; 0.4 ; 0.5 ; 0.6 ; 0.7 ; 0.8 ; 0.9
0.2	0.4 ; 0.6 ; 0.8 ; 1.0 ; 1.2 ; 1.4 ; 1.6 ; 1.8

Tabella 3.2: Configurazioni di flussi per la caratterizzazione delle due giunzioni.

Per l'analisi delle emulsioni prodotte, è stato impostato il canale di ingresso alla vasca come regione di ricerca delle gocce. La dimensione misurata corrisponde alla lunghezza delle gocce, come mostrato in Figura 3.3. A partire dai dati di lunghezza acquisiti, conoscendo le dimensioni del canale, è possibile ricavare il volume delle gocce e stimare il loro diametro una volta confluite nella vasca.

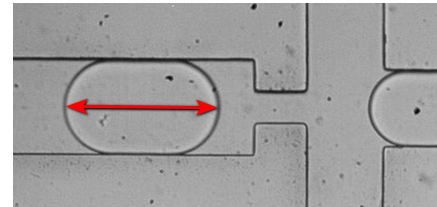


Figura 3.3: Misurazione della lunghezza di una goccia prodotta da 1ff.

I due parametri più importanti dell'emulsione per la caratterizzazione di una giunzione sono la variazione percentuale della dimensione delle gocce, la dimensione media delle gocce e la frequenza di produzione. Per ottenere un cristallo microfluidico, la monodispersità delle gocce sospese è molto più fondamentale della loro frequenza di produzione; di conseguenza, l'analisi si è concentrata sulla fluttuazione percentuale del volume delle gocce prodotte e sulla loro dimensione media.

I risultati sono schematizzati nei quattro grafici riportati in Figura 3.4.

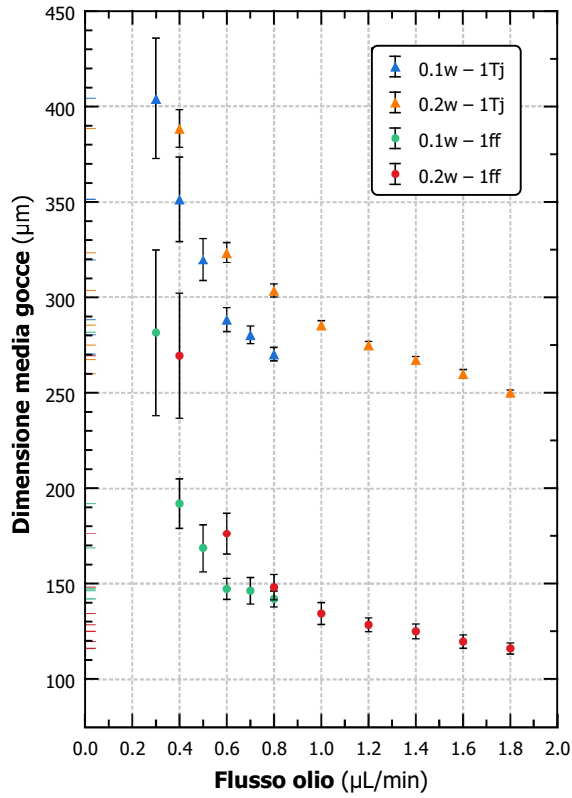
Il primo grafico (Fig. 3.4a) mostra subito una prima differenza tra le due giunzioni, ossia il grande divario tra le dimensioni delle gocce prodotte, a parità di flussi. La T-junction produce emulsioni composte da gocce mediamente molto più grandi di quelle prodotte dalla flow-focusing. Inoltre mostra come, per entrambe le giunzioni, un aumento di ϕ_{fc} , a parità di ϕ_{fd} , corrisponda a una diminuzione delle dimensioni delle gocce prodotte.

Il secondo grafico (Fig. 3.4b) mette in evidenza l'effetto della variazione di entrambi i flussi sulle dimensioni; infatti, a parità di rapporto ϕ_{fc}/ϕ_{fd} , per entrambe le giunzioni, flussi più alti corrispondono a dimensioni minori delle gocce prodotte.

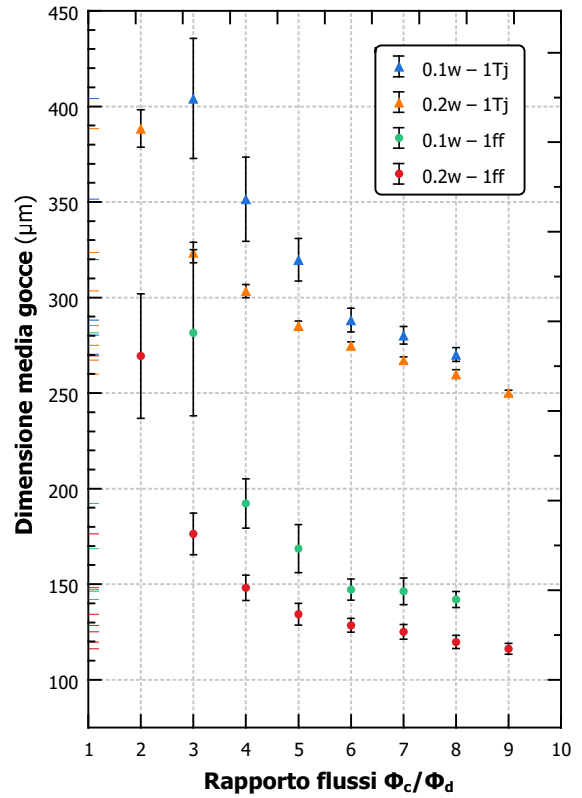
Il terzo grafico (Fig. 3.4c) mostra in maniera più chiara l'andamento della variazione percentuale delle dimensioni delle gocce in funzione di ϕ_{fc} . Si nota innanzitutto che la flow-focusing produce emulsioni con maggiore variazione percentuale sulla dimensione delle gocce rispetto alla T-junction, indipendentemente da ϕ_{fc} e ϕ_{fd} . Inoltre il grafico mette in evidenza la relazione tra ϕ_{fc} e variazione percentuale, dove un aumento del primo corrisponde a una diminuzione della seconda.

Il quarto grafico (Fig. 3.4d), infine, oltre a confermare la minore variazione percentuale associata alle emulsioni prodotte dalla T-junction, rende evidente l'effetto della variazione di entrambi i flussi sulla monodispersità. Si può notare infatti che, a parità di rapporto ϕ_{fc}/ϕ_{fd} , per entrambe le giunzioni, flussi più alti portano a una minore variazione percentuale della dimensione delle gocce prodotte.

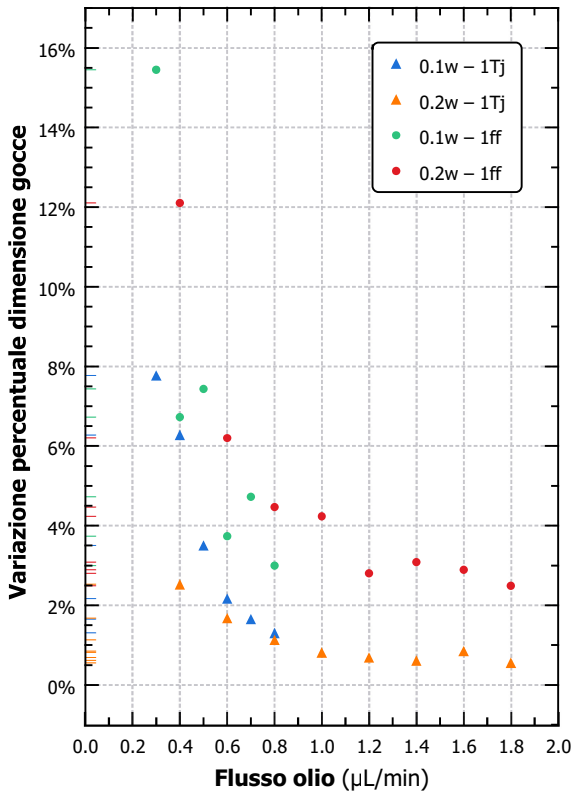
La più bassa variazione percentuale della dimensione delle gocce, uguale a 0.56% , è stata raggiunta con la T-junction impostando la configurazione ($\phi_{fd} = 0.2 \mu\text{L}/\text{min}$; $\phi_{fc} = 1.8 \mu\text{L}/\text{min}$). Questo rappresenta un risultato notevole, anche confrontandolo con i risultati di pubblicazioni inerenti alla produzione di emulsioni monodisperse [3, 12].



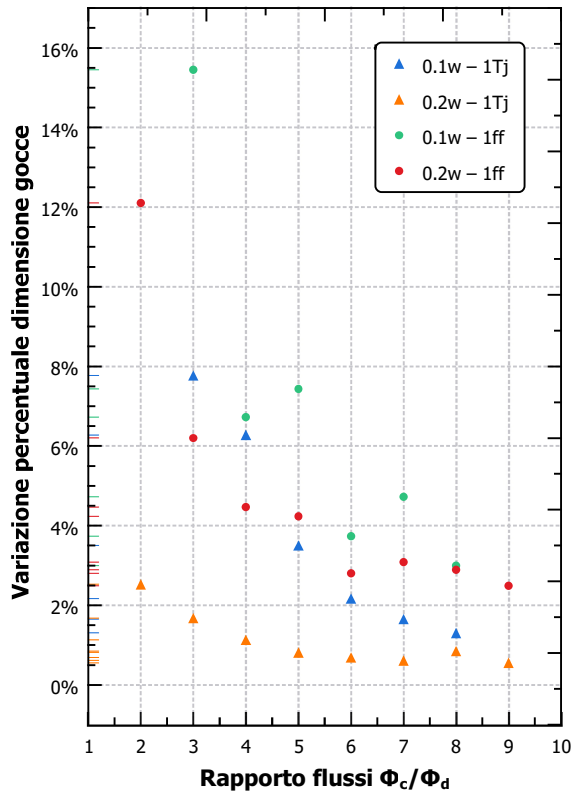
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 3.4: Analisi delle misure effettuate sulle gocce prodotte per i chip 1Tj e 1ff, utilizzando le configurazioni di flussi riportate in Tabella 3.2.

3.3 Cristallo microfluidico

Alla luce dei risultati ottenuti in seguito alla caratterizzazione delle due giunzioni, in particolare per quanto riguarda le informazioni sulla variazione percentuale della dimensione delle gocce, ricavate dai grafici 3.4c e 3.4d, si è deciso di procedere con la fabbricazione di un terzo chip, "2Tj", dotato di una T-junction per la produzione di emulsioni altamente monodisperse.

La vasca di questo nuovo chip è stata dimensionata basandosi sulle stime fatte a partire dalle misure raccolte sulla dimensione delle gocce, in modo da poter ospitare un cristallo microfluidico di sufficienti dimensioni. È stata considerata una larghezza minima della vasca di circa 10 gocce; di conseguenza, partendo da una stima di diametro delle gocce prodotte di $160\ \mu\text{m}$, è stata progettata una vasca larga circa 2 mm (Tabella 2.1).

È stato mantenuto lo stesso design usato in precedenza della T-junction e dei canali, tuttavia sono stati aggiunti due piccoli canali laterali di uscita dalla vasca, confluenti in un outlet secondario, visibili in Figura 3.5, oltre che nel progetto in Figura 2.5. La presenza di un outlet aggiuntivo, collegato direttamente alla vasca, permette di tappare l'outlet principale una volta che sia stato prodotto il cristallo microfluidico.

I due canali secondari di uscita dalla vasca sono larghi appena $25\ \mu\text{m}$, come riportato in Tabella 3.1, per evitare che anche le gocce defluiscano verso il secondo outlet, una volta che quello principale sia stato tappato. In questo modo è possibile studiare la stabilità del cristallo microfluidico, infatti l'emulsione rimane vincolata all'interno della vasca, mentre la fase continua è libera di scorrere e defluire verso l'outlet secondario. Utilizzando un chip con un singolo outlet, invece, non è possibile tappare l'unico outlet, a meno di spegnere anche tutte le pompe.

Come descritto in fondo alla Sezione 2.2.1, le strutture del master per la fabbricazione del nuovo chip risultano essere molto più alte rispetto alle strutture dei due master precedenti.

In quelle settimane, un guasto al sistema di condizionamento dell'aria ha messo temporaneamente fuori uso il sistema di termoregolazione delle clean rooms. La temperatura interna, più bassa rispetto alle condizioni standard, ha fatto in modo che la viscosità del SU-8 aumentasse e, di conseguenza, con lo stesso programma di spin coating, il fotoresist si spandesse meno sul substrato, ottenendo uno strato più spesso.

Nonostante l'inconveniente, è stato deciso di procedere con la fabbricazione del chip, con l'obiettivo di usarlo per produrre un cristallo microfluidico.

Una volta ultimato il chip, si è proceduto inizialmente effettuando delle prove di formazione di gocce, con le stesse configurazioni di flussi adoperate per la caratterizzazione delle giunzioni, riportate nella Tabella 3.2. Essendo il nuovo chip caratterizzato da sezioni interne diverse in corrispondenza della giunzione rispetto al chip 1Tj, non è stato possibile effettuare sessioni di confronto per replicare e confermare i risultati ottenuti con il vecchio chip.

Durante le prove si è notato un comportamento anomalo dell'emulsione prodotta. Una volta entrate nella vasca, le gocce si arrestavano, come se avessero incontrato un ostacolo, e non attraversavano la zona centrale; invece, tendevano a spostarsi lateralmente e percorrere l'intera vasca lungo le fasce laterali (Fig. 3.5).

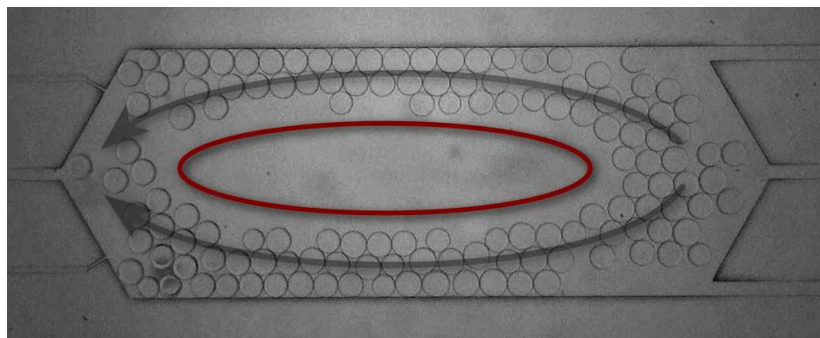


Figura 3.5: Frame estratto da un'acquisizione effettuata durante una prova di produzione gocce con il chip 2Tj. La configurazione di flussi impostata era ($\phi_{fd} = 0.2\ \mu\text{L}/\text{min}$; $\phi_{fc} = 1.6\ \mu\text{L}/\text{min}$).

È stato prodotto un secondo chip a partire da una nuova replica creata dallo stesso master, ma anch'esso, durante le prove di formazione di gocce, era affetto dallo stesso problema del primo. Questo ha confermato il fatto che l'effetto fosse almeno in parte causato dall'altezza anomala delle strutture incise sul master.

Purtroppo, i lavori al sistema di condizionamento dell'aria effettuati nelle settimane successive al guasto hanno escluso la possibilità di poter costruire un nuovo master entro il periodo di svolgimento di questa tesi.

La strategia inizialmente adottata per aggirare il problema è stata quella di sfruttare l'elasticità del PDMS e provare ad effettuare delle misure con il chip capovolto, in modo che il peso del "soffitto" in PDMS della vasca non deformasse la struttura della vasca stessa, in modo analogo allo schema riportato in Figura 2.17 a destra.

Per farlo, è stato costruito un apposito setup di acquisizione. Come fotocamera è stata usata una Dino-cam (*AM4113ZT* – Dino-Lite) fissata su un apposito supporto e comandata dal software *DinoCapture 2.0* (vers. 1.5.48) (Fig. 3.6).

Le prove effettuate hanno avuto lo stesso esito delle precedenti, con il medesimo comportamento anomalo delle gocce. Queste prove hanno escluso ogni possibile contributo determinante all'anomalia da parte della deformazione del soffitto, a causa del fattore di forma estremo della vasca. Questo è anche confermato dal fatto che i chip 1Tj e 1ff, pur essendo dotati di vasche ben più grosse di quella presente nel chip 2Tj (Tab. 2.1), non siano mai stati affetti da problemi di questo genere durante tutte le prove di generazione di gocce e le sessioni di acquisizione.

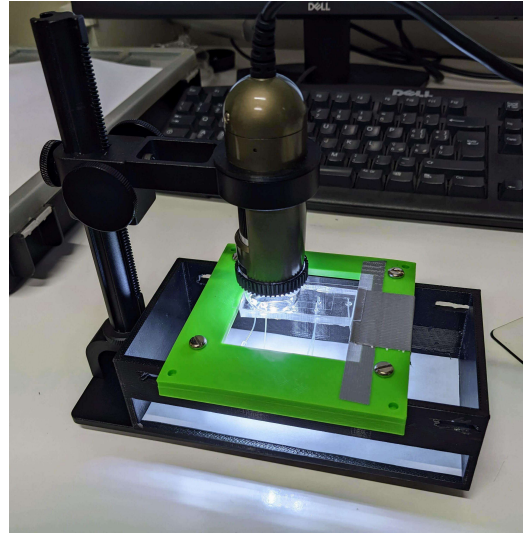


Figura 3.6: Setup con Dino-cam.

Molto probabilmente questo comportamento delle gocce è legato a diversi aspetti, tra cui anche l'anomalia riscontrata nelle misurazioni al profilometro dell'altezza delle strutture del master.

Normalmente, in seguito allo spin coating, il fotoresist non è distribuito in modo perfettamente omogeneo sul substrato, ma assume uno spessore minimo praticamente uniforme nella zona centrale [13]. La maggiore viscosità, rallentando il processo di spargimento durante lo spin coating, può aver accentuato il profilo convesso del fotoresist.

Inoltre, sono stati individuati due ulteriori possibili fattori responsabili del fatto che l'effetto sia visibile solamente all'interno della vasca:

- Anche se l'anomalia interessa l'intero master, la vasca è l'unica regione abbastanza estesa perché gli effetti della malformazione possano essere riconosciuti chiaramente. Essa è l'unica struttura in cui le gocce trasportate dal flusso di fase continua hanno libertà di movimento planare; di conseguenza, anche le deformazioni più piccole possono influenzare il loro moto all'interno della vasca in modo molto evidente. D'altro canto, tutte le altre strutture che trasportano l'emulsione possiedono una geometria di costruzione che vincola le gocce a muoversi lungo una singola direzione; di conseguenza, la ristretta libertà di movimento rende meno evidenti gli effetti causati da una piccola anomalia. È il caso, ad esempio, dei canali di ingresso e di uscita dalla vasca, la cui larghezza assume un valore massimo di $150\ \mu\text{m}$, maggiore rispetto al diametro stimato all'interno della vasca di $160\ \mu\text{m}$.
- Geometricamente, la vasca occupa una posizione centrale all'interno del progetto del chip, come è possibile osservare in Figura 2.5. È dunque molto probabile che, nell'operazione di centramento del disegno sul master per l'esposizione con la μMLA , essa sia stata incisa sulla regione centrale del master, dove si trova teoricamente il punto di minimo spessore di fotoresist, accentuando quindi l'effetto subito dalle gocce in conseguenza della deformazione.

Capitolo 4

Conclusioni

Questa tesi rappresenta uno studio preliminare per la fabbricazione di dispositivi microfluidici in grado di generare emulsioni monodisperse e realizzare un cristallo microfluidico al loro interno.

Sono stati fabbricati inizialmente due chip, dotati di diverse giunzioni, entrambi in grado di generare emulsioni monodisperse. È stata condotta un'analisi precisa sulle caratteristiche delle emulsioni prodotte dai due chip, studiando la dimensione media e la fluttuazione percentuale delle gocce prodotte al variare dei flussi di fase continua e fase dispersa in ingresso nei chip, confrontando i risultati con l'articolo di riferimento in letteratura. Nonostante entrambe le giunzioni siano adatte alla produzione di emulsioni monodisperse, da questa analisi è emerso che la T-junction genera gocce con una variazione percentuale sulla dimensione nettamente minore rispetto alla flow-focusing. La caratterizzazione delle giunzioni ha dunque fornito gli strumenti necessari alla progettazione e costruzione di un nuovo chip, dotato della giunzione e delle strutture più adatte alla formazione di un cristallo microfluidico.

Durante le prove per l'acquisizione dati con il terzo chip è emersa una criticità, dovuta a un'anomalia del master, che ha impedito la realizzazione di un cristallo microfluidico al suo interno. I tentativi effettuati per aggirare il problema riscontrato non hanno portato al raggiungimento dell'obiettivo prefissato; tuttavia, hanno fornito diverse informazioni utili per eventuali prossimi tentativi di realizzazione di un cristallo microfluidico all'interno di un chip.

Per futuri studi su questa tipologia di chip possono essere suggerite alcune migliorie.

In primo luogo, va studiata attentamente una strategia per isolare il cristallo microfluidico nel chip ed evitare che venga disturbato dalla formazione di nuove gocce di diverse dimensioni, in seguito allo spegnimento dei flussi in ingresso. Durante questo lavoro non si è affrontato il problema dell'isolamento dell'emulsione, una volta generata e convogliata all'interno della vasca; tuttavia, lo spegnimento improvviso delle pompe darebbe inizio a un intervallo di transizione, caratterizzato dalla produzione di gocce di dimensioni variabili, che potrebbero rovinare l'alta monodispersità del cristallo nella vasca. Inoltre, va posta assoluta attenzione nel controllo di tutti i parametri di tutte le procedure necessarie alla fabbricazione del chip. Come è accaduto con il chip 2Tj, una qualsiasi anomalia durante la fabbricazione può compromettere irrevocabilmente il funzionamento chip costruito, rendendolo inutilizzabile.

Bibliografia

- [1] D. Ferraro, *Microdroplets: fabrication of microdevices for interfacial phenomena studies*, PhD thesis, Università degli Studi di Padova (2013).
- [2] P. K. Kundu, I. M. Cohen, D. R. Dowling, and G. Tryggvason, *Fluid Mechanics*, Sixth edition (Elsevier/AP, Amsterdam; Boston, 2016).
- [3] M. Seo, Z. Nie, S. Xu, P. C. Lewis, and E. Kumacheva, *Microfluidics: From Dynamic Lattices to Periodic Arrays of Polymer Disks*, *Langmuir* **21**, 4773 (2005).
- [4] C. N. Baroud, F. Gallaire, and R. Danga, *Dynamics of Microfluidic Droplets*, *Lab Chip* **10**, 2032 (2010).
- [5] G. M. Whitesides, *The Origins and the Future of Microfluidics*, *Nature* **442**, 368 (2006).
- [6] R. Seemann, M. Brinkmann, T. Pfohl, and S. Herminghaus, *Droplet Based Microfluidics*, *Rep. Prog. Phys.* **75**, 016601 (2012).
- [7] L. Shang, Y. Cheng, and Y. Zhao, *Emerging Droplet Microfluidics*, *Chem. Rev.* **117**, 7964 (2017).
- [8] T.-D. Dang, Y. H. Kim, H. G. Kim, and G. M. Kim, *Preparation of Monodisperse PEG Hydrogel Microparticles Using a Microfluidic Flow-Focusing Device*, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **18**, 1308 (2012).
- [9] T. N. D. Trinh, H. D. K. Do, N. N. Nam, T. T. Dan, K. T. L. Trinh, and N. Y. Lee, *Droplet-Based Microfluidics: Applications in Pharmaceuticals*, *Pharmaceuticals* **16**, 937 (2023).
- [10] A. Huebner, S. Sharma, M. Srisa-Art, F. Hollfelder, J. B. Edel, and A. J. deMello, *Microdroplets: A Sea of Applications?*, *Lab Chip* **8**, 1244 (2008).
- [11] S. G. K. Calhoun, K. K. Brower, V. C. Suja, G. Kim, N. Wang, A. L. McCully, H. Kusumaatmaja, G. G. Fuller, and P. M. Fordyce, *Systematic Characterization of Effect of Flow Rates and Buffer Compositions on Double Emulsion Droplet Volumes and Stability*, *Lab Chip* **22**, 2315 (2022).
- [12] A. Kalantarifard, E. Alizadeh-Haghighi, A. Saateh, and C. Elbuken, *Theoretical and Experimental Limits of Monodisperse Droplet Generation*, *Chemical Engineering Science* **229**, 116093 (2021).
- [13] L. W. Schwartz and R. V. Roy, *Theoretical and Numerical Results for Spin Coating of Viscous Liquids*, *Physics of Fluids* **16**, 569 (2004).