

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea Magistrale in Fisica

Tesi di Laurea

**Dispositivo opto-microfluidico in Niobato di Litio per la
caratterizzazione di gocce con nanoparticelle d’Oro**

Relatrice

Prof.ssa Cinzia Sada

Correlatore

Dr. Riccardo Zamboni

Laureando

Leonardo Zanini

Anno Accademico 2017/2018



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI FISICA E ASTRONOMIA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FISICA

Dispositivo opto-microfluidico in Niobato di Litio per la caratterizzazione di gocce con nanoparticelle d'Oro

Tesi di
Leonardo Zanini

Relatrice:

Prof.ssa Cinzia SADA

Candidato:

Leonardo ZANINI

Sessione di Laurea 24 Settembre 2018
ANNO ACCADEMICO 2017/2018

Sommario

La microfluidica è un campo di ricerca interdisciplinare che si occupa di produrre e studiare gocce su scala micrometrica. L'interesse che la microfluidica suscita è legato al controllo e al trasporto di piccole quantità di liquido, all'interno delle quali è possibile ad esempio far avvenire reazioni chimiche e trasportare campioni biologici o marcatori diagnostici. In particolare, l'obiettivo della microfluidica è rivolto principalmente alla realizzazione di dispositivi miniaturizzati detti Lab-On-a-Chip (LOC), su cui ridurre tutte le operazioni di sintesi, separazione e analisi che usualmente richiederebbero diversi apparati di misura. Tuttavia, per analisi ottiche (come l'imaging delle gocce o la rivelazione di fotoni emessi in reazioni chimiche) occorre avvalersi di ingombranti microscopi e fotocamere che eliminano i vantaggi ottenuti con la miniaturizzazione, tra cui in particolare la portabilità. Per questo motivo, risulta dirimente integrare completamente su piccole dimensioni lo stadio ottico con quello microfluidico, obiettivo raggiunto negli ultimi anni mediante la realizzazione di Lab-On-a-Chip in Niobato di Litio. Questo materiale presenta infatti ottime proprietà ottiche per la realizzazione di guide d'onda, con cui poter rilevare le gocce prodotte in un canale microfluidico e il loro contenuto.

Notevole interesse in tale campo suscita la produzione di gocce contenenti nanoparticelle. Anche la nanoscienza è un recente campo di ricerca multidisciplinare che abbraccia diverse scienze quali la chimica, la fisica e l'ingegneria, con lo scopo di controllare la materia a dimensioni al di sotto di 100 nanometri. Numerose sono infatti le possibili applicazioni che emergono con il passaggio alla nanoscala. In ambito medico, ad esempio, le nanoparticelle hanno un grandissimo potenziale per via della loro elevata capacità di penetrazione: le loro piccole dimensioni permettono alle nanoparticelle non solo di entrare in una cellula, ma anche di interagire con i suoi componenti biologici. Di conseguenza esse possono avere importanti applicazioni biomedicali sia a livello diagnostico (identificazione di tessuti danneggiati) sia per terapia selettiva (trasporto di farmaci).

Il lavoro di questa tesi consiste nella caratterizzazione ottica di gocce contenenti nanoparticelle d'Oro mediante un dispositivo opto-microfluidico completamente integrato in Niobato di Litio. Lo studio è rivolto alla comprensione di come nanoparticelle d'Oro confinate in una goccia micrometrica interagiscono con un fascio luminoso, osservando il cambiamento del segnale ottico trasmesso dalle gocce al variare della dimensione e della concentrazione delle nanoparticelle al loro interno. Il fine ultimo del progetto entro cui si inserisce questa tesi è l'ottenimento di un rivelatore di nanoparticelle in diametro e densità. Particolare attenzione è posta inoltre al processo di realizzazione del dispositivo opto-microfluidico, caratterizzandone la qualità e la riproducibilità dei diversi passaggi fabbricativi.

Abstract

Microfluidics is an interdisciplinary research field that deals with producing and studying drops on a micrometric scale. The interest that microfluidics arouses is linked to the control and transport of small amounts of liquid, inside which, for example, it is possible to make chemical reactions occur and to transport biological samples or diagnostic markers. In particular, microfluidics is mainly aimed at the realization of miniaturized devices called Lab-On-a-Chips (LOCs), on which all the operations of synthesis, separation and analysis, that usually require different measurement devices, could be reduced. However, for optical analysis (such as droplet imaging or the detection of emitted photons in chemical reactions) it is necessary to use bulky microscopes and cameras which eliminate the obtained advantages with miniaturization, including in particular portability. For this reason, it is conclusive to integrate completely on a small scale the optical stage with the microfluidic one, an objective achieved in the last few years through the realization of Lab-On-a-Chips in Lithium Niobate. This material has excellent optical properties for the realization of waveguides, by which it is possible to detect the produced drops and their contents in a microfluidic channel.

In this field significant interest raises the production of drops containing nanoparticles. Also nanoscience is a recent multidisciplinary research field that spans various sciences such as chemistry, physics and engineering, with the aim of controlling matter at dimensions below 100 nanometers. Many possible applications emerge thank to the transition to the nanoscale. In medical field, for example, nanoparticles have a great potential due to their high penetration capacity: their small size allows the nanoparticles not only to enter a cell, but also to interact with its biological components. As a consequence, they can have important biomedical applications both at diagnostic level (identification of damaged tissues) and for selective therapy (drug transport).

The work of this thesis consists in the optical characterization of drops containing gold nanoparticles through a completely integrated opto-microfluidic device in Lithium Niobate. The study is aimed at understanding how gold nanoparticles confined in a micrometric drop interact with a light beam, observing the variation of the optical signal transmitted by the drops while the size and the concentration of the nanoparticles inside them vary. The final aim of the project, within which this thesis is inserted, is the obtainment of a nanoparticles' detector in diameter and density. Particular attention is also paid to the realization process of the opto-microfluidic device, characterizing the quality and the reproducibility of its different fabrication steps.

Indice

Introduzione	1
1 Il Niobato di Litio	5
1.1 Composizione e cristallografia	5
1.2 Difetti e drogaggio	7
1.3 Proprietà fisiche	8
1.3.1 Proprietà ottiche	9
2 Fabbricazione e Caratterizzazione del campione	11
2.1 Fabbricazione del campione	11
2.1.1 Realizzazione delle guide d'onda	12
2.1.2 Realizzazione dei canali microfluidici	16
2.1.3 Chiusura su vetro	18
2.1.4 Funzionalizzazione	18
2.2 Caratterizzazione del processo fabbricativo	19
2.2.1 Strisce di photoresist rimosse	19
2.2.2 I canali microfluidici	23
2.2.3 Misure in Near-field e set up sperimentale	26
3 Produzione di gocce con Nanoparticelle	31
3.1 Microfluidica in una T-junction	31
3.2 Proprietà ottiche di nanoparticelle metalliche	33
3.3 Apparato sperimentale	35
3.3.1 Set up per misure in flusso	36
3.3.2 Set up per misure in goccia	37
3.3.3 Le soluzioni di nanoparticelle d'Oro	39
3.3.4 Controllo in pressione	41
4 Misure e Risultati sperimentali	49
4.1 Misure in flusso	49
4.1.1 Misure preliminari	50
4.1.2 Flusso con Nanoparticelle	53
4.2 Misure in goccia	57
4.2.1 Soluzioni standard	59
4.2.2 Variazione in forma	67
4.2.3 Variazione in densità	67

4.2.4	Variazione in diametro	72
5	Conclusioni	75
	Bibliografia	79

Introduzione

Lo studio del controllo e della manipolazione di piccole quantità di liquido su scala micrometrica può avere importanti applicazioni in molti ambiti che spaziano dalla biologia [1] alla medicina [2] fino alla chimica micro-analitica [3]. Di questo si occupa la microfluidica, un campo di ricerca interdisciplinare il cui principale obiettivo consiste nella realizzazione di dispositivi miniaturizzati detti Lab-On-a-Chip (LOC), sui quali poter ridurre processi di sintesi, analisi e caratterizzazione che richiederebbero usualmente diversi apparati di misura. In particolare, le gocce micrometriche in un Lab-On-a-Chip possono essere viste come dei microreattori, all'interno dei quali si possono far avvenire reazioni chimiche o trasportare reagenti e campioni biologici [4][5].

Ciò nonostante, analisi ottiche più complesse, quali l'imaging di gocce o la rivelazione di fotoni emessi in reazioni chimiche, necessitano di ingombranti microscopi o fotocamere che eliminano il principale vantaggio ottenuto con la miniaturizzazione, ovvero la portabilità. Per ovviare a ciò risulta risolutivo integrare completamente su piccole dimensioni lo stadio ottico con quello microfluidico. Nel corso degli ultimi anni, presso il Dipartimento di Fisica e Astronomia dell'Università di Padova [6][7][8], tale obiettivo è stato raggiunto avviando la produzione di Lab-On-a-Chip in Niobato di Litio, materiale sintetizzato in laboratorio con ottime caratteristiche per la realizzazione di guide di luce [9][10], che possono costituire uno stadio ottico perfettamente integrabile sullo stesso campione con i canali microfluidici. Inoltre, il Niobato di Litio presenta numerose proprietà che possono essere importanti in vista di applicazioni successive in un Lab-On-a-Chip: un esempio su tutte è la piezoelettricità, che si può usare per l'intrappolamento di particelle nel canale [11][12][13].

Progettando il chip in modo che le guide di luce siano interrotte nel mezzo dal canale

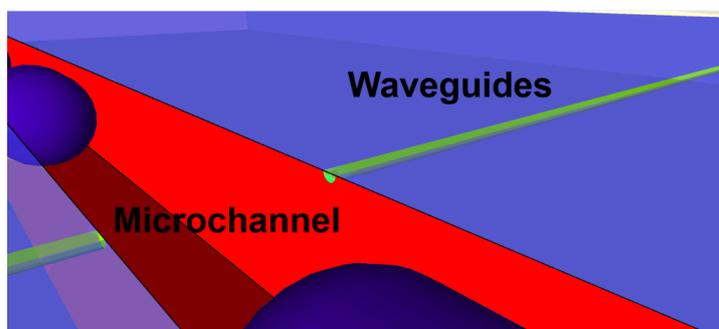


Figura 1: Il canale microfluidico e le guide di luce in un dispositivo opto-microfluidico completamente integrato in Niobato di Litio.

(come in figura 1), si può rilevare un segnale luminoso in trasmissione al passaggio delle gocce microfluidiche nel canale stesso. Poichè la geometria di rivelazione è sensibile al fluido e al profilo della goccia, il segnale ottico trasmesso è associabile alla forma e alla composizione della goccia stessa e ne identifica in modo univoco le sue caratteristiche. Di conseguenza, un dispositivo di questo tipo può essere utilizzato per rivelare ciò che passa in un canale microfluidico all'interno di una goccia micrometrica.

Il presente lavoro di tesi si inserisce quindi in un programma di ricerca ad ampio respiro che mira a sviluppare una piattaforma opto-microfluidica integrata in cui sia possibile identificare, selezionare e suddividere per taglia e caratteristica oggetti di dimensione sub-microscopica immersi in un fluido. Si tratta di un problema generale che ha varie applicazioni in ambito medico, chimico e biologico, con un carattere fortemente interdisciplinare che spazia ad esempio dall'agricoltura, all'analisi delle acque sino al drug-delivery.

La possibilità di identificare un oggetto che si muove in un fluido, in modo forzato o semplicemente disperso in esso, richiede il riconoscimento di un "fingerprint", ovvero di un marcatore che lo caratterizzi in modo univoco. Il progetto in cui si inserisce questa tesi mira all'ottenimento del maggior numero di informazioni possibili sugli oggetti rivelati dalla piattaforma opto-microfluidica. A tal fine, occorre avere un dispositivo che consenta nell'ordine di:

- rilevare il passaggio di oggetti nel canale,
- consentirne il conteggio in modo efficiente, affidabile e rapido,
- classificarli in base ad una proprietà di interesse legata ad osservabili caratteristiche degli oggetti stessi.

Questo approccio è concettualmente diverso rispetto a quello usato comunemente, in cui si abbina l'identificazione alla selezione per poi effettuare il conteggio degli elementi selezionati. In quest'ultimo caso il conteggio è solo un processo di numerazione non associato ad alcuna misurazione di osservabili fisici che portino informazione. L'inversione dell'ordine che si effettua qui, ovvero identificare, contare e selezionare anzichè identificare, selezionare e contare, è un procedimento nettamente più efficiente poichè avviene all'interno di un gruppo omogeneo per proprietà da cui poi si selezionano gli elementi con le caratteristiche ricercate. Affinchè infatti tale selezione possa fornire un contributo significativo in termini predittivi è necessario che il gruppo sia il più numeroso possibile: per ottenere questo risultato è quindi più efficiente invertire l'ordine delle operazioni, selezionando solo dopo il conteggio. E' per questo ambito che l'opto-microfluidica presenta un'enorme potenzialità perchè permette di invertire l'ordine delle operazioni in modo versatile e riproducibile a seconda delle necessità, in modo economicamente sostenibile e compatibile con approcci basati su analisi real-time.

Pertanto, il presente lavoro di tesi si può inquadrare in uno studio di fattibilità dell'impiego di un dispositivo opto-microfluidico per selezionare oggetti sub-micrometrici, operando su di essi analisi non invasive e in tempo reale. In particolare, si cerca di comprendere se sia possibile identificare e selezionare in base alle loro caratteristiche oggetti che fluiscono nel canale microfluidico di un chip opto-microfluidico in Niobato di Litio con la stessa configurazione di figura 1. In questa tesi, si è studiata la possibilità di identificare con questo dispositivo la presenza, all'interno di una goccia micrometrica, di un sistema di

largo impiego in analisi biomedica, ovvero le nanoparticelle (NP) d'Oro, cercando inoltre di ricavare informazioni sulla loro dimensione e concentrazione.

Nel corso degli ultimi anni, grazie alle loro caratteristiche uniche, è cresciuta notevolmente la richiesta di nanoparticelle d'Oro per applicazioni in diversi settori, come ad esempio la ricerca scientifica e industriale [14] o l'ambito biomedicale [15]. Poichè la loro chimica superficiale ne consente il legame con ammine [16], le NP d'Oro possono essere usate come biosensori per rivelare specifiche molecole e proteine [17], potendo segnalare così danni a tessuti biologici o l'insorgere di possibili malattie (nanodiagnostica). Inoltre, le nanoparticelle possono fungere da vettori di farmaci all'interno delle cellule, poichè le loro piccole dimensioni consentono alle NP di superare la membrana cellulare: in questo modo è possibile attivare successivamente sotto sollecitazione esterna i farmaci trasportati entro cellule malate al fine di distruggerle efficacemente [18]. D'altro canto, recenti interessi di ricerca per nanoparticelle d'Oro derivano dal loro peculiare comportamento localizzato di risonanza plasmonica di superficie (SPR): in particolare, i campi elettromagnetici locali sulla superficie o nelle vicinanze di una NP possono essere utilizzati per spettroscopia SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) [19][20].

Rilevare dimensione e concentrazione di nanoparticelle in una soluzione desta tutt'oggi alcune problematiche. Tra i metodi più comuni attualmente in uso [21] si possono annoverare lo studio della densità ottica (OD) per nanoparticelle in soluzione, la diffrazione a raggi X a incidenza radente (GIXRD) e l'utilizzo del microscopio elettronico a scansione (SEM) o a trasmissione (TEM). L'analisi dello spettro OD per NP in soluzione consiste nell'ottenere la stima sul diametro e la densità delle NP adattando lo spettro misurato a funzioni teoriche (come ad esempio la sezione d'urto di Mie), le quali però spesso contengono delle limitazioni o sono utilizzate in forma approssimata per semplicità computazionale, non restituendo risultati precisi e corretti. In questo tipo di misura inoltre vi è sempre rischio di deposito delle NP sul fondo della soluzione o di un loro eventuale impacchettamento. Altre tecniche menzionate, come la GIXRD e l'uso del SEM o del TEM, prevedono invece l'utilizzo di un supporto su cui si fa aderire un sottile layer di soluzione contenente NP: è quindi molto frequente che le nanoparticelle incorrano in agglomerazione tra loro, portando a risultati diversi rispetto alla soluzione di partenza.

In questa tesi, si propone di superare tali problematiche mediante l'uso di un dispositivo opto-microfluidico in Niobato di Litio per rivelare nanoparticelle d'Oro in una goccia micrometrica, con una misura dinamica e in fluido finalizzata all'ottenimento di informazioni sulle loro dimensioni e concentrazione. Non bagnando mai le pareti idrofobiche del canale, la goccia microfluidica costituisce un ambiente chiuso ed isolato, grazie al quale si può prevenire il deposito delle NP e garantirne la non agglomerazione.

Scopo principale del mio lavoro di tesi è stata la comprensione di come nanoparticelle d'Oro confinate entro una goccia micrometrica interagiscono con un fascio luminoso, studiando il segnale ottico in trasmissione al variare del diametro e della densità delle NP all'interno delle gocce. Si sono quindi trovate relazioni quantitative in funzione del raggio e della densità delle NP in sospensione, che forniscono una base di partenza sperimentale per la calibrazione di questo tipo di rivelatore.

La presente tesi è organizzata nel modo seguente:

- **Capitolo 1: Il Niobato di Litio** (proprietà e caratteristiche del materiale che compone il campione)

- **Capitolo 2: Fabbricazione e caratterizzazione del campione** (descrizione e analisi sulla qualità del processo fabbricativo)
- **Capitolo 3: Produzione di gocce con nanoparticelle d'Oro** (stato dell'arte su microfluidica e nanofisica, apparato sperimentale)
- **Capitolo 4: Misure e Risultati sperimentali** (misure in flusso e in goccia)
- **Capitolo 5: Conclusioni**

Capitolo 1

Il Niobato di Litio

Il Niobato di Litio (LiNbO_3) è un materiale sintetico non reperibile in natura, descritto per la prima volta da Zachariasen nel 1928 [6] e poi studiato negli anni sessanta da Nassau e Abrahams ai Laboratori Bell [22]. Per le sue particolari proprietà fisiche, tra cui ad esempio la birifrangenza, l'effetto elettro-ottico e la piezoelettricità [9], il Niobato di Litio costituisce un materiale principe per l'ottica integrata e per la generazione di onde acustiche di superficie (SAW), presentando eccellenti caratteristiche per la produzione di guide di luce, di celle Pockels, di trasduttori di onde acustiche e di altri tipi di circuiti ottici integrati e dispositivi acusto-ottici, determinandone un ampio utilizzo nel campo dell'industria delle telecomunicazioni [23][24][25].

1.1 Composizione e cristallografia

Il Niobato di Litio appartiene al sistema pseudo-binario $\text{LiO}_2\text{-NbO}_5$ insieme ad altri tre composti ($\text{Li}_2\text{Nb}_{28}\text{O}_{71}$, Li_3NbO_4 e LiNb_3O_8). Usualmente un cristallo di Niobato di Litio viene cresciuto mediante tecnica Czochralski con concentrazione differente di Li_2O rispetto a quella stechiometrica (50% LiO_2 , 50% NbO_5): quella più comunemente utilizzata è la composizione congruente (48,45% LiO_2 , 51,5% NbO_5), che corrisponde al punto di massimo per la curva liquido-solido come si mostra nel diagramma di fase di figura 1.1.

La composizione del Niobato di Litio, dettata dal rapporto Li:Nb , influenza notevolmente le proprietà fisiche e ottiche del cristallo, quali ad esempio la temperatura di transizione di fase e la birifrangenza [27]. Un cristallo cresciuto con composizione congruente ha massima uniformità nelle sue proprietà fisiche, in quanto il fuso e il cristallo sono identici in composizione durante il processo di crescita. Ciò costituisce il motivo per cui il rapporto Li:Nb 48.5:51.5 è preferito rispetto al caso stechiometrico, che presenta composizioni del fuso e del cristallo leggermente differenti durante la crescita, determinando non uniformità nelle proprietà soprattutto lungo l'asse di crescita [6].

Nella sua fase solida, il Niobato di Litio ha una struttura cristallina dipendente dalla temperatura: a temperatura ambiente il cristallo presenta una simmetria di riflessione speculare rispetto a tre piani formanti tra loro angoli di 60° , con l'intersezione di questi tre piani che identifica l'asse di una simmetria rotazionale per angoli di 120° . L'insieme di queste simmetrie classifica il Niobato di Litio nel gruppo spaziale $R3c$ [9].

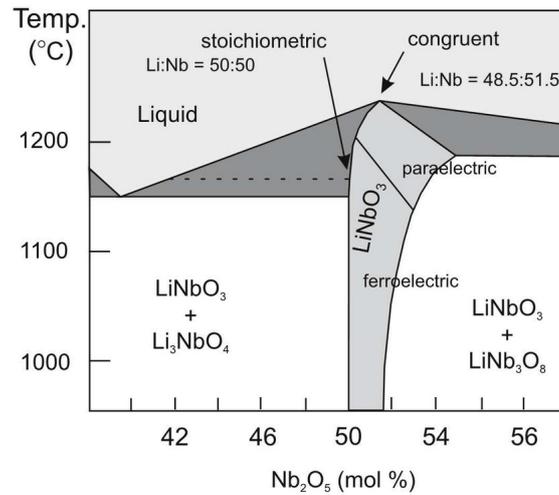


Figura 1.1: Diagramma di fase del sistema pseudo-binario $\text{LiO}_2\text{-NbO}_5$ [26].

Poichè nel sistema trigonale la scelta degli assi non è univoca, è possibile considerare tre tipi diversi di cella convenzionale (esagonale, romboedrica e ortoesagonale), ma la cella ortoesagonale è la scelta più funzionale allo studio con il formalismo tensoriale delle proprietà fisiche di questo materiale [6]. Descrivendo quindi la struttura cristallina con una cella ortoesagonale, si considera un sistema di riferimento (figura 1.2) con i seguenti tre assi ortogonali fra loro:

- asse z (detto asse ottico), che è l'asse di simmetria rotazionale,
- asse y, appartenente al piano dello specchio,
- asse x, perpendicolare ai precedenti.

Per convenzione, poichè la piezoelettricità del Niobato si manifesta lungo gli assi z e y, si fissa il segno positivo di questi assi nel verso in cui sotto compressione parallela all'asse si accumula carica negativa.

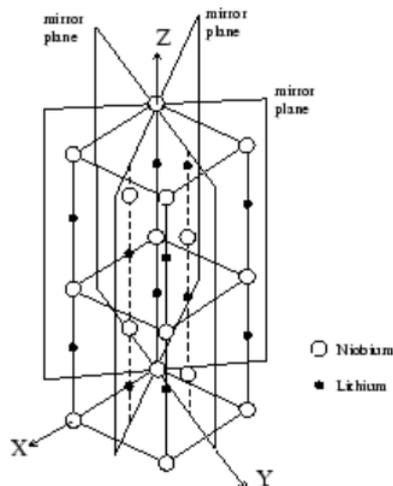


Figura 1.2: Sistema di riferimento ortoesagonale: la cella è identificata da lati paralleli agli assi x, y, z.

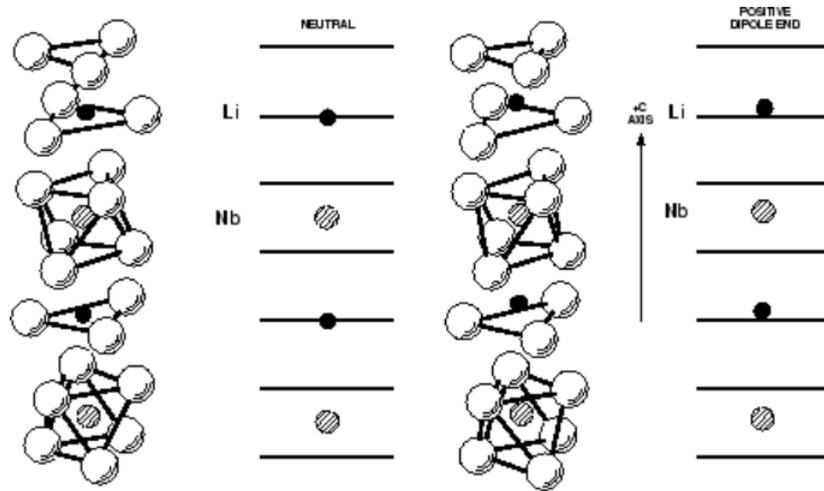


Figura 1.3: Struttura del Niobato di Litio con le posizioni degli atomi di ossigeno, litio e niobio nelle fasi paraelettrica (sinistra) e ferroelettrica (destra).

La struttura cristallina del Niobato di Litio (figura 1.3) consiste in piani paralleli ed equidistanti di atomi di ossigeno disposti tra di loro in una configurazione esagonale ad impacchettamento stretto leggermente distorta. Gli ottaedri costituiti dagli ossigeni presentano interstizi che sono riempiti per un terzo da atomi di litio, per un terzo da atomi di niobio e per un terzo risultano vuoti, seguendo una sequenza Li-Nb-vacanza che individua l'asse ottico z .

La dipendenza della struttura cristallina dalla temperatura è legata ad una transizione da fase ferroelettrica a paraelettrica per temperature superiori a quella di Curie $T_C = 1142.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$ (composizione congruente). La ferroelettricità consiste in una spontanea polarizzazione del cristallo ed è dovuta allo spostamento lungo l'asse z della posizione degli atomi di Li e Nb rispetto alla fase paraelettrica. Al di sopra di T_C (fase paraelettrica), gli ioni di Litio che riempiono un interstizio di un ottaedro giacciono sullo stesso piano degli atomi di ossigeno, mentre gli ioni di Niobio si trovano al centro degli ottaedri. Nella fase ferroelettrica per $T < T_C$, invece, gli ioni Li sono spostati di 44 pm e gli ioni Nb di 27 pm lungo z rispetto alle posizioni di simmetria della fase paraelettrica, portando ad una polarizzazione spontanea del cristallo [9].

1.2 Difetti e drogaggio

Le proprietà fisiche del Niobato di Litio possono essere modificate considerevolmente mediante drogaggio, sfruttando le vacanze e i difetti strutturali presenti nel cristallo. In particolare, il Niobato di Litio con composizione congruente presenta un deficit di Litio pari a circa il 6% rispetto al caso stechiometrico [6]. Per garantire la compensazione di carica quindi si rendono necessarie delle modifiche alla sua struttura con difetti puntuali intrinseci, per i quali sono stati proposti alcuni modelli che prevedono la compensazione dell'ammanto di litio con:

- vacanze di ossigeni,

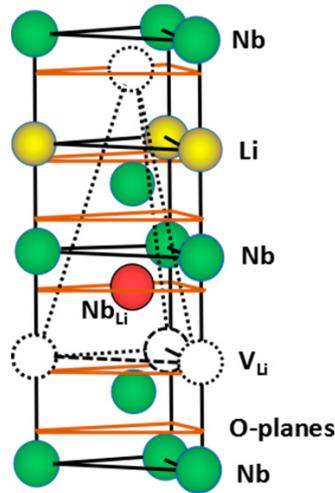


Figura 1.4: Compensazione del deficit di Li in composizione congruente con niobi di antisito Nb_{Li} .

- atomi di Nb nelle vacanze di Li detti niobi di antisito (Nb_{Li}),
- presenza sia di vacanze di Nb che di niobi di antisito.

La questione di quale modello sia quello prevalente è ancora aperta, anche se misure di densità sembrano confermare l'ipotesi dei niobi di antisito [28][29]. Secondo questo modello, come si può vedere in figura 1.4, all'interno del cristallo vi sono difetti di antisito Nb_{Li} circondati da quattro vacanze di litio ciascuno [30]. L'importanza di questi niobi di antisito deriva dal fatto che essi introducono livelli di donori e accettori nella bandgap del cristallo, consentendo l'effetto fotovoltaico e l'effetto fotorifrattivo anche in assenza di impurezze estrinseche [31].

Il drogaggio con difetti estrinseci, d'altro canto, consente di modificare le proprietà del cristallo adattandole alle esigenze d'uso: grazie all'elevato numero di vacanze, il drogaggio del Niobato di Litio risulta infatti piuttosto facile. Le impurezze droganti si possono aggiungere sia durante la crescita che dopo la solidificazione mediante diffusione termica o impianto ionico. Tra i possibili utilizzi del drogaggio estrinseco si annoverano il drogaggio con Titanio per la realizzazione di guide d'onda ottiche [10] e il drogaggio con Fe, Mg, Zr o Zn per migliorare o ridurre l'effetto fotorifrattivo [32].

1.3 Proprietà fisiche

Sono numerose le proprietà fisiche che caratterizzano il Niobato di Litio [9]. Tra queste si annoverano:

- la birifrangenza, che determina un differente indice di rifrazione per polarizzazioni diverse,
- la piezoelettricità, ovvero l'induzione di polarizzazione applicando una pressione,
- l'effetto elettro-ottico, che consiste nella variazione di indice di rifrazione per l'applicazione di un campo elettrico,

- la fotorifrattività, cioè il cambio di indice di rifrazione con un'intensità luminosa incidente,
- la piroelettricità, ovvero la variazione della polarizzazione spontanea con la temperatura,
- l'effetto fotovoltaico, con la produzione di una corrente dovuta all'esposizione alla luce.

Nel seguito si descrivono in maggior dettaglio solo le proprietà ottiche del cristallo, in particolare la birifrangenza. Nel presente lavoro di tesi le altre proprietà non sono state utilizzate.

1.3.1 Proprietà ottiche

Il Niobato di Litio è un materiale trasparente con coefficiente di assorbimento trascurabile da $0.35 \mu m$ a circa $3.5 \mu m$ [31]. La sua caratteristica birifrangenza è causata dall'anisotropia del tensore di permittività, rappresentabile nel sistema di riferimento ortoesagonale come una matrice 3×3 :

$$\bar{\bar{\epsilon}} = \begin{bmatrix} \epsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \epsilon_{11} & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon_{33} \end{bmatrix}$$

Individuato l'asse ottico z , si definisce indice di rifrazione ordinario per una polarizzazione del campo parallela al piano xy (propagazione lungo z) la quantità:

$$n_o = \sqrt{\frac{\epsilon_{11}}{\epsilon_0}} \quad (1.1)$$

indicando con ϵ_0 la permittività del vuoto. L'indice di rifrazione straordinario, invece, si ha per una polarizzazione parallela all'asse ottico z , con propagazione dell'onda nel piano xy , e si definisce come:

$$n_e = \sqrt{\frac{\epsilon_{33}}{\epsilon_0}} \quad (1.2)$$

Gli indici di rifrazione dipendono entrambi dalla composizione e dalla lunghezza d'onda λ e sono descritti in buona approssimazione dall'equazione generalizzata di Sellmeier [33]:

$$n_i = \frac{A_{0,i} + A_{1,i}(50 - C_{Li})}{\lambda_{0,i}^{-2} - \lambda^{-2}} + A_{UV,i} - A_{IR,i}\lambda^2 \quad (1.3)$$

con $i = \{o, e\}$ e i termini A e λ_0 costanti, valida per $\lambda = 400 \div 3000$ nm, composizione di Li $C_{Li} = 47 \div 50$ mol% e con un'accuratezza del 0.002 su n_i [6].

Capitolo 2

Fabbricazione e Caratterizzazione del campione

Il campione è un dispositivo opto-microfluidico in Niobato di Litio che integra completamente sullo stesso substrato uno stadio microfluidico, costituito da due canali microfluidici disposti a croce, e uno stadio ottico, rappresentato da un array di guide di luce. Tali guide di luce sono parallele tra loro e poste in prossimità della superficie (con profondità di qualche μm), perpendicolarmente al canale microfluidico più lungo in modo da esserne interrotte a metà. Come parte del lavoro di questa tesi, si è realizzato un array di guide di luce su di un substrato di $LiNbO_3$, studiandone la qualità di fabbricazione, e si sono caratterizzati in profondità e larghezza i canali microfluidici presenti sul campione in uso.

2.1 Fabbricazione del campione

Al fine di ottenere il dispositivo opto-microfluidico in oggetto (in foto in figura 2.1), si è studiato in lavori precedenti svolti nel gruppo di Padova [6][34][8] il processo fabbricativo, ottimizzando i vari parametri in gioco con particolare attenzione alla riproducibilità dei singoli passaggi. Questi risultano essere in successione:

- realizzazione di un array parallelo di guide di luce,
- creazione di una giunzione a croce di canali microfluidici,

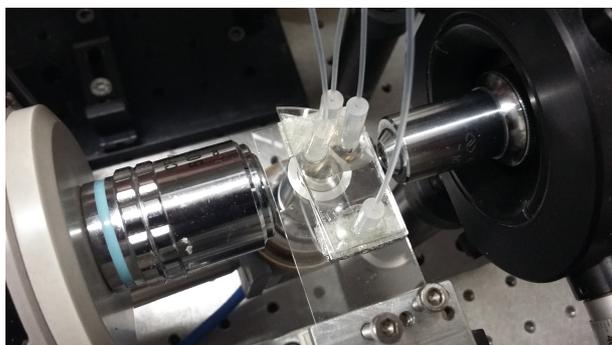


Figura 2.1: Un'immagine del campione allocato nell'apparato di misura

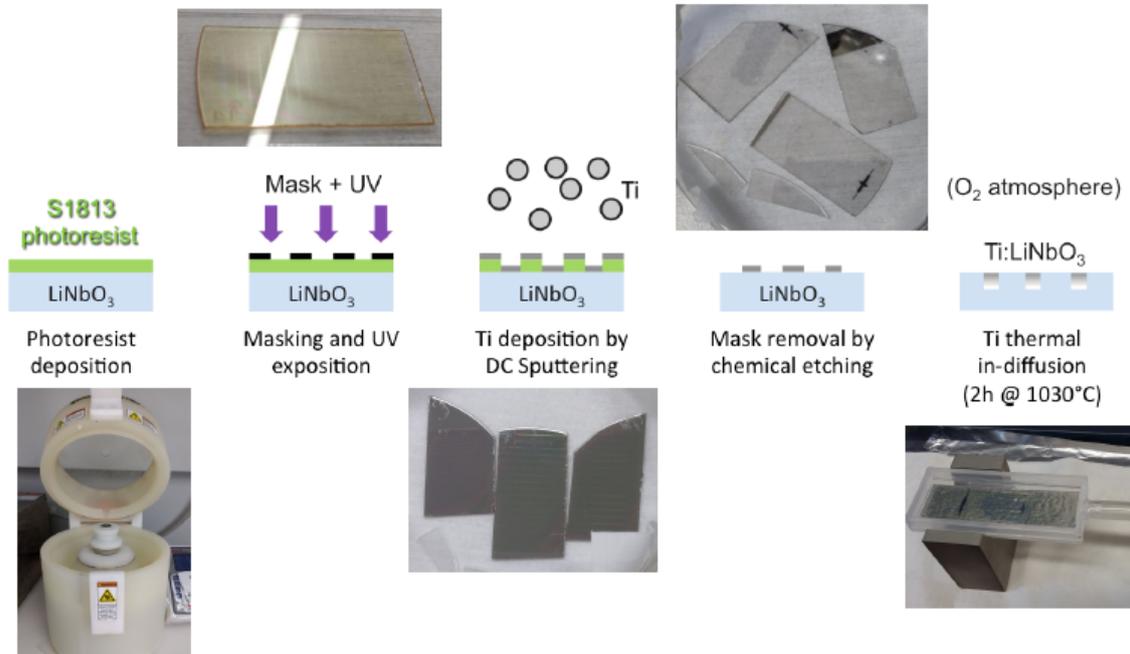


Figura 2.2: Schema riepilogativo della fabbricazione delle guide di luce con delle fotografie del campione nei vari passaggi.

- chiusura con vetro del campione,
- funzionalizzazione del canale per renderne le pareti idrofobiche.

2.1.1 Realizzazione delle guide d'onda

Le guide d'onda del campione in uso sono state realizzate sul substrato di LiNbO_3 per mezzo di un processo riproducibile di cui è riportato uno schema in figura 2.2. Esso consiste in:

- fotolitografia (deposizione di photoresist, copertura con maschera e irraggiamento UV),
- sputtering in Titanio,
- rimozione chimica delle porzioni di Titanio con al di sotto photoresist (Lift-off),
- diffusione termica del Titanio (2 ore a 1030°C in atmosfera O_2).

Di seguito la descrizione nei dettagli di ogni step.

Preparazione del campione

I campioni su cui si realizzano le guide d'onda sono ottenuti a partire da un wafer commerciale di Niobato di Litio congruente (Crystal Technology) tagliato ortogonalmente all'asse cristallografico x con spessore 1 mm e lucidato su entrambi i lati. Il wafer acquistato viene tagliato mediante una macchina da taglio South Bay 540 dotata di una lama in

lega di rame diamantata. Un goniometro graduato permette di allineare il campione con precisione per effettuare i tagli lungo gli assi cristallografici. I campioni così ottenuti, una volta puliti con etanolo, vengono catalogati opportunamente segnando la loro orientazione cristallografica (il verso dell'asse ottico z) sulla faccia x - del campione.

Fotolitografia

Per garantire un'elevata pulizia delle superfici e un basso livello di polveri, il processo di fotolitografia viene svolto interamente in una clean-room di classe ISO 7, finanziata dal progetto MISCHA (Microfluidics laboratory for scientific and technological applications).

Dopo aver pulito inizialmente i campioni con acetone ed etanolo, essi vengono posti in ambiente di medio vuoto ($P \sim 0.6$ mbar, raggiunta con una pompa rotativa), in cui si rientra parzialmente con ossigeno. Con una scarica si innesca quindi un plasma per pulire ulteriormente la superficie, sfruttando l'interazione degli ioni con i residui presenti [35].

Conclusa la fase di pulizia, si procede al deposito del primer e successivamente del photoresist. Il primer è una sostanza (Esametildisilazano, HMDS) che ha lo scopo di favorire l'adesione del photoresist agli ossidi del Niobato di Litio, liberando legami e permettendo che il photoresist interagisca con essi. Il photoresist scelto è S1813 della serie Microposit S1800 G2, positivo e compatibile con lo spettro di emissione della lampada UV in dotazione. Per distribuirli in modo uniforme ed omogeneo, sia il primer che il photoresist sono depositati sul campione usando uno *spin coater* (figura 2.3(a)), ove il campione viene allocato e fatto girare subito dopo il deposito di ciascuno dei due. Per il primer si utilizza una velocità di 2000 rpm per 30 secondi, mentre per il photoresist di 6000 rpm per 30 secondi. Tali parametri sono stati precedentemente ottimizzati per ottenere lo spessore di photoresist necessario ad avere la migliore trasmissione possibile nelle guide di luce. Rispetto ad altri photoresist della stessa serie ma più diluiti, quale ad esempio S1805, S1813 unisce una buona precisione ad una maggiore facilità di riuscita nella realizzazione di piccole strutture ($\sim \mu m$), con una risoluzione nominale di $0.48 \mu m$ [6][34].

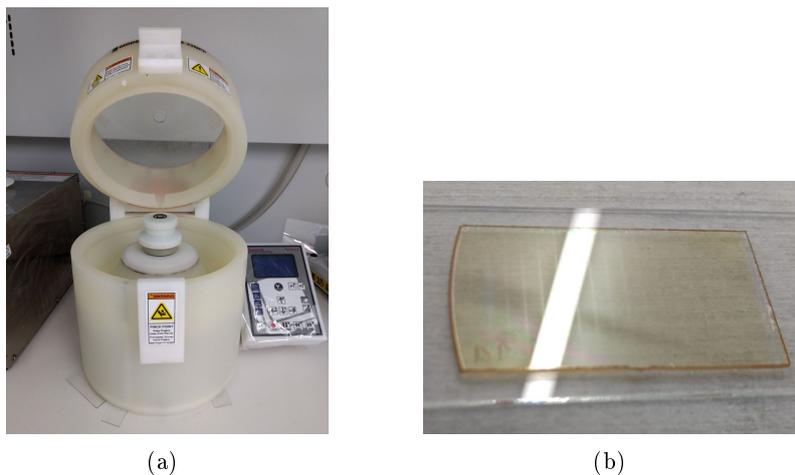


Figura 2.3: In figura (a) un'immagine dello *spin coater*: il campione è posto sul supporto centrale e, dopo il deposito del primer, viene fatto girare alla velocità richiesta. Si effettua lo stesso per il photoresist. In figura (b) il campione con il photoresist dopo l'irraggiamento UV: sono visibili in riflessione le strisce di photoresist rimosse

Il campione dopo la deposizione del photoresist viene quindi coperto in contatto diretto con una maschera di cromo su quarzo con strisce della larghezza nominale di $3 \mu\text{m}$ ed esposto alla lampada UV altamente collimata in dotazione con una potenza di $6300 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ per 13 secondi. La maschera è posizionata in modo tale che le strisce siano parallele all'asse cristallografico z del Niobato di Litio. Successivamente il campione viene soggetto a sviluppo immergendolo per 60 secondi in un solvente basico (Microposit MF-300) che reagisce con il photoresist illuminato e deteriorato rimuovendolo. Infine si sciacqua il campione in acqua distillata per 30 secondi. La qualità delle strisce di photoresist rimosse viene osservata con un microscopio a trasmissione e indagata con un profilometro a contatto (paragrafo 2.2.1).

Sputtering in Titanio

Il Titanio è depositato sulla faccia x+ del campione con *magneto-sputtering*. A tal fine si mette il campione in una camera da vuoto alla pressione di $\sim 1.6 \cdot 10^{-6}$ mbar, raggiunta con una pompa rotativa (medio vuoto) e una turbomolecolare (alto vuoto). Un plasma di Argon (accelerato con una differenza di potenziale di ~ 300 V) deteriora un target in Titanio per ottenere il rilascio di atomi neutri di Ti con cui fare la deposizione. Inizialmente, per la durata 5 minuti, il target viene coperto da uno schermo per permettere al plasma di rimuovere dalla superficie l'ossido di Titanio presente. Dopo questa fase, si scopre il target e per 22 minuti si ha sputtering in Titanio sul campione. Campi magnetici nei pressi del target confinano gli elettroni secondari prodotti nelle collisioni plasma-target, permettendo un maggiore rate di sputtering. La posizione del campione nella camera è frontale al target, con la superficie da ricoprire perpendicolare alle traiettorie degli atomi di Ti. Alla fine del processo il layer di Titanio sul campione risulta pari a circa 40 nm.

Lift-off

Il Lift-off è una tecnica di etching chimico con cui si rimuovono le strisce di Titanio che presentano al di sotto photoresist non illuminato. Il campione è immerso alla temperatura di 60°C in un bagno di un solvente positivo al photoresist, SVC(TM)-14, che penetrando all'interno della superficie genera il distacco dopo alcune ore delle porzioni da rimuovere. Può essere necessaria anche la sonificazione per qualche secondo per accelerare il processo.

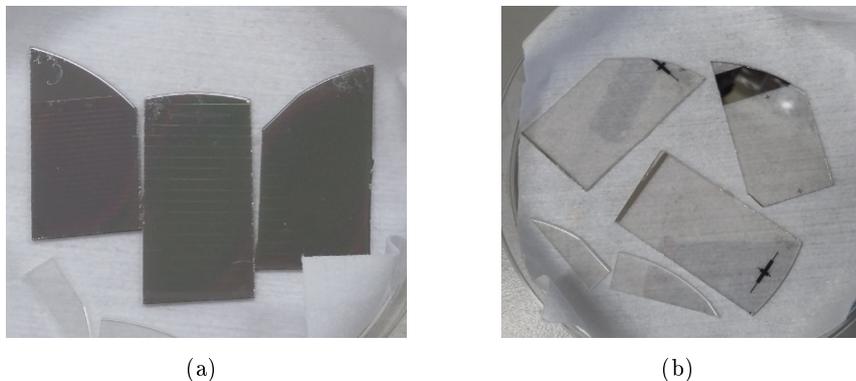


Figura 2.4: I campioni dopo lo sputtering (a) e dopo il Lift-Off (b)

Trattamento termico (annealing)

La diffusione termica delle strisce di Titanio rimaste dopo il Lift-off all'interno del Niobato di Litio avviene in un forno tubolare Hochtperaturofen GmbH (modello F-VS 100-500/13, Gero). Una barra di quarzo permette di collocare il campione al centro del forno: tra il quarzo e il campione c'è un foglio di platino per prevenire contaminazioni (figura 2.6). Allocatedo il campione, si riscalda il forno alla velocità di $300^{\circ}\text{C}/\text{h}$, quindi per 2 ore si mantiene la temperatura di 1030°C . Il raffreddamento successivo ha una velocità di $-400^{\circ}\text{C}/\text{h}$. Le velocità di raffreddamento e riscaldamento sono state scelte per evitare stress termici dei cristalli. Il processo di annealing si svolge in atmosfera di ossigeno, flussato nella camera del forno a $50\text{ Nl}/\text{h}$, per favorire la diffusione del Titanio, grazie alla sua ossidazione, all'interno del Niobato di Litio [10].

Il processo di diffusione, che segue la ben nota legge di Fick, genera una volta che tutto il film è completamente diffuso un profilo gaussiano della concentrazione di Titanio all'interno del campione in direzione ortogonale alla superficie, come riportato in figura 2.5 e in [6]. Si ottengono così delle guide di luce ad indice di rifrazione graduato, con modulazione data dalla concentrazione di Titanio. Ne risulta che la forma delle guide, viste in direzione frontale alla propagazione (asse z cristallografico), è tipicamente quella di un ellissoide schiacciato verso la superficie del campione (figure 2.21 al paragrafo 2.2.3).

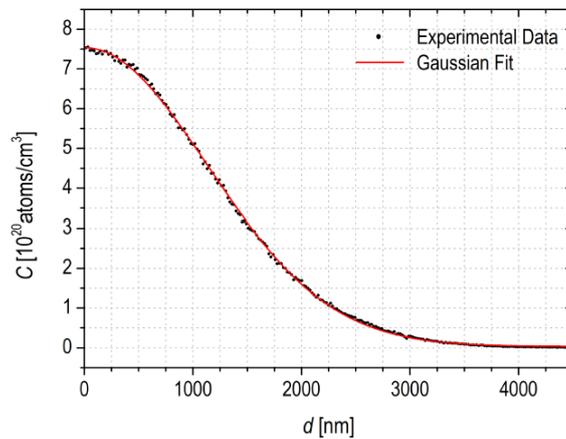


Figura 2.5: Profilo misurato in [6] con tecnica SIMS della concentrazione di Titanio in un campione di LiNbO_3 dopo la diffusione termica di un film di 37 ± 1 nm a $T=1030^{\circ}\text{C}$ per 2 ore.

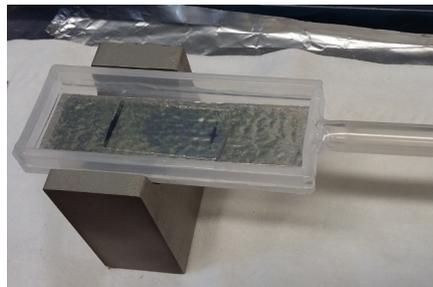


Figura 2.6: Un'immagine del campione subito dopo il trattamento termico, nella barra di quarzo con sotto il foglio di Platino.

Lapping e Polishing

Per ottenere superfici laterali con rugosità compatibili con quelle richieste per uno stadio ottico (quale una guida di luce), occorre lucidare lateralmente i campioni mediante *lapping* e *polishing*. Il *lapping* è un processo di abrasione teso ad ottenere una rugosità controllata: in esso si utilizzano particelle con grana grossa ($\sim 1-10 \mu\text{m}$) che per strofinamento 'rovinano' la superficie modificandone così la rugosità. Anche il *polishing* funziona nello stesso modo, ma deve essere effettuato successivamente al *lapping*: in questo caso le particelle hanno dimensioni nanometriche allo scopo di diminuire la rugosità, ottenendo valori tipici di superfici ottiche (inferiori a 1/10 della lunghezza d'onda).

Più in dettaglio, per la lappatura si mette a contatto la superficie laterale da sottoporre al trattamento con un disco rotante (velocità di rotazione 40 rpm), mediante un apposito supporto che fa scendere il campione per gravità. Il disco viene quindi bagnato con una soluzione acquosa contenente particelle di alumina di dimensioni $9 \mu\text{m}$ e in seguito $3 \mu\text{m}$. Si procede poi in modo analogo con il *polishing*, usando in questo caso particelle nanometriche fino ad ottenere una superficie completamente trasparente.

2.1.2 Realizzazione dei canali microfluidici

I canali microfluidici sono stati realizzati sulla superficie del substrato di LiNbO_3 successivamente alla fabbricazione delle guide di luce: tali canali sono disposti tra di loro a croce, con quello più lungo ottenuto in modo da interrompere le guide di luce a metà.

A tal fine il campione è stato sottoposto ad un processo di microlavorazione meccanica svolto in collaborazione con l'Università francese di France-Comté a Besançon. Qui è stata utilizzata una sega di precisione DISCO DAD 321 con lama polimerica rivestita con particelle di diamante (diametro della lama di 56 mm e spessore nominale di $200 \mu\text{m}$) a una velocità di rotazione di 10^4 rpm e con una velocità di taglio di 0.2 mm/s (parametri precedentemente ottimizzati per avere rugosità minima sulle superfici laterali). Si è utilizzato un costante flusso di acqua durante la lavorazione per evitare il riscaldamento del campione e della lama, oltre che per eliminare i residui cristallini.

I canali ottenuti con questa tecnica sono stati già studiati precedentemente [6][8] per verificare che il livello di rugosità sulle pareti verticali del canale fosse adatto ad ospitare uno stadio ottico quale un array di guide di luce: una superficie laterale scabra infatti non permetterebbe un buon accoppiamento canale-guide di luce. A questo scopo, si è analizzata con un microscopio a forza atomica Veeco CP-II la rugosità delle superfici laterale e inferiore del canale, rese raggiungibili dalla punta del microscopio sottoponendo a polishing il campione fino alla cancellazione di una delle due pareti laterali del campione. Si è quindi ricavata la rugosità media di ciascuna superficie come valore medio di quelli ottenuti su una serie di più di cinque aree $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ campionate. I risultati sono riportati in tabella 2.1 e in figura 2.7.

Tabella 2.1: Rugosità media delle superfici laterale e inferiore del canale

Parete	Rugosità media (nm)
Inferiore	$23 \pm 7 \text{ nm}$
Laterale	$8.5 \pm 0.9 \text{ nm}$

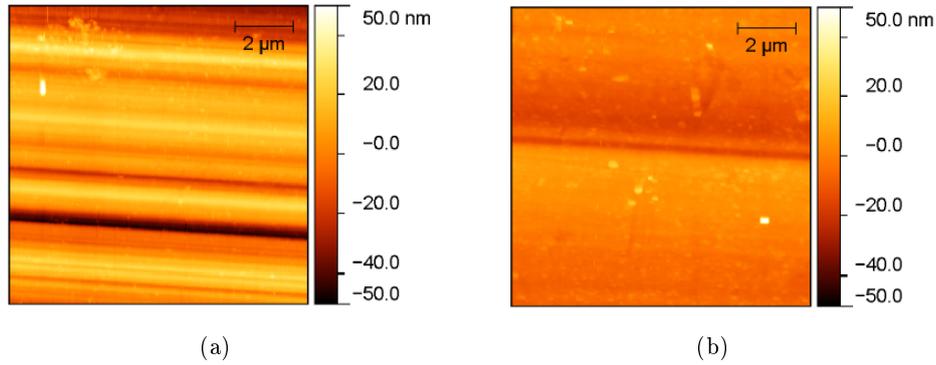


Figura 2.7: Immagini AFM $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ della superficie inferiore a) e laterale b) del canale studiato in [8]

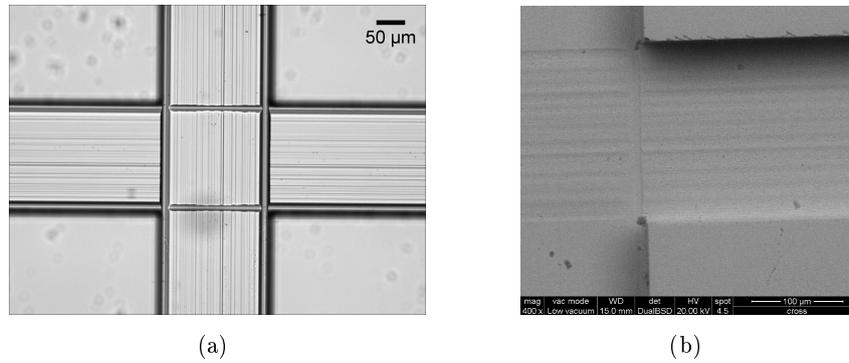


Figura 2.8: Micrografie con il microscopio ottico (a) e lo Scanning Electron Microscope (SEM) (b) della superficie inferiore dei canali microfluidici

La superficie inferiore, come ben visibile nell'analisi AFM di figura 2.7(a) e nelle micrografie di figura 2.8, presenta parallelamente alla lunghezza del canale un pattern di striature prodotte nel processo di lavorazione da parte della lama. Tali striature presentano larghezza e profondità quantificabili in qualche centinaio di nm e costituiscono una rugosità "macroscopica" ben maggiore dei valori riportati in tabella 2.1, afferenti alla rugosità media locale. Tuttavia queste strutture non sono importanti ai fini dell'accoppiamento guide-canale e della produzione di gocce microfluidiche per due motivi:

- tra la goccia e la parete inferiore del canale c'è sempre un film sottile costituito dalla fase continua dell'ordine di alcune centinaia di nm tale da eliminare l'impatto di tali strutture sulla forma delle gocce,
- per l'accoppiamento guida-canale ciò che conta è la rugosità delle pareti laterali, le quali non sono affette da tali striature (figura 2.7(b)), ma al contrario risultano ulteriormente levigate proprio dallo strofinamento che la lama esercita contro la loro superficie nel processo di scavo.

La rugosità estremamente ridotta delle pareti laterali permette quindi un efficace accoppiamento guide di luce-canale per le applicazioni opto-microfluidiche in studio in questa tesi.

2.1.3 Chiusura su vetro

Realizzate le guide di luce e i canali microfluidici, occorre chiudere il dispositivo con un coperchio (in questo caso di vetro) sovrastante la giunzione a croce, ottenendo così un chip solido e compatto. Innanzitutto si taglia il coperchio con la macchina da taglio in dotazione (South Bay 540) in modo che abbia le stesse dimensioni del campione. Sul coperchio in vetro si scavano quindi con una sabbiatrice quattro buchi in corrispondenza delle quattro estremità della croce composta dai canali, che costituiscono gli ingressi e le uscite della giunzione microfluidica. Dopo un'opportuna pulizia di entrambi, si realizza un sandwich del campione con sopra il coperchio racchiuso tra due vetrini e bloccato per mezzo di due morsetti ai lati. Tenendo quindi il tutto in pressione, con una siringa si inietta sull'intercapedine laterale tra il campione e il coperchio una colla polimerica liquida, Norland Optical Adhesive 68 (NOA68, Norland Products Incorporation), che solidifica in seguito a irraggiamento UV. Il NOA diffonde nell'arco di circa 24 ore per capillarità su tutta l'interfaccia campione-coperchio, fermandosi a causa della tensione superficiale una volta raggiunti i bordi dei canali. Ciò accade poiché il layer di NOA ha dimensioni dell'ordine di qualche μm , nettamente inferiori a quelle dei canali microfluidici ($\sim 100 \mu m$). Un'analoga modalità di chiusura si può trovare in [36], ove si determina anche lo spessore dello strato di colla. Esponendo poi il campione a raggi UV, si solidifica la colla e si ottiene il chip compatto.

2.1.4 Funzionalizzazione

La formazione di gocce (paragrafo 3.1) avviene utilizzando come fase dispersa e continua liquidi immiscibili tra di loro, quali ad esempio olio (fase continua) e acqua (fase dispersa). La funzionalizzazione del campione, in questo caso, è un processo teso a rendere idrofobiche le superfici delle pareti dei canali microfluidici, sia per i tre lati in Niobato di Litio che per il lato costituito dal coperchio in vetro. In particolare, il Niobato di Litio senza trattamento presenta un angolo di contatto con acqua pari a $(62 \pm 1)^\circ$ [6]. Nella microfluidica a gocce infatti è necessario che, a differenza della fase continua, la fase dispersa non bagni mai le pareti del canale, in modo tale che tra quest'ultime e la goccia ci sia sempre un sottile film di fase continua. La creazione delle gocce risulta così più controllabile, dipendendo principalmente dall'interazione tra le due fasi [37][6]. Inoltre, ciò è legato anche alle possibili applicazioni del dispositivo, ad esempio in ambito biologico, per preservare il contenuto della goccia dall'interazione con i materiali presenti sulle superfici del campione [38][4].

La funzionalizzazione si ottiene quindi flussando per 15 minuti nel canale una soluzione 5 mM/L di OTS (=Octadeciltriclorosilano) in Toluene mediante una pompa a siringa con un flusso di 20 μL /min. L'OTS è una molecola composta da una lunga catena carboniosa idrofobica e da una testa polare costituita dal gruppo $-SiCl_3$, la quale si lega agli ossigeni del Niobato di Litio formando legami Si-O (il Cloro invece si separa e va in soluzione come HCl) [39]. Viene a formarsi in questo modo uno strato monolayer (self-assembled monolayer) sulle superfici delle pareti del canale tale da renderle idrofobiche [40]. Analogamente la funzionalizzazione con OTS rende idrofobica anche la parete del coperchio di vetro [41]. Per sciacquare il canale dai residui di OTS rimasti si flussa sempre a 20 μL /min del Toluene puro per altri 15 minuti, per poi scaldare il campione a $65^\circ C$ per altri 30 minuti allo scopo di far evaporare tutto il Toluene rimasto. Al termine di questo processo, la

misura dell'angolo di contatto acqua-niobato, per cui si rimanda a lavori precedenti [6], risulta essere $(100 \pm 1)^\circ$. In figura 2.9 si mostra un confronto della produzione di gocce nel canale microfluidico prima e dopo la funzionalizzazione: solo dopo la funzionalizzazione si riescono a produrre gocce.

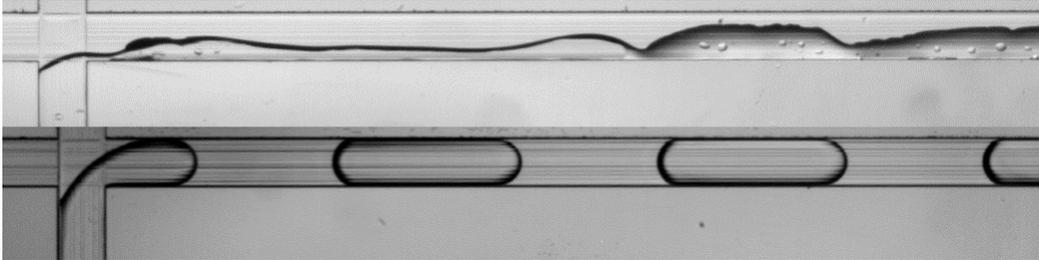


Figura 2.9: La produzione di gocce nel canale microfluidico prima e dopo la funzionalizzazione: le gocce sono ottenute solo con canale funzionalizzato.

2.2 Caratterizzazione del processo fabbricativo

La caratterizzazione del processo fabbricativo del dispositivo ha come obiettivo l'analisi della sua qualità nella realizzazione sia delle guide di luce che dei canali microfluidici.

Per le guide di luce lo studio si compie in due momenti diversi:

- subito dopo la fotolitografia, si verifica la precisione nella rimozione del photoresist e nella fabbricazione di un array di strisce di photoresist rimosse,
- una volta ultimate le guide di luce, si osserva la loro trasmissione con misure di Near-Field, variando il fluido in flusso nel canale che interrompe a metà la guida stessa.

La caratterizzazione invece dei canali microfluidici in questa tesi si limita alla verifica sia in larghezza che in profondità dell'uniformità della giunzione a croce prodotta. Per ulteriori studi si rimanda ai lavori precedenti [6][8] richiamati nella sezione 2.1.2.

2.2.1 Strisce di photoresist rimosse

Per quantificare la precisione con cui si è prodotto un array di strisce di photoresist rimosse, si sono effettuate misure ripetute in larghezza per ciascuna striscia con un profilometro a contatto KLA-Tencor P-10 Surface Profiler. Una volta posto il campione nell'alloggiamento per le misure, il profilometro acquisisce un determinato profilo di superficie, muovendo a contatto diretto con il campione la sua punta (figura 2.10(a)) lungo una direzione per una lunghezza fissata dallo sperimentatore. La scansione dell'intervallo selezionato è ottenuta dallo spostamento verticale della punta stessa. L'acquisizione presenta inoltre un sistema di coordinate cartesiane (x,y) per controllare l'orientazione del campione e la posizione della misura su di esso.

Il campione che si è studiato presentava 21 strisce: per tutte si è presa una misura della larghezza al centro, mentre per 13 di esse (1-4, 8-12, 18-21) altre 4 misure ciascuna, a distanze regolari di 4 mm e a parità di y nel sistema di riferimento del profilometro. In

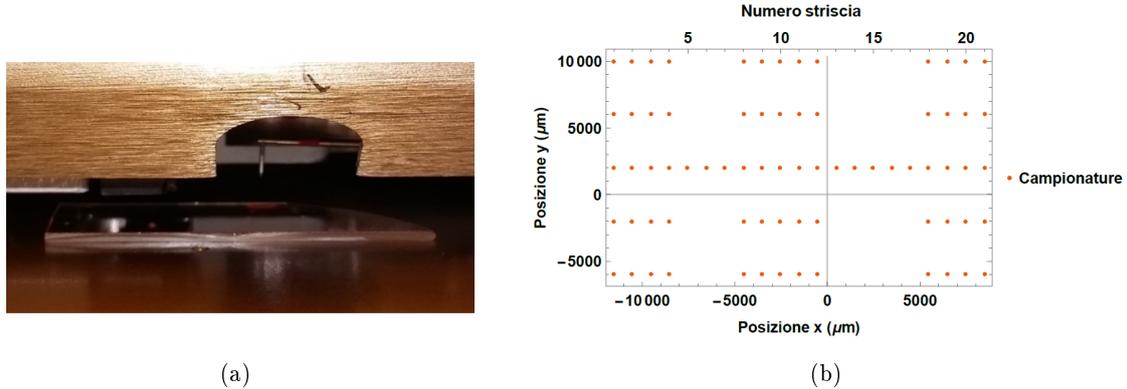


Figura 2.10: Immagine in (a) del profilometro a contatto KLA-Tencor P-10 Surface Profiler. In (b) le posizioni sul campione delle misure prese con profilometro, riferite alle coordinate (x,y) del sistema di acquisizione.

figura 2.10(b) si riportano le posizioni sul campione delle misure effettuate, espresse nelle coordinate (x,y) del sistema di acquisizione.

Le posizioni y sono state scelte in modo da verificare l'uniformità in larghezza della striscia lungo tutta la sua estensione, pari a quella del lato corto del campione (~ 2 cm). Per l'irraggiamento UV del campione si era usata una maschera di cromo su quarzo con strisce di larghezza nominale pari a $3 \mu m$: l'analisi seguente è finalizzata a verificare la precisione e la riproducibilità in larghezza delle strisce, valutandone il grado sia a livello complessivo che locale.

Inizialmente, si svolge una valutazione considerando tutte le acquisizioni indipendentemente dalle loro posizioni: in figura 2.11 se ne mostra un istogramma, mentre la media (\bar{x}), con errore della media associato, e l'errore quadratico medio (σ) di tutte le misure risultano essere:

$$\bar{x} = 2.93 \pm 0.04 \mu m$$

$$\sigma = 0.3 \mu m$$

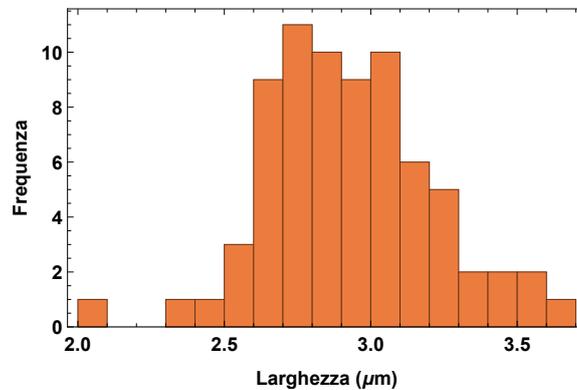


Figura 2.11: Istogramma di tutte le misure prese in tutte le posizioni

La distribuzione di figura 2.11 è gaussiana rispetto al valore medio, evidenziando a livello globale un risultato coerente con il valore nominale della maschera UV entro la dispersione delle misure, data da $\sigma=0.3 \mu m$.

L'analisi locale del grado di precisione cerca invece di evidenziare regioni maggiormente critiche per la deposizione e la rimozione del photoresist. Per fare ciò, si procede considerando tutte le misure prese a parità di striscia, come nel grafico a dispersione in figura 2.12(a), e tutte le misure prese a parità di coordinata y , come in figura 2.12(b).

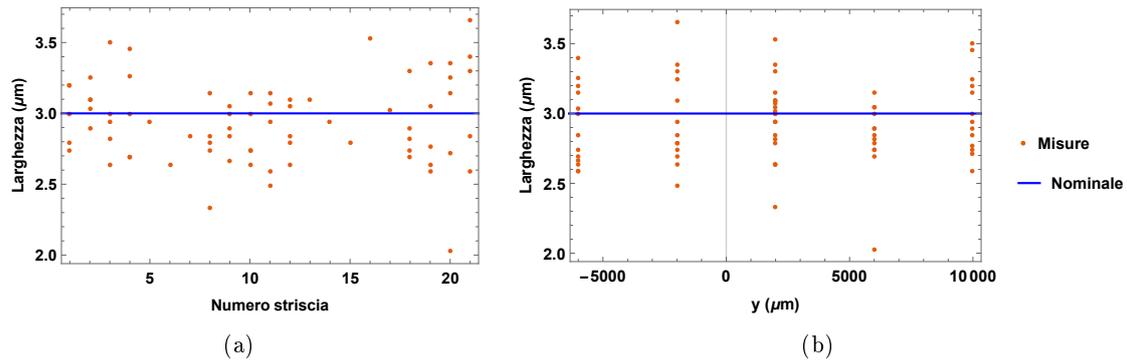


Figura 2.12: Grafico a dispersione di tutte le misure prese in funzione del numero di striscia (a) e della coordinata y (b) a confronto con la larghezza nominale di $3 \mu m$

Nei grafici a dispersione l'andamento è piuttosto casuale. Tuttavia ci sono alcune peculiarità che emergono analizzando le misure a parità di striscia. In tabella 2.2 si riportano medie, con errori della media associati, ed errori quadratici medi per ogni striscia con misure ripetute. Inoltre in figura 2.13 si graficano per ognuna i valori medi con associati come barre d'errore gli errori quadratici medi, indici della dispersione della popolazione.

Tabella 2.2: Media (\bar{x}), con errore della media associato ($\sigma_{\bar{x}}$), ed errore quadratico medio (σ) di tutte le misure prese per ogni striscia

n°striscia	$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}(\mu m)$	$\sigma(\mu m)$
1	3.0 ± 0.1	0.2
2	3.07 ± 0.06	0.1
3	3.0 ± 0.1	0.3
4	3.0 ± 0.2	0.3
8	2.8 ± 0.1	0.3
9	2.89 ± 0.07	0.1
10	2.85 ± 0.09	0.2
11	2.8 ± 0.1	0.3
12	2.88 ± 0.08	0.2
18	2.9 ± 0.1	0.2
19	2.9 ± 0.1	0.3
20	2.9 ± 0.2	0.5
21	3.2 ± 0.2	0.4

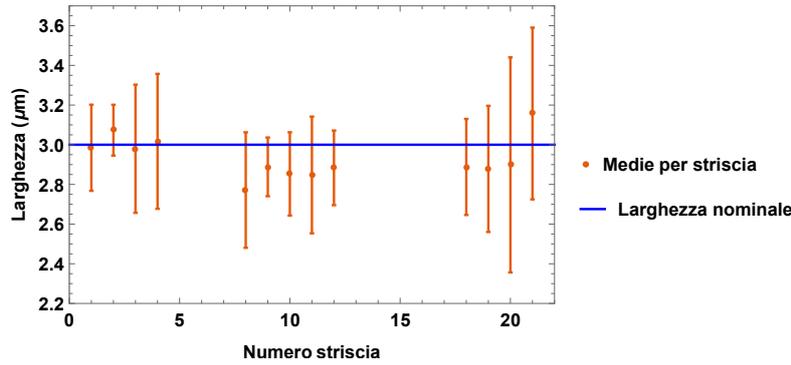


Figura 2.13: Medie delle misure per ciascuna guida con associati come barre d'errore gli errori quadratici medi, indici della dispersione della popolazione

Tutte le determinazioni risultano compatibili entro $2\sigma_{\bar{x}}$ con il valore nominale e sono tutte compatibili tra loro. La scelta di usare come barra d'errore l'errore quadratico medio nel grafico 2.13 è funzionale ad evidenziare la maggiore variabilità che le strisce laterali numero 20 e 21 presentano rispetto alle altre. Ciò si può spiegare con una peggiore distribuzione del photoresist sulle regioni più marginali del campione, con successive ripercussioni sull'uniformità in larghezza delle strisce prodotte.

Per completezza si riporta anche l'analisi a parità di coordinata y (tabella 2.3): essa mostra la presenza di discrepanze maggiori per i valori medi alle posizioni $y = 6000 \mu m$ e $y = -6000 \mu m$. Va detto però che quest'ultima osservazione non è risolutiva, poichè non si pesa il numero di striscia e quindi nella media sono conteggiate sia strisce centrali che strisce marginali.

Tabella 2.3: Media (\bar{x}), con errore della media associato ($\sigma_{\bar{x}}$), ed errore quadratico medio (σ) di tutte le misure prese per ogni posizione y

$y(\mu m)$	$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}(\mu m)$	$\sigma(\mu m)$
10000	3.00 ± 0.08	0.3
6000	2.82 ± 0.08	0.3
2000	2.97 ± 0.06	0.3
-2000	2.97 ± 0.09	0.3
-6000	2.91 ± 0.08	0.3

Per studiare quindi la singola campionatura in funzione della posizione (x,y) , pesando sia la coordinata y che il numero di striscia si utilizzano i plot matriciali di figure 2.14 e 2.15. Riportando il numero progressivo delle 13 strisce con 5 misure ciascuna sull'asse delle ascisse e in ordinata la coordinata y del sistema di riferimento del profilometro, si associa ad ogni singola misura una gradazione di colore funzione del valore assoluto in larghezza (figura 2.14) o dello scarto rispetto al valore nominale (figura 2.15). Tali plot sono realizzati con il software *Mathematica*.

I plot matriciali mostrano bene come le campionature con risultati in larghezza più distanti dal valore nominale sono collocabili nelle regioni marginali del campione, in particolare per le strisce 20 e 21 (12-13 in figure 2.14 e 2.15) e per la posizione $y = 10000 \mu m$ per

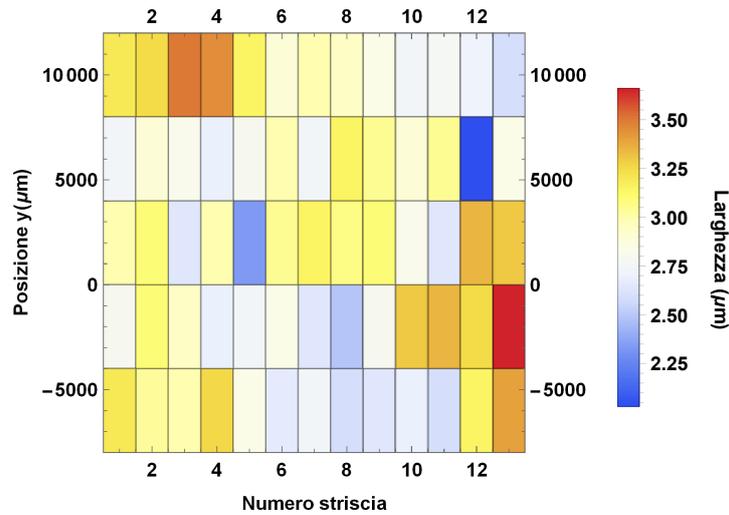


Figura 2.14: Plot matriciale dei valori di larghezza misurati per le strisce con più campionature

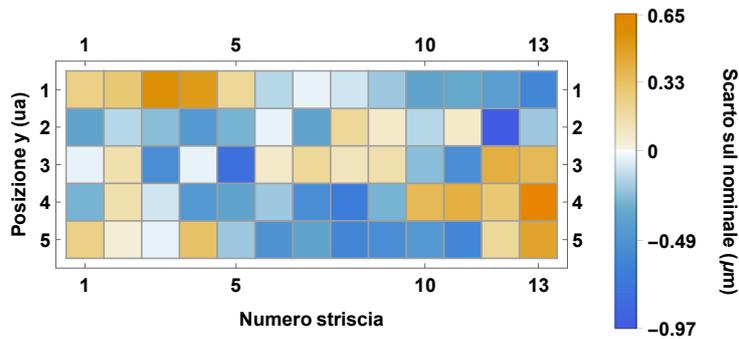


Figura 2.15: Plot matriciale degli scarti rispetto al valore nominale delle misure di larghezza per le strisce con più campionature

le strisce 1-4, a conferma di quanto detto in precedenza sull'uniformità nella distribuzione del photoresist.

2.2.2 I canali microfluidici

Sempre al profilometro KLA-Tencor P-10 Surface Profiler si sono effettuate misure in larghezza e profondità dei canali microfluidici, acquisendo 12 campionature per il canale lungo e 6 per quello corto. In figura 2.16 si mostrano le posizioni sul campione delle campionature, espresse nelle coordinate (x,y) del sistema di riferimento del profilometro. In questo caso le campionature non sono regolarmente distribuite, al fine di acquisire più misure nelle regioni con maggiore criticità, come la zona di giunzione e le quattro estremità dei canali.

Per la misura in larghezza la modalità di determinazione è la stessa delle misure del paragrafo precedente, mentre la misura in profondità consiste in una stima dell'altezza media del canale. Un esempio del profilo del canale determinato dal profilometro si può vedere in figura 2.17.

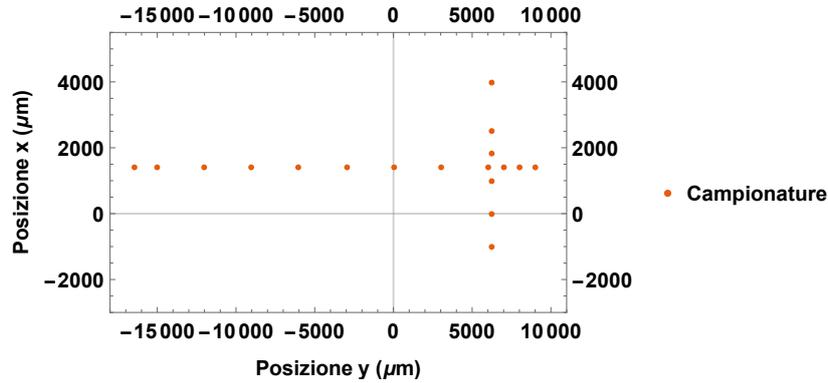


Figura 2.16: Posizioni sul campione delle misure effettuate in larghezza e profondità dei canali (coordinate (x,y) del sistema di riferimento del profilometro).

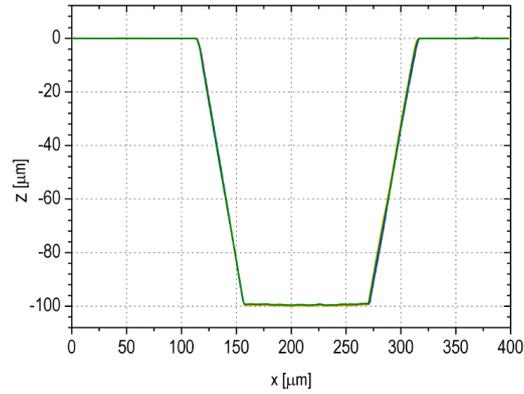


Figura 2.17: Risultato della scansione al profilometro del profilo del canale.

Come già descritto al paragrafo 2.1.2, sul fondo del canale ci sono striature dovute allo scavo della lama ($\sim 10^2$ nm), ma questa misura di profondità ne effettua semplicemente un valore medio, limitandosi alla verifica sia in larghezza che in profondità dell'uniformità dei canali prodotti.

In tabelle 2.4 per il canale corto e 2.5 per il canale lungo sono riportate tutte le acquisizioni con le relative coordinate variabili y (canale lungo) e x (canale corto).

Tabella 2.4: Valori delle singole misure in larghezza e profondità per il canale corto. La profondità nei punti estremali del canale riflette la forma della lama.

$x(\mu m)$	Larghezza(μm)	Profondità(μm)
4000	222.3	87.59
2500	218.3	98.23
1800	211.1	98.28
1000	206.7	98.32
0	215.6	98.35
-1000	205.1	83.44

Tabella 2.5: Valori delle singole misure in larghezza e profondità per il canale lungo. La profondità nei punti estremali del canale riflette la forma della lama.

$y(\mu m)$	Larghezza(μm)	Profondità(μm)
9000	208.8	80.72
8000	208.8	98.48
7000	204.3	98.41
6000	205.3	98.41
3000	207.3	98.47
0	204.5	98.58
-3000	204.2	98.48
-6000	205.7	98.54
-9000	205.8	98.45
-12000	206.6	98.44
-15000	205.3	98.33
-16400	205.5	77.94

Le misure in larghezza sia per il canale lungo che per quello corto non mostrano grandi differenze in funzione della posizione: pertanto per ciascun canale si calcola media, errore della media ed errore quadratico medio di tutti i valori ottenuti (tabella 2.6) e si graficano tutte le singole acquisizioni in funzione della coordinata variabile (figura 2.18), attribuendo come errore sulla singola misura l'errore quadratico medio calcolato.

Tabella 2.6: Media (\bar{x}), con errore della media associato ($\sigma_{\bar{x}}$), ed errore quadratico medio (σ) delle misure in larghezza per i due canali

Larghezza	$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}(\mu m)$	$\sigma(\mu m)$
Canale lungo	206.0 ± 0.5	2
Canale corto	213 ± 3	7

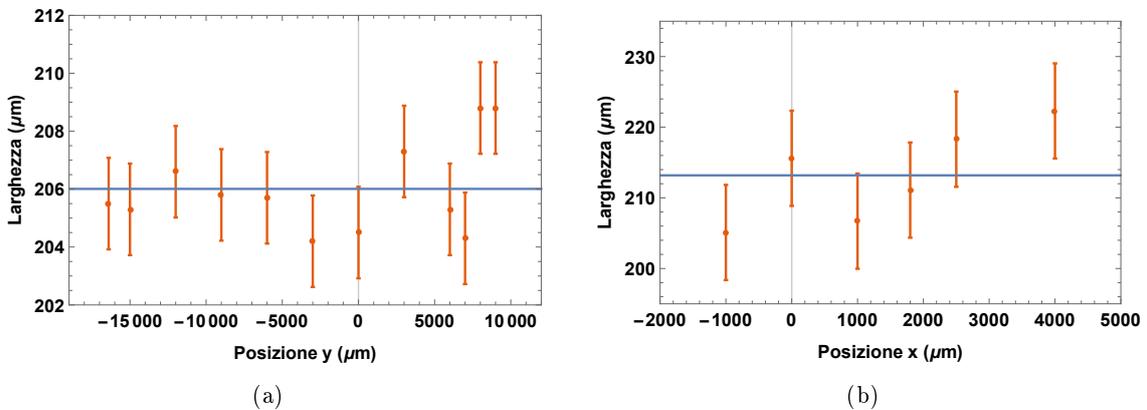


Figura 2.18: Larghezza del canale lungo (a) e corto (b): valori delle singole misure riportati rispetto al valor medio (blu) con errore associato l'errore quadratico medio.

Sulle misure in profondità si può osservare invece uno scostamento dei valori presi solo in prossimità dei quattro punti estremali della croce dei canali. Questo è dovuto alla forma circolare della lama usata nel processo di microlavorazione meccanica: la lama scava in profondità lungo tutto il canale con elevata riproducibilità tranne che in questi quattro punti. Tali punti non sono comunque importanti ai fini dell'esperimento, poiché non interessati dal processo di formazione e trasporto delle gocce. Pertanto si scartano dai calcoli le quattro posizioni estremali e si stimano con tutte le altre misure, per ciascun canale, media, errore della media ed errore quadratico medio (tabella 2.7), graficando in funzione della coordinata variabile le acquisizioni non estremali con errore attribuito l'errore quadratico medio calcolato (figura 2.19).

Tabella 2.7: Media (\bar{x}), con errore della media associato ($\sigma_{\bar{x}}$), ed errore quadratico medio (σ) delle misure in profondità per i due canali

Profondità	$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}(\mu m)$	$\sigma(\mu m)$
Canale lungo	98.46 ± 0.02	0.07
Canale corto	98.30 ± 0.03	0.05

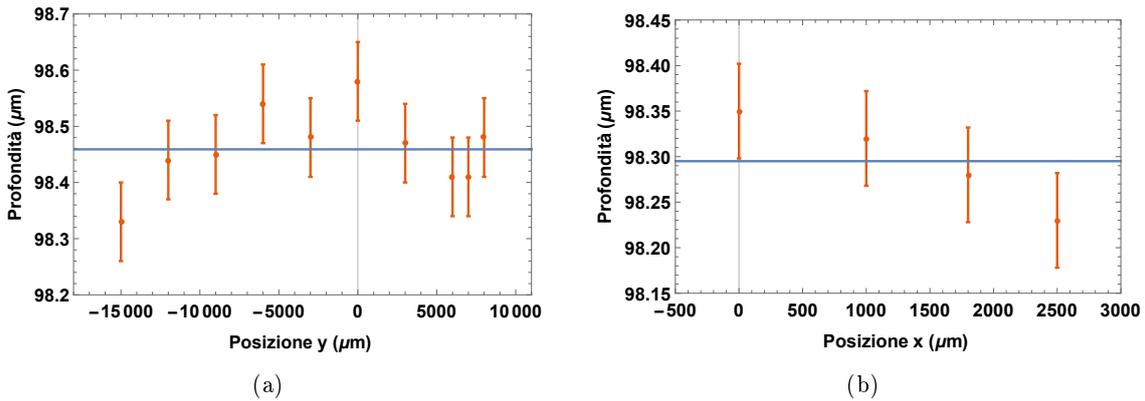


Figura 2.19: Profondità del canale lungo (a) e corto (b): valori delle singole misure non estremali riportati rispetto al valor medio (blu) con errore associato l'errore quadratico medio. I punti estremali dei canali sono scartati sia dal grafico che dal computo dell'errore quadratico medio e della media.

In conclusione, si è verificata un'elevata riproducibilità sia in larghezza che in profondità (eccetto per i quattro punti estremali) dei canali microfluidici prodotti, con tutte le singole misure che, attribuendo ad esse come errore σ , risultano compatibili tra loro e con il loro valor medio (figure 2.18 e 2.19) entro 2σ . Si può osservare inoltre che il canale più corto presenta in larghezza una dispersione σ maggiore, mentre in profondità le precisioni nei due canali sono simili.

2.2.3 Misure in Near-field e set up sperimentale

Una volta terminato il processo di produzione delle guide di luce e dei canali microfluidici, occorre verificare il livello di trasmissione luminosa delle guide, legato all'accoppiamento che esse hanno con il canale microfluidico che le interrompe. L'accoppiamento infatti diffe-

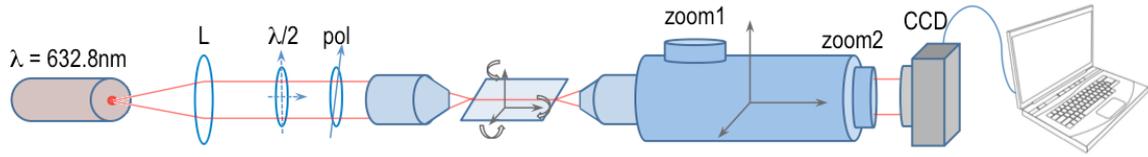


Figura 2.20: Schema dell'apparato sperimentale nella configurazione per misure di Near-field

risce in base al fluido che riempie il canale stesso: il fascio trasmesso dalla guida d'ingresso si apre con un angolo di apertura θ_0 che è funzione dell'indice di rifrazione del fluido nel canale. Per una guida di luce ad indice graduato, come per una fibra ottica, l'apertura numerica NA del fascio in corrispondenza dell'interruzione della guida stessa risulta:

$$NA = n_0 \cdot \sin\theta_0 = \cos t \quad (2.1)$$

ove n_0 è nel caso in esame l'indice di rifrazione del canale e θ_0 l'apertura del fascio. L'apertura numerica NA, come indica l'equazione (2.1), è una costante ed è legata agli indici di rifrazione dell'interno e dell'esterno della guida (per una fibra si userebbero i termini *core* e *cladding*) [42]. Di conseguenza, cambiando indice di rifrazione n_0 , muta l'apertura del fascio θ_0 : se ad esempio n_0 cresce, il fascio si restringe.

Per valutare la trasmissione luminosa di una guida, si deve ricorrere ad una tecnica di imaging near-field, ovvero l'acquisizione con una fotocamera digitale delle immagini della guida ad una distanza dalla sua uscita inferiore alla lunghezza d'onda del fascio trasmesso. L'apparato sperimentale necessario per questa tecnica (schema di figura 2.20) consta di:

- una sorgente laser (He-Ne) di lunghezza d'onda 632.8 nm (colore rosso) e potenza nominale 4 mW,
- una lente collimatrice a focale lunga ($f=2$ m), molto maggiore del Rayleigh range del fascio laser ($z_0 \sim 20$ cm) e posta a distanza pari a f in modo da avere effetto collimante,
- una lamina a $\frac{\lambda}{2}$ e un polarizzatore, necessari per ruotare la polarizzazione preferenziale del laser (attorno ai 30° rispetto all'asse verticale) e selezionare per il fascio una polarizzazione TE o TM da convogliare sul campione,
- un obiettivo $20\times$ per focalizzare il fascio sulla guida d'ingresso,
- un microscopio in posizione orizzontale con lente obiettivo $20\times$ che raccoglie nel fuoco l'uscita della guida di luce di raccolta,
- un portacampione che permette di muovere il campione per realizzare l'accoppiamento obiettivo-guide-microscopio con tecnica di End-Butt-Coupling [43],
- una fotocamera digitale (CCD) LaserCam-HR camera (Coherent Inc.)

La necessità di considerare le due polarizzazioni scaturisce dal fatto che il Niobato di Litio è un materiale birfrangente e quindi la trasmissione luminosa con TE o TM è differente.

Con l'apparato sperimentale di figura 2.20, si sono effettuate misure di intensità trasmessa dalla stessa guida variando il fluido nel canale e la polarizzazione. Nelle misure svolte si sono considerati aria, acqua ed esadecano con 3% di surfattante. Il canale, poichè il campione non era stato ancora chiuso con vetro, è stato riempito mettendovi una goccia di liquido per mezzo di una pipetta.

In tabella 2.8 e in figura 2.21 si possono vedere le misure effettuate, le immagini acquisite con il CCD e i risultati dell'analisi dati. Il programma di acquisizione fornisce una matrice di numeri ciascuno associato ad un pixel della fotocamera. Tali numeri sono direttamente proporzionali all'intensità incidente sul pixel e sono espressi in unità arbitraria. L'integrale di tutti i valori associati ai pixel illuminati fornisce così una quantità proporzionale all'intensità totale trasmessa dalla guida e registrata dal CCD. Il fotodiodo che si utilizza in seguito, nelle misure presentate nel capitolo 4, raccoglie proprio l'intensità luminosa totale: l'integrale quindi è il parametro di confronto per valutare il grado di trasmissione luminosa da parte della guida al variare del fluido nel canale.

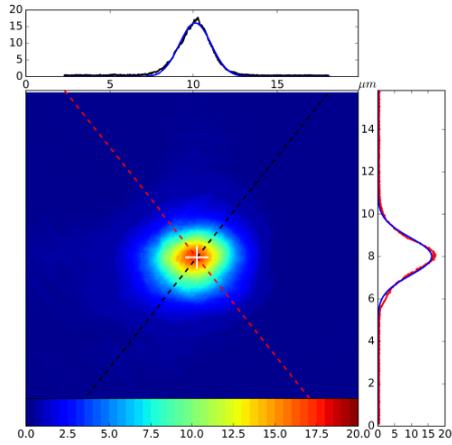
Pertanto, in tabella 2.8 si mostrano i rapporti tra gli integrali delle immagini di figura 2.21 e l'integrale maggiore tra esse a polarizzazione fissata. Si può vedere che, tra i fluidi considerati, la presenza di esadecano nel canale permette la massima trasmissione luminosa e che l'acqua permette un migliore accoppiamento rispetto all'aria. Questo è ovviamente dovuto alla relazione (2.1) e alla restrizione del fascio per n_0 crescenti, poichè risulta (ricordando che $n_{\text{esadecano}} \sim 1.434$ e $n_{\text{acqua}} \sim 1.33$):

$$n_{\text{esadecano}} > n_{\text{acqua}} > n_{\text{aria}}$$

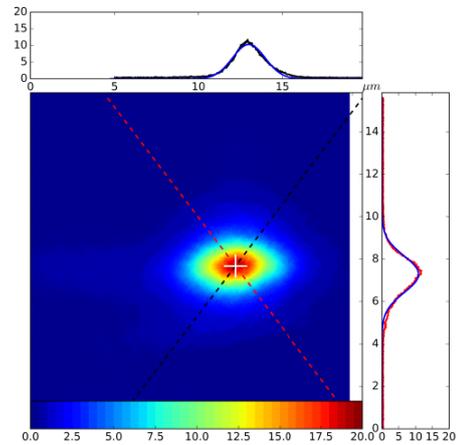
Di conseguenza è convogliata sulla guida di luce di raccolta una maggiore intensità luminosa. Una stima dell'apertura numerica per le guide a indice graduato di questo tipo di dispositivi è presentata in [6] e fornisce $NA \sim 0.13$.

Tabella 2.8: Rapporti di trasmissione in funzione del fluido nel canale e della polarizzazione in ingresso. Sono riportate anche le attenuazioni OD utilizzate sulla linea del fascio per non danneggiare il CCD: gli integrali e i successivi rapporti in tabella sono già rinormalizzati in base all'attenuazione usata.

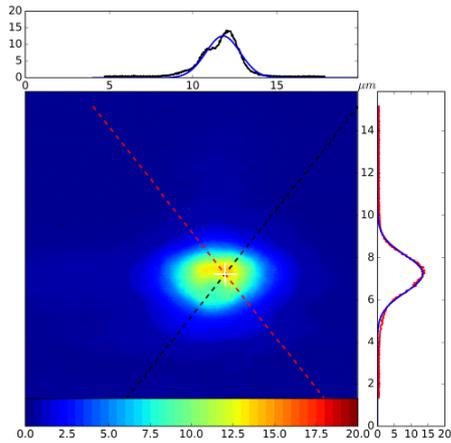
Fluido	Polarizzazione	OD	I/I_{max}
Aria	TE	0	~ 0.52
Aria	TM	0	~ 0.49
Acqua	TE	0.2	~ 0.76
Acqua	TM	0.2	~ 0.80
Esadecano	TE	0.2	1
Esadecano	TM	0.3	1



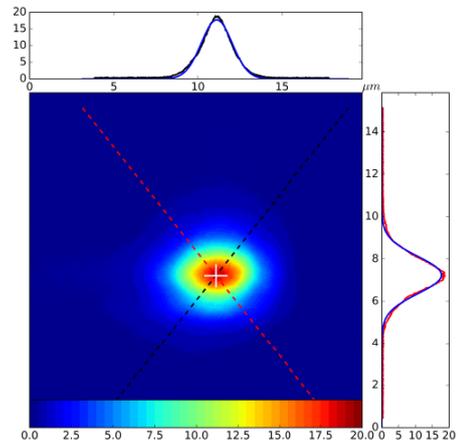
(a)



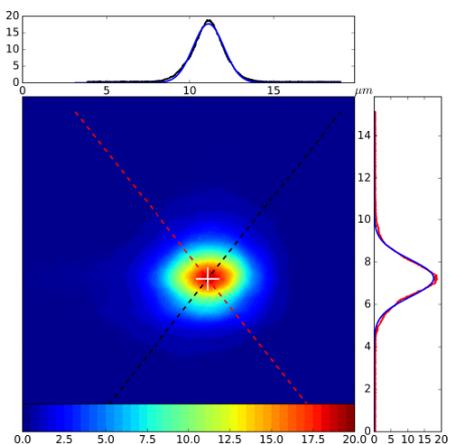
(b)



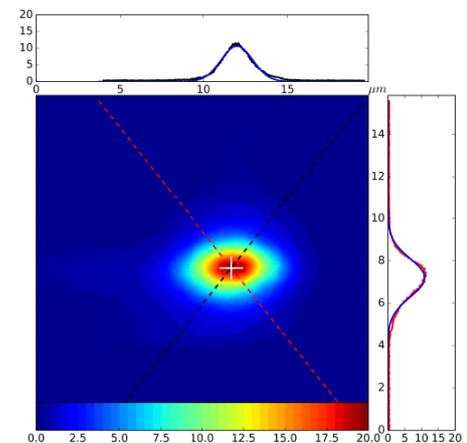
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 2.21: Misure di Near-field CCD della stessa guida con nel canale aria (a-b), acqua (c-d) ed esadecano con 3% di surfattante (e-f). Le polarizzazioni del fascio in ingresso sono TE per (a), (c), (e), TM per (b), (d), (f). Le attenuazioni OD sono quelle riportate in tabella 2.8. I pixel sono già convertiti in lunghezze, espresse in μm (1 pixel= $6.7 \times 6.7 \mu m^2$).

Capitolo 3

Produzione di gocce con Nanoparticelle

In questo capitolo, si presenta l'apparato sperimentale con cui si producono gocce contenenti nanoparticelle d'Oro e se ne rivela il passaggio nel canale microfluidico utilizzando l'array di guide di luce realizzato. Le gocce sono generate servendosi della giunzione a croce dei canali microfluidici del campione in configurazione di T-junction. Sfruttando l'interazione ottica delle nanoparticelle con la luce, si propone in questa tesi di studiare il segnale luminoso trasmesso per ottenere informazioni sulla dimensione e la concentrazione delle NP nella goccia micrometrica.

Nelle prime due sezioni del capitolo si presentano alcuni richiami sul funzionamento di un generatore di gocce in T-junction e sull'interazione di nanoparticelle con la luce. Nella sezione 3.3 invece si descrive in dettaglio l'apparato sperimentale, le problematiche connesse alla produzione di gocce con nanoparticelle e le soluzioni proposte in merito dallo sperimentatore.

3.1 Microfluidica in una T-junction

La microfluidica è un campo di ricerca che studia il controllo e la manipolazione di quantità estremamente piccole di fluidi (fino a volumi dell'ordine di picolitri o nanolitri), con applicazioni che spaziano dalla biologia [5][1] e medicina [2] alla chimica micro-analitica [3]. Questi piccoli volumi di fluido si ottengono grazie a geometrie molto confinate, con scale di lunghezza tipicamente dell'ordine di poche decine di micrometri [37].

Un parametro adimensionale molto importante in fluidodinamica è il numero di Reynolds

$$Re = \frac{\rho v l}{\eta} \quad (3.1)$$

con ρ e η rispettivamente densità e viscosità dinamica del fluido, v velocità del flusso e l dimensione caratteristica del sistema. Il numero di Reynolds indica il rapporto tra le forze inerziali e quelle viscosi nel fluido: per le lunghezze molto piccole tipiche dei canali microfluidici, questo parametro presenta valori molto bassi ($Re < 100$), associati a flussi di fluido laminari e facilmente controllabili [44].

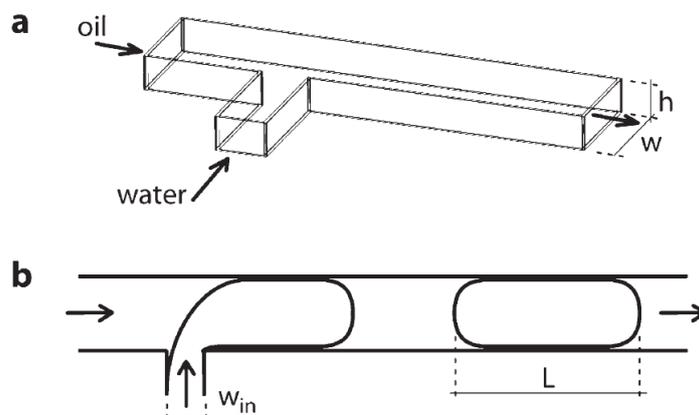


Figura 3.1: Giunzione a T di canali microfluidici: fluidi flussati (a) e formazione di gocce in regime di squeezing (b) [44].

In particolare, la microfluidica a gocce consiste nella produzione di piccole quantità di un fluido (detto fase dispersa) confinate all'interno di un canale microfluidico in un altro fluido immiscibile con il primo (fase continua). Una caratteristica importante dei canali microfluidici è che la fase dispersa non deve mai bagnare le loro pareti, a differenza della fase continua, garantendo un maggiore controllo sul trasporto e sulla generazione della goccia [37][6]. In questo modo inoltre le gocce, non entrando mai in contatto con le pareti del canale, proteggono dall'interazione con sostanze esterne il contenuto racchiuso nella goccia, cosa importante in vista di applicazioni in ambito biologico e chimico, come il trasporto ad esempio di reagenti chimici, molecole o campioni biologici [38][4].

I metodi per la produzione di gocce sono numerosi e si dividono in attivi (che richiedono l'utilizzo di sorgenti energetiche esterne) e passivi (basati solo sull'interazione tra le due fasi). In questa tesi si usa un generatore di gocce in T-junction, metodo di produzione passivo, il cui nome deriva dalla configurazione a T con cui si incrociano i canali microfluidici, come si può vedere in figura 3.1. All'interno dei canali si flussano due liquidi immiscibili (come olio e acqua in figura 3.1) e dall'incontro tra le due fasi nella giunzione si possono generare gocce, a seconda delle caratteristiche dei fluidi in ingresso (densità, viscosità, tensioni superficiali, bagnabilità) e dei flussi della fase dispersa (Q_D) e continua (Q_C). In dettaglio, il meccanismo di rottura che porta alla formazione di una goccia in una T-junction si può descrivere nei seguenti passaggi [44]:

- 1- le due fasi presentano un'interfaccia alla giunzione tra i due canali, con il flusso della fase dispersa che penetra nel canale principale facendo crescere l'interfaccia,
- 2- il flusso della fase continua distorce l'interfaccia della fase dispersa alla giunzione nella direzione del flusso,
- 3- il collo che collega il canale di ingresso con la goccia si rompe e la goccia fluisce nel canale principale.

Quindi, la produzione delle gocce e la loro dimensione è determinata da una competizione tra la resistenza alla deformazione da parte della pressione capillare, da un lato, e le forze viscosive e la pressione dovuta alla fase continua dall'altro [4].

Il numero di capillarità

$$Ca = \frac{\mu_C v_C}{\sigma} \quad (3.2)$$

con μ_C e v_C viscosità e velocità media della fase continua e σ tensione superficiale, esprime il rapporto tra le forze viscosi e la pressione capillare ed è un parametro che fornisce indicazioni sul tipo di regime di produzione delle gocce [6].

In particolare, per grandi Ca la forza viscosa è la principale responsabile del processo di separazione della fase dispersa che porta alla formazione di una goccia: la fase dispersa non ostruisce il canale principale e quindi le gocce ottenute così sono piccole e con estremità asimmetriche, con forma indipendente dalla geometria del canale [4]. Questo regime di produzione di gocce prende il nome di *dripping*. Diversamente, per piccoli Ca a dominare il processo è la pressione della fase continua: in questo caso la fase dispersa riesce ad ostruire tutto il canale principale e la rottura è causata dalla maggiore resistenza al flusso che incontra la fase continua, portando a gocce più lunghe e con estremità più simmetriche, legate alla geometria del canale [4]. Questo regime si denota come *squeezing* e per esso Garstecki et al. [44] hanno proposto una legge di scaling, verificata con dati sperimentali, che lega la lunghezza delle gocce al rapporto tra i flussi, in base alla relazione:

$$\frac{L}{w_C} = 1 + \alpha \frac{Q_D}{Q_C} \quad (3.3)$$

ove L è la lunghezza della goccia, w_C larghezza del canale principale, Q_D e Q_C i flussi di fase dispersa e continua, α un parametro di fitting [44].

3.2 Proprietà ottiche di nanoparticelle metalliche

Fin dall'antichità, l'uomo ha sfruttato inconsciamente l'interazione di nanoparticelle metalliche con la luce: un tipico esempio riportabile al riguardo è la Coppa di Licurgo, una coppa di vetro del IV secolo d.C. conservata al British Museum di Londra. La sua peculiarità cromatica, di colore rosso o verde se illuminato rispettivamente in trasmissione o in riflessione, non è dovuta all'uso di una particolare pittura, ma al fatto che nel suo vetro si trovano NP di lega Au_xAg_{1-x} [45].

Queste proprietà ottiche, utilizzate a livello artigianale per molti secoli, iniziarono ad essere investigate dal punto di vista scientifico solo a metà del XIX secolo da Michael Faraday, con i suoi studi sull'oro colloidale [46]. Fu però solo nel 1908, con Gustav Mie, che si giunse ad una formulazione teorica completa dell'interazione di una nanoparticella sferica con un campo elettromagnetico incidente [47]. Mie presentò in termini di fisica classica una soluzione alle equazioni di Maxwell esatta per NP sferiche, che rimane tutt'oggi un riferimento rilevante per lo studio delle loro proprietà ottiche. Pur presentando infatti delle limitazioni, quali il considerare nanoparticelle di forma sferica, non interagenti tra loro e in un mezzo non assorbitivo, la teoria di Mie modella bene i risultati ottenuti con la maggior parte delle preparazioni colloidali [48]. Tuttavia, la complessità della soluzione presentata da Mie, che prevede lo sviluppo del campo elettrico in termini delle funzioni di Bessel sferiche e dei polinomi associati di Legendre [47][49], rende necessaria l'introduzione di approssimazioni che semplificano computazionalmente i risultati. In particolare, per

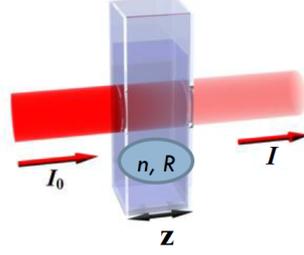


Figura 3.2: Misura di Optical Density

NP metalliche di piccole dimensioni rispetto alla lunghezza d'onda λ incidente ($D < \lambda$, con D diametro della NP), si può considerare la cosiddetta approssimazione dipolare. In questo caso, l'oscillazione degli elettroni di conduzione indotta dal campo incidente risulta collettiva e le NP si comportano quali dipoli irradianti luce, con un picco di risonanza (detta risonanza plasmonica superficiale) ad una determinata lunghezza d'onda dipendente dalle loro dimensioni, dal loro materiale e dalla matrice in cui si trovano. Questo tipo di approssimazione equivale, nello sviluppo della soluzione completa di Mie, a considerare solo il primo termine dello sviluppo (per $l = 1$), con gli altri termini trascurabili per $D < \lambda$. Al crescere invece delle dimensioni l'approssimazione perde di validità e si devono considerare anche multipolarità successive, con l'introduzione di ulteriori risonanze ad altre λ anch'esse dipendenti dalla dimensione, dalla matrice e dal materiale delle NP [47][49].

L'effetto complessivo che la presenza di una soluzione di NP comporta in una misura di trasmissione di luce in far-field, schematizzata in figura 3.2, risulta in una diminuzione dell'intensità trasmessa I a valle della cuvette contenente la soluzione. Vale infatti:

$$I = I_0 e^{-n\sigma_{ext}(D,\lambda)z} = I_0 e^{-n \cdot (\sigma_{abs}(D,\lambda) + \sigma_{sca}(D,\lambda)) \cdot z} \quad (3.4)$$

con I_0 intensità incidente, n densità numerica di NP per volume, z spessore della cuvette e $\sigma_{ext}(D, \lambda) = \sigma_{abs}(D, \lambda) + \sigma_{sca}(D, \lambda)$ sezione d'urto di estinzione. Quest'ultima racchiude in sé la dipendenza sia dal diametro D delle NP che dalla λ incidente ed è somma delle sezioni d'urto dei due possibili canali di interazione che le NP presentano con la luce, ovvero *scattering* e assorbimento. In letteratura solitamente si esprime la relazione (3.4) definendo una grandezza, detta Optical Density (OD), che risulta essere:

$$OD = -\text{Log}_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = n\sigma_{ext}z \cdot \text{Log}_{10}e = n \cdot (\sigma_{abs}(D, \lambda) + \sigma_{sca}(D, \lambda)) \cdot z \cdot \text{Log}_{10}e$$

In particolare, la teoria di Mie fornisce lo sviluppo in multipolarità anche delle sezioni d'urto di *scattering* e assorbimento [49], che risultano dipendere dal rapporto D/λ come:

$$\begin{aligned} \sigma_{abs} &= \sum_{l=1}^{\infty} \sigma_{abs,l} & \text{con } \sigma_{abs,l} &\approx \left(\frac{D}{\lambda}\right)^{2l+1} \\ \sigma_{sca} &= \sum_{l=1}^{\infty} \sigma_{sca,l} & \text{con } \sigma_{sca,l} &\approx \left(\frac{D}{\lambda}\right)^{2(2l+1)} \end{aligned}$$

Come si può desumere dalle dipendenze, lo *scattering* risulta prevalente per D/λ non trascurabili, mentre l'assorbimento per $D/\lambda \ll 1$. Pertanto, per taglie piccole l'estinzione è dovuta principalmente all'assorbimento, mentre per taglie grandi allo *scattering*.

3.3 Apparato sperimentale

Le misure descritte nel capitolo 4 sono ottenute con l'apparato sperimentale schematizzato in figura 3.3, che permette di svolgere acquisizioni di segnali variabili nel tempo. Rispetto al set up precedentemente usato per le misure di Near-field (sezione 2.2.3), questa configurazione presenta come rivelatore un fotodiodo al posto della fotocamera CCD. Infatti il fotodiodo permette di registrare l'intensità totale trasmessa dalla guida nel tempo al variare di ciò che fluisce nel canale nel corso della misura.

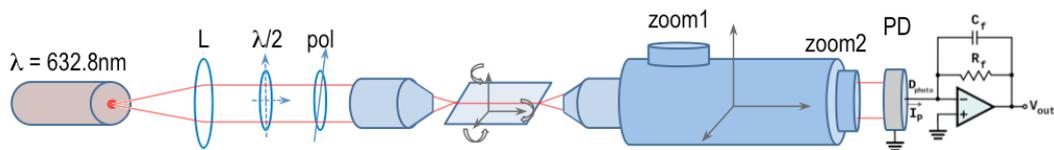


Figura 3.3: Schema dell'apparato sperimentale nella configurazione per misure real-time

Come si può vedere dal confronto con figura 2.20, gli elementi ottici sono gli stessi utilizzati e descritti nelle misure di Near-field e per essi si rimanda alla sezione 2.2.3. In questo caso però il campione è già chiuso su vetro e gli ingressi dei canali microfluidici sono connessi al sistema di pompe Elveflow OBI Mk3 Pressure Controller per farvi fluire dentro i liquidi per le misure. Il sistema di pompaggio, a tecnologia piezoelettrica, presenta 4 possibili uscite collegabili direttamente alle provette contenenti i liquidi, con range di pressioni 0-200 mbar per tutte le uscite. Il software consente il controllo del sistema sia in flusso che in pressione¹: a causa del possibile deposito di NP nei flussimetri, per tutte le misure effettuate il controllo scelto è in pressione. Nella sezione 3.3.4 si presentano in modo dettagliato le problematiche e le soluzioni proposte dallo sperimentatore per questo tipo di controllo. Sempre per evitare accumulo di NP negli interstizi, con conseguente variazione della densità della soluzione in flusso, le provette su cui si aziona il controllo in pressione sono collocate in alto rispetto al chip e la pressione è applicata sulla superficie del liquido. L'uscita delle provette è sul loro fondo dove i tubicini pescanti raccolgono il liquido e lo fanno fluire verso il chip senza risalite. Un'immagine dell'apparato sperimentale, ove si mostra l'ubicazione del campione e delle provette, è riportata in figura 3.4.

Come si può vedere in figura 3.4, al di sotto del campione si ha una telecamera Basler acA800-510um che permette di svolgere acquisizioni video simultaneamente al fotodiodo. Per le misure in goccia la telecamera fornisce le lunghezze reali con cui effettuare la calibrazione, presentata nella sezione 3.3.4, delle misure di lunghezza delle gocce con fotodiodo (che sono espresse come intervalli di tempo).

Con questo apparato sperimentale sono possibili misure in flusso (monofase) o in goccia. I liquidi che si sono usati sono esadecano con 3% di surfattante, una soluzione di PBS (phosphate-buffered saline) 0.1 mM e sospensioni contenenti nanoparticelle in PBS 0.1 mM. Nel seguito della sezione si presentano in dettaglio il set up per entrambe le tipologie di misure, le soluzioni di nanoparticelle e le problematiche del controllo in pressione.

¹Ovvero tenendo costante con un meccanismo di feedback il flusso di liquido nel chip o la pressione agente sulle provette. OBI Mk3 Pressure Controller ha sensori in pressione con risoluzione 0.006% e una stabilità di pressione pari a 0.005%.

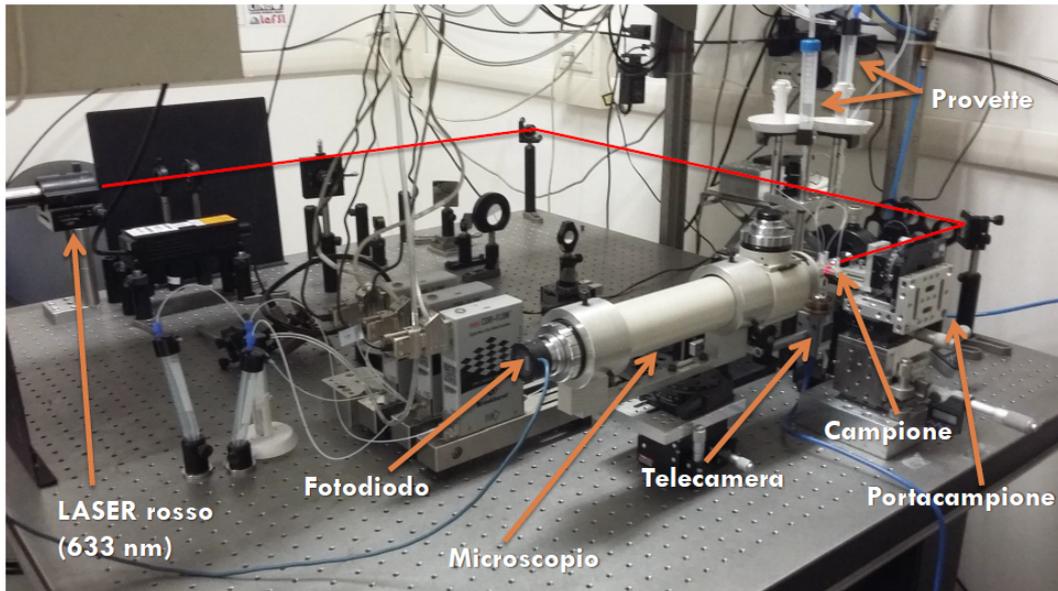


Figura 3.4: L'apparato sperimentale: banco ottico, linea del laser, campione e rivelatori

3.3.1 Set up per misure in flusso

Le misure in flusso consistono nel flussare all'interno del chip un solo liquido, registrando con il fotodiodo la variazione di trasmissione luminosa con fluidi diversi nel canale. Si utilizza un'unica uscita di pressione dell'OBI Mk3 e un ingresso per il chip microfluidico, con gli altri input usati come uscite per il liquido flussato.

Rispetto alle misure in Near-field (sezione 2.2.3), in questo caso con il fotodiodo si raccoglie direttamente l'intensità totale trasmessa dalla guida, tralasciandone lo studio della forma effettuabile con il CCD. Come riportato nell'equazione 2.1, la variazione del fluido nel canale comporta un cambio dell'apertura del fascio e quindi dell'intensità raccolta dalla guida di luce a valle del canale.

Essendo la misura di un segnale non periodico, si utilizza un amplificatore lock-in SR830 DSP per amplificare il segnale, filtrarlo dal rumore e normalizzarlo rispetto all'intensità del laser (che può mutare nel corso del tempo). Come si riporta nello schema di figura 3.5, un *chopper* posto sulla linea del laser la interrompe a intervalli regolari con una frequenza impostata dallo sperimentatore ($f = 800$ Hz): il segnale non è più continuo ma periodico ad impulsi alla frequenza del *chopper*. Il segnale di *trigger* del *chopper* funge da riferimento per il lock-in, che amplifica solo i segnali alla frequenza del *chopper* e in fase con esso.

Con un *beam splitter* invece si divide su due linee il fascio con una proporzione costante in intensità:

- un fascio continua il percorso diretto verso il campione, con il suo segnale che viene registrato dal fotodiodo e da qui connesso all'input del Lock-in amplifier,
- l'altro fascio è raccolto da un altro fotodiodo e inviato (attraverso una transimpedenza) all'ingresso di normalizzazione del Lock-in amplifier per normalizzare il segnale di input rispetto all'intensità del laser.

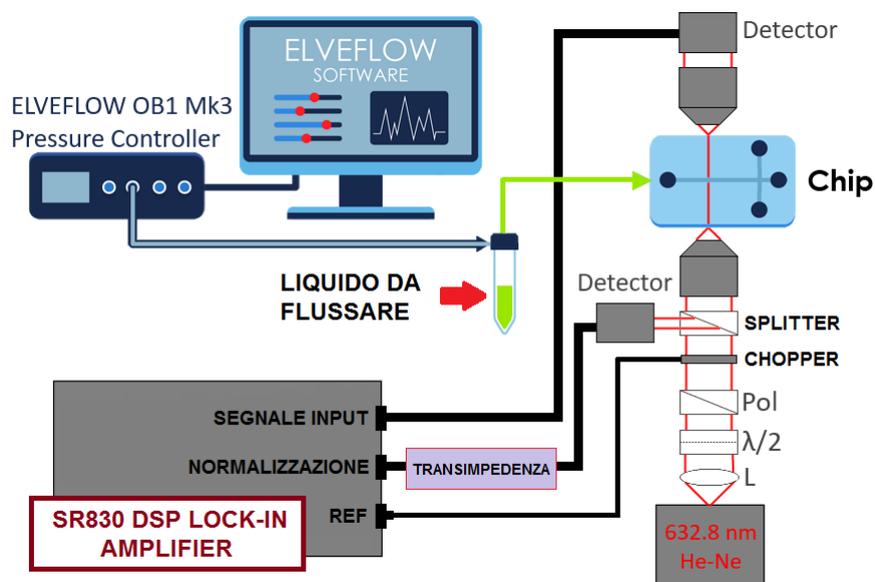


Figura 3.5: Schema dell'apparato sperimentale e del controllo in pressione per le misure in flusso.

Il *software* di acquisizione registra quindi un segnale in unità arbitrarie continuo nel tempo e proporzionale al rapporto tra l'intensità in uscita dalla guida di luce e l'intensità del laser stesso, rendendo la misura registrata indipendente da quest'ultima.

3.3.2 Set up per misure in goccia

Le misure in goccia si effettuano utilizzando due liquidi immiscibili contenuti in due provette differenti e azionando su ciascuna di esse una pressione diversa con l'Elveflow OBI Mk3 Pressure Controller. Le gocce sono prodotte utilizzando la giunzione a croce in configurazione di T-junction, chiudendo un ingresso del canale corto e flussando le fasi continua e dispersa come nello schema di figura 3.6. Un ingresso del canale microfluidico più lungo è riservato come uscita del chip. Il controllo in pressione si ottiene fissando il valore di pressione P_C della fase continua e variando quello P_D della fase dispersa lungo tutto il range di pressioni possibili per produrre gocce, acquisendo una buona statistica di diverse tipologie di lunghezza. La fase continua consiste in olio esadecano con 3% di surfattante mentre la fase dispersa in soluzioni di PBS 0.1 mM con o senza nanoparticelle in sospensione.

Per l'apparato di rivelazione, in questo caso il fotodiodo è connesso ad una transimpedenza che converte la corrente fotogenerata in un voltaggio, il quale è inviato direttamente al sistema di acquisizione. Si registra quindi la variazione nel tempo del segnale trasmesso dalle guide e raccolto dal fotodiodo al passaggio delle gocce microfluidiche prodotte nel canale. Il segnale luminoso associato al passaggio della goccia è legato alla sua forma e composizione e risulta estremamente riproducibile e periodico lungo tutto il treno di gocce rilevate in una singola misura. Un esempio di segnale in trasmissione associato ad un treno di gocce microfluidiche è visibile in figura 3.7, ove si riporta anche l'immagine di una goccia associata al segnale e presa con la telecamera Basler acA800-510um. Uno schema

della geometria di rivelazione è riportato alla fine di questo capitolo in figura 3.16, in cui si discute la calibrazione delle misure di lunghezza delle gocce con fotodiodo.

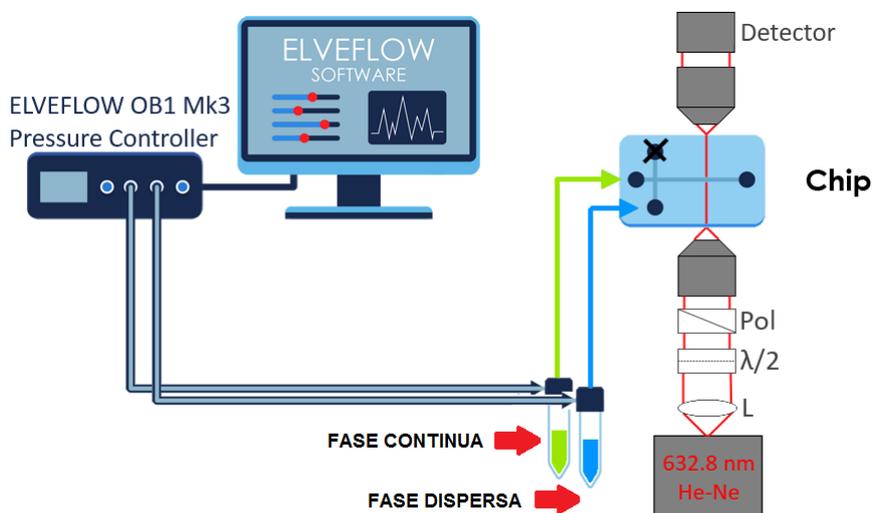
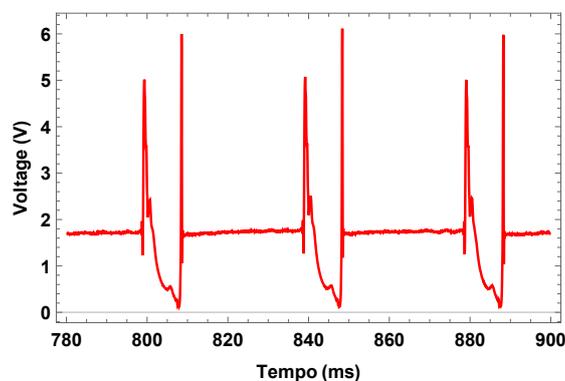
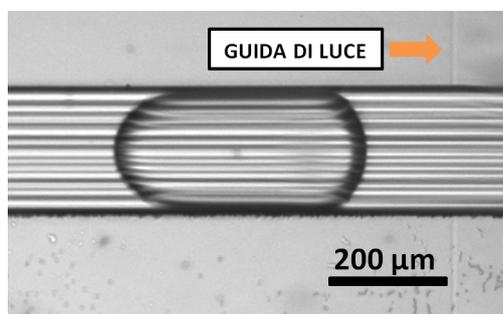


Figura 3.6: Schema dell'apparato sperimentale e del controllo in pressione per le misure in goccia.



(a)



(b)

Figura 3.7: Il segnale associato ad un treno di gocce e rilevato dal fotodiodo (a) e una fotografia scattata con la telecamera Basler di una goccia del treno (b) con visibile la posizione della guida di luce.

3.3.3 Le soluzioni di nanoparticelle d'Oro

Le nanoparticelle d'Oro acquistate (Sigma Aldrich) si trovano in una sospensione di PBS (phosphate-buffered saline) 0.1 mM e sono stabilizzate elettrostaticamente attraverso un rivestimento superficiale carico elettricamente [15], evitando così che esse incorrano in agglomerazione. Il PBS è una soluzione tampone di acqua salina frequentemente utilizzata in applicazioni biologiche, come ad esempio la stabilizzazione del pH di una cellula [50], il lavaggio di una cellula [51] e il trasporto di tessuti e sostanze in diluizione [52]. Il PBS inoltre ha un pH e concentrazioni di ioni simili a quelli del corpo umano. Il motivo principale quindi dell'uso del PBS in questo caso è legato alle possibili applicazioni in ambito biomedicale delle NP [16].

Le soluzioni acquistate di nanoparticelle d'Oro, con le loro caratteristiche in densità numerica (ρ_{NP}) e diametro, sono elencate in tabella 3.1. Si è calcolato e riportato in tabella anche il numero approssimato di NP illuminate dalla guida. Nota infatti la geometria di illuminazione e la densità numerica, è possibile determinare quante NP sono illuminate dalla guida di luce interrotta dal canale, calcolando il volume illuminato e moltiplicandolo per la densità numerica di NP. In questo conto si considera come costante la densità numerica nominale lungo tutto il volume del canale (in entrambe le configurazioni di misura, flusso o goccia). Il volume di canale illuminato inoltre si può approssimare come una sezione di un cono a base circolare (diametro minore $3 \mu m$, maggiore $40 \mu m$)², con un'altezza di circa $200 \mu m$ e secato a metà parallelamente all'altezza. Di conseguenza, con le opportune conversioni, si ottiene:

$$n_{NP} = \frac{\pi[(1.5 \mu m)^2 + (20 \mu m)^2]}{2} \cdot (200 \mu m) \cdot \frac{1}{2} \cdot \rho_{NP} \simeq (6.3 \cdot 10^{-8} mL) \cdot \rho_{NP} \quad (3.5)$$

Tabella 3.1: Le soluzioni acquistate di nanoparticelle di Au, con le loro caratteristiche in diametro, densità numerica e numero approssimato di NP illuminate.

Diametro NP Au (nm)	Densità numerica (NP/mL)	Numero NP illuminate
400 nm	$1.9 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 12
250 nm	$7.1 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 45
150 nm	$3.6 \cdot 10^9$ NP/mL	~ 230
100 nm	$3.8 \cdot 10^9$ NP/mL	~ 240
50 nm	$3.5 \cdot 10^{10}$ NP/mL	~ 2200
10 nm	$6.0 \cdot 10^{12}$ NP/mL	~ 380000

Per tutte le soluzioni di NP acquistate si sono misurati gli spettri di Optical Density (OD) con uno spettrofotometro V-670 UV-VIS-NIR (Jasco), i cui risultati sono riportati nelle figure 3.8 e 3.9. Per un confronto visivo con gli spettri di OD misurati, si mostrano le soluzioni di NP in figura 3.10.

²Segue dall'apertura numerica nel canale (NA \sim 0.13), dato riportato nel paragrafo 2.2.3 e in [6].

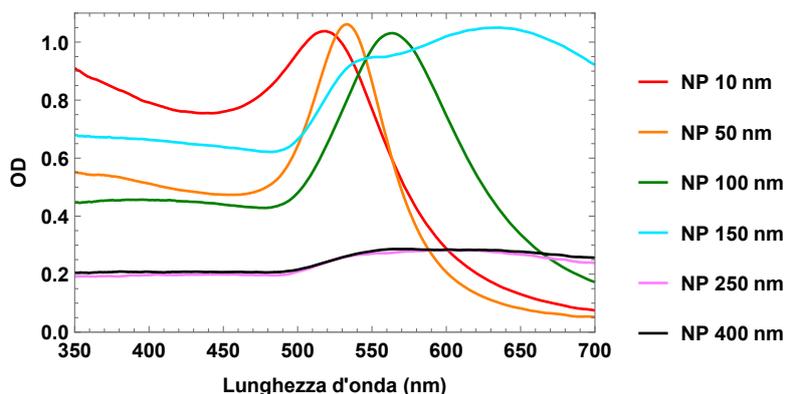


Figura 3.8: Spettri di OD per le soluzioni di NP di Au acquistate.

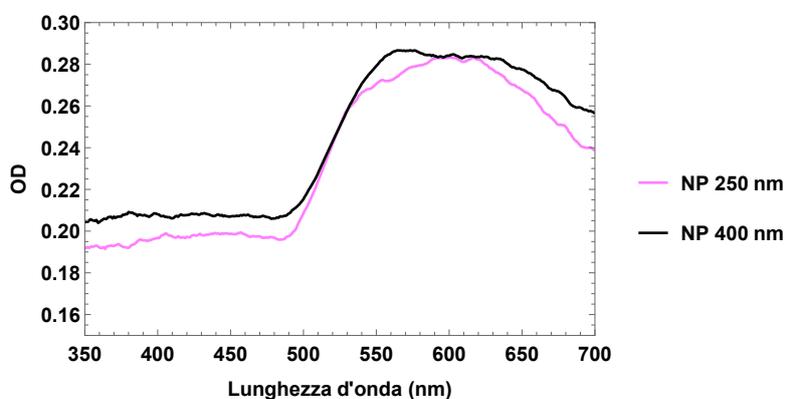


Figura 3.9: Spettri di OD per le soluzioni di NP di Au acquistate di diametri 400 e 250 nm. Lo spettro OD ottenuto per le NP di diametro 250 nm è curiosamente piuttosto simile a quello ottenuto con le NP di diametro 400 nm. Le misure OD sono state svolte a distanza di mesi rispetto a quelle del Capitolo 4: in merito si ipotizzano quindi problemi di conservazione e di stabilizzazione della sospensione con 250 nm.

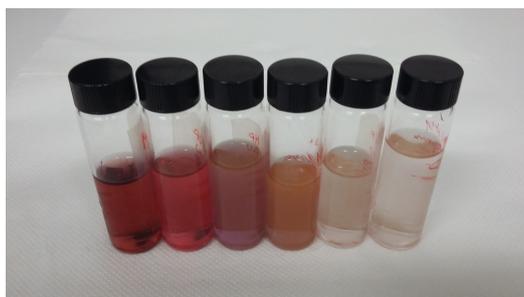


Figura 3.10: Boccette contenenti le soluzioni acquistate con NP di Au. Da sinistra verso destra: D=10, 50, 100, 150, 250, 400 nm.

Sempre allo spettrofotometro si è svolta inoltre una misura sul tempo medio di deposito delle nanoparticelle più pesanti che si sono acquistate, quelle di diametro 400 nm. Il deposito delle NP nel corso di una sessione di misure costituisce un serio problema per l'affidabilità dei risultati, poichè si misura la trasmissione luminosa di gocce o flussi di densità differente rispetto a quella nominale. Inoltre le NP, una volta che si sono depositate

nel canale, difficilmente possono essere rimosse, inficiando in via definitiva tutte le misure successive effettuate con quel chip opto-microfluidico. Di conseguenza, occorre stimare un tempo massimo per una sessione di misure con NP oltre cui non andare, per prevenire questi problemi. Come si può vedere quindi in figura 3.11, andando a misurare l'evoluzione dello spettro di OD nel corso del tempo per le NP con diametro 400 nm, gli spettri non presentano variazioni considerevoli fino a più di 40 minuti dall'inizio delle misure. Col passare del tempo, si osserva che la soluzione inizia ad addensarsi verso il fondo: la densità di NP intercettata dal fascio dello spettrofotometro cala poichè le NP scendono e quindi l'OD scala verso il basso. Si stabilisce pertanto che una sessione di misure con una soluzione di NP non possa durare oltre 40 minuti.

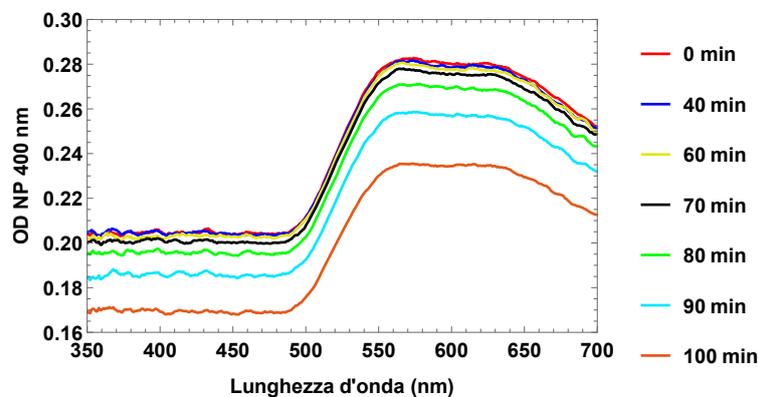


Figura 3.11: Variazione dell'Optical Density per le NP d'Oro di diametro 400 nm in funzione del tempo

3.3.4 Controllo in pressione

Come noto dalla letteratura [37][44] e richiamato nella sezione 3.1, per una T-junction i modelli teorici della microfluidica esprimono la lunghezza della goccia come funzione dei rapporti tra i flussi. Questo discende dal fatto che la fisica della formazione della goccia è legata a quanto volume di liquido di fase dispersa interagisce nel tempo con un volume di fase continua. Il controllo in flusso garantisce perciò una migliore riproducibilità: fissata la geometria della giunzione e i liquidi, le uniche quantità che influiscono sulla lunghezza della goccia sono i flussi di fase continua e dispersa.

Produrre gocce micrometriche con un controllo in flusso richiede l'utilizzo di flussimetri con un meccanismo di feedback, grazie al quale la pressione delle pompe è variata per tenere i flussi costanti ai valori impostati dallo sperimentatore. Tuttavia ciò non è possibile per la produzione di gocce con nanoparticelle, poichè il passaggio della fase dispersa rovinerebbe immediatamente i flussimetri per via del deposito nel tempo delle stesse NP. Anche l'uso di pompe a siringa non è stato preso in considerazione in questo lavoro, poichè potrebbe esserci deposito di NP nella siringa stessa, non controllando così con efficacia la densità di NP in ingresso.

Si è proceduto pertanto ad un controllo in pressione, usando l'apparato sperimentale e gli accorgimenti descritti al paragrafo precedente. Si fissa quindi il valore di pressione P_C della fase continua e si varia quello P_D della fase dispersa lungo tutto il range di pressioni possibili per produrre gocce. Tuttavia questo tipo di controllo non permette di riprodurre

con precisione gocce identiche con sola variazione del contenuto in esse. I motivi sono molteplici e riassumibili nei seguenti aspetti:

- 1) c'è dipendenza dal livello dei liquidi nelle provette su cui si aziona il controllo in pressione (vedi figura 3.4), a causa della loro pressione idrostatica,
- 2) in caso di misure lunghe si ha dipendenza della lunghezza dal tempo, poichè il liquido nelle provette cala in modo diverso tra fase dispersa e continua,
- 3) la variazione dei tubicini in sezione e lunghezza può mutare la conduttanza e quindi i flussi entranti a parità di pressioni impostate per le due fasi,
- 4) l'altezza dello scarico può influire sul gradiente di pressione e quindi sulla velocità e sulla lunghezza delle gocce.

In dettaglio si sono studiate le problematiche ai punti 1) e 2).

I dati sperimentali ottenuti variando i livelli di liquido nelle provette (punto 1) sono riportati per due regimi di pressione differenti in figure 3.12 e 3.13, fissando rispettivamente a $[P_D=37.5 \text{ mbar}, P_C=54.5 \text{ mbar}]$ e $[P_D=80 \text{ mbar}, P_C=100 \text{ mbar}]$ le pressioni in gioco. In esse si mostra come l'incremento di olio nella provetta determini una diminuzione netta della lunghezza della goccia (infatti cresce la pressione complessiva della fase continua [44]), mentre invece l'aumento del livello di PBS allunghi la goccia (per via della maggiore spinta che riceve la fase dispersa). Inoltre si può osservare come incrementando il regime di pressione, come in figura 3.13, si riduca, anche se non del tutto, l'influenza della pressione idrostatica. Per motivi di consumo delle soluzioni acquistate e poichè comunque pressioni maggiori (compatibili con l'apparato) non risolverebbero il problema, si è scelto di operare in tutte le misure di questa tesi nel regime di pressione $[P_D \text{ variabile}, P_C=54.5 \text{ mbar}]$, attuando gli accorgimenti esposti nel prosieguo di questa sezione.

Per il punto 2, si ha sensibilità della singola misura alla variazione dei livelli del liquido solo in caso di durata nettamente più lunga di quella tipica delle misure con fotodiodo (~ 30 secondi). In figura 3.14 si può vedere infatti come le stime della lunghezza ottenute con fotodiodo a parità di pressioni impostate $[P_D=37.5 \text{ mbar}, P_C=54.5 \text{ mbar}]$ siano ancora mediamente compatibili entro 2σ a distanza di 20 minuti, anche se con un trend evidente di accorciamento della goccia.

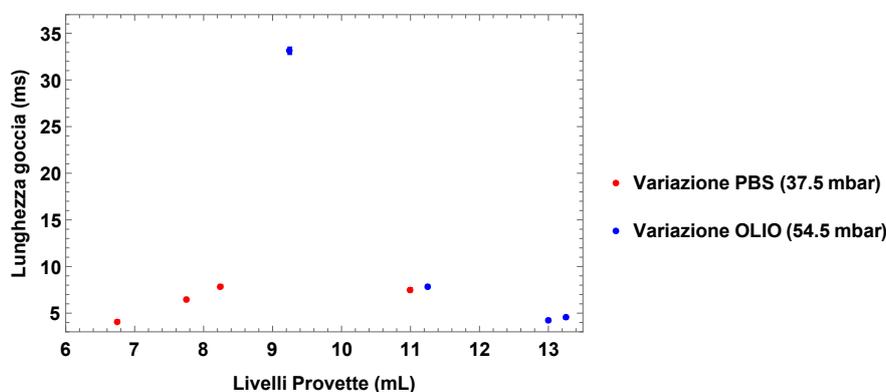


Figura 3.12: Variazione dei livelli nelle provette per PBS e Olio con $[P_D=37.5 \text{ mbar}, P_C=54.5 \text{ mbar}]$

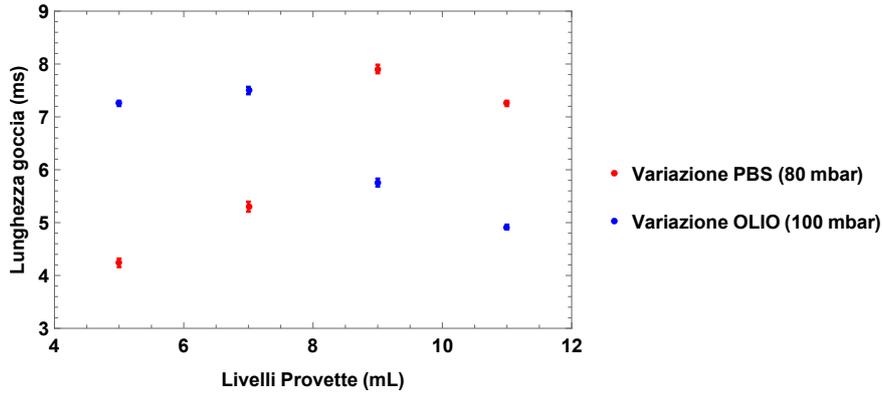


Figura 3.13: Variazione dei livelli nelle provette per PBS e Olio con [$P_D=80$ mbar, $P_C=100$ mbar]

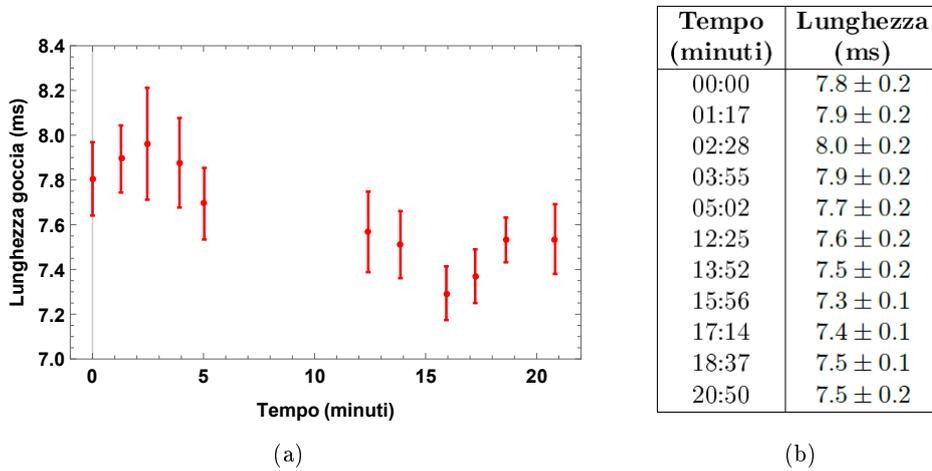


Figura 3.14: Variazione della lunghezza nel tempo per diminuzione dei livelli di liquido, regime [$P_D=37.5$ mbar, $P_C=54.5$ mbar]: plot in funzione del tempo (a) e tabella relativa (b).

Per ovviare quindi a queste problematiche, unitamente a quelle di deposito, ho messo a punto il seguente protocollo di misura:

- le provette contenenti le due fasi si riempiono sempre con pochi mL ($\sim 2-3$ mL) di liquido, per ridurre al minimo l'incidenza della loro variazione (punto 1),
- la singola misura con P_D fissa dura al massimo 30 secondi, per evitare mutamenti in corso della lunghezza (punto 2),
- un set completo di misure, variando lungo tutto il range la pressione della fase dispersa, dura al massimo 40 minuti, per impedire il deposito di NP nelle provette,
- non si cambiano l'apparato sperimentale (tubicini compresi) e con un impianto di condizionamento si garantisce una temperatura costante nel laboratorio (punto 3),
- si effettua sempre un confronto tra misure di PBS e di NP prese a distanza di massimo 2 ore nella stessa giornata, per prevenire comunque possibili cambiamenti delle condizioni di misura (punto 3),

- lo scarico è tenuto sempre alla stessa altezza (punto 4).

Tali accorgimenti minimizzano le problematiche e assicurano di lavorare sempre con gocce prodotte nell'intorno delle stesse condizioni. Ciò nonostante, non si ha la riproducibilità necessaria per un confronto efficace con gocce identiche poichè sono ancora troppe le variabili in gioco e le fluttuazioni statistiche (si veda in merito figura 4.12 nella sezione 4.2). Queste rendono impraticabile e troppo dispendioso lo svolgimento di tutte le misure cercando di ottenere gocce esattamente replicate, impostando solo i valori di P_D e P_C e mettendo ogni volta gli stessi precisi livelli di liquido nelle provette. In breve, nel tentativo di riprodurre gocce in modo identico si rischierebbe, a causa delle possibili fluttuazioni, di perdere fino a tutta la soluzione di NP acquistata.

Di conseguenza, la soluzione più praticabile e più semplice per lo sperimentatore è quella di effettuare il confronto tra gocce con e senza NP riportando tutti i risultati in funzione della lunghezza della goccia. Infatti le curve in funzione della lunghezza per i parametri che si possono estrapolare dalle misure (si veda la sezione 4.2, figura 4.14) risultano riproducibili proprio per il fatto di operare nell'intorno delle stesse condizioni di produzione. Studiando quindi in questi grafici gli andamenti per gocce di contenuto diverso, si possono interpolare i dati sperimentali e ricavare rapporti quantitativi locali a parità di lunghezza. A questo punto, seguendo il protocollo enunciato che assicura l'intorno delle condizioni di produzione, allo sperimentatore basta solo acquisire una buona statistica di misure ripetute per coprire tutto il range di lunghezze di gocce possibili.

L'ultimo controllo effettuato riguarda la misura della lunghezza della goccia fatta dal fotodiodo: quest'ultimo fornisce infatti un tempo di passaggio e non la reale lunghezza della goccia. Risulta necessario quindi controllare che il tempo di passaggio sia funzione della sola lunghezza e non del contenuto interno della goccia, cosicché nei confronti tempi uguali corrispondano a lunghezze uguali. In altre parole, occorre verificare che le NP non influenzino la velocità della goccia, mutando ad esempio la sua tensione superficiale o la sua viscosità [4].

Questo è stato fatto acquisendo video delle gocce in flusso nel canale al variare del contenuto e della loro lunghezza (cambiando P_D con $P_C=54.5$ mbar), usando la telecamera Basler acA800-510um posta al di sotto del canale microfluidico più lungo del campione. L'orientazione della telecamera è estremamente cruciale per l'affidabilità della misura: essa deve essere posta esattamente in asse con il canale, con direzione di vista perpendicolare al campione. Un cambiamento di orientazione dell'asse della telecamera infatti falserebbe la misura, poichè la telecamera registra sempre la componente di velocità e di lunghezza reale perpendicolare alla sua direzione di vista. L'acquisizione con telecamera è ovviamente simultanea alla presa dati con fotodiodo. In figura 3.15(a) si riportano i risultati del confronto tra le lunghezze delle gocce misurate con la telecamera (espresse in μm) e quelle con il fotodiodo (in ms), sia per gocce con PBS che per gocce con NP di 150 nm. Si può vedere invece la velocità in funzione della lunghezza reale in figura 3.15(b). Come si può vedere, non risulta dipendenza dal contenuto interno della goccia con l'apparato e la strumentazione in uso. Pertanto il confronto in funzione della lunghezza può essere svolto usando direttamente le misure di lunghezza del fotodiodo, più precise di quelle della telecamera, a patto di essere sempre nello stesso range di pressioni (cioè P_D variabile, $P_C=54.5$ mbar) e avere quindi la stessa velocità a parità di lunghezza.

Si è fatto lo stesso confronto di figura 3.15 anche per altre taglie di NP, ottenendo risultati analoghi. Appurata l'indipendenza della velocità dalla presenza di qualunque taglia di NP, si è scelto di acquisire una statistica abbondante di misure video una sola volta per le nanoparticelle di diametro 150 nm e per il PBS dello stesso giorno (proprio le misure di figura 3.15), svolgendo un accurato allineamento della telecamera rispetto al canale in un'unica occasione. Tali acquisizioni sono finalizzate ad ottenere una calibrazione $L(ms) \rightarrow L(\mu m)$ per tutte le misure effettuate nel range di pressioni considerato [P_D variabile, $P_C=54.5$ mbar].

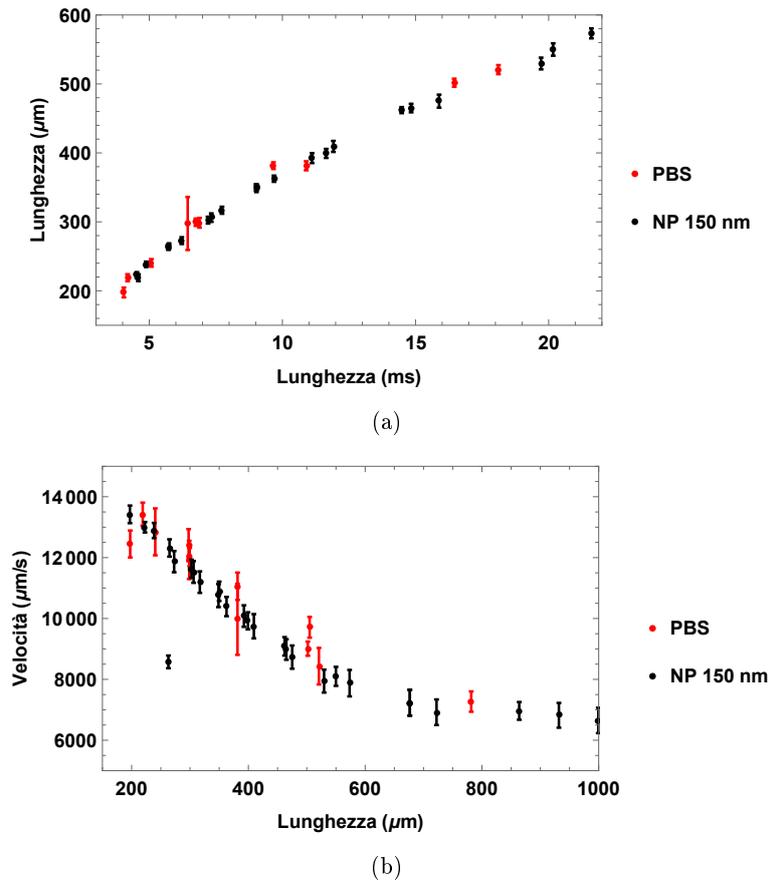


Figura 3.15: Riproducibilità in lunghezza e velocità tra gocce con PBS e gocce con NP di 150 nm: plot lunghezza reale in μm vs tempo di passaggio in ms (a) e velocità ($\mu m/s$) vs lunghezza reale (μm) (b)

Tuttavia, per fare ciò occorre osservare che la distribuzione dei dati in figura 3.15(a) non può essere approssimata come lineare: come si vede nel grafico, c'è una corrispondenza biunivoca $L(ms) \leftrightarrow L(\mu m)$, ma la linearità tra la lunghezza della goccia $L(\mu m)$ e il tempo di passaggio $L(ms)$ vale solo localmente per variazioni non troppo grandi di lunghezza. Infatti, la velocità è una funzione anch'essa della lunghezza (figura 3.15(b)), creando così la distorsione dalla linearità. Inoltre l'inizio e la fine del segnale luminoso associabile alla goccia non corrispondono al preciso passaggio dei vertici dei menischi anteriore e posteriore, ma al momento in cui la porzione più superiore della goccia viene intercettata dalla guida. In figura 3.16 si presenta uno schema della geometria di rivelazione della goccia da parte

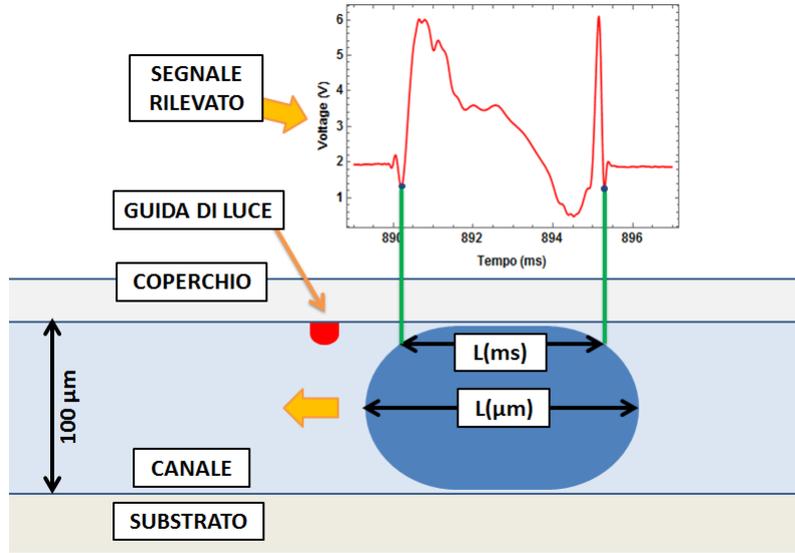


Figura 3.16: Immagine della rivelazione del passaggio della goccia da parte della guida. La dimensione della guida è volutamente non in scala per facilitare il lettore nella visualizzazione.

della guida. La lunghezza non intercettata k è legata al profilo di forma della goccia e, tramite esso, alla sua velocità: poiché la velocità varia con la lunghezza, anche k ne è funzione. Considerando tutte queste dipendenze, la lunghezza $L(\mu m)$ si può scrivere come:

$$L(\mu m) = v[L(\mu m)] \cdot L(ms) + k[L(\mu m)] = v[L(ms)] \cdot L(ms) + k[L(ms)] \quad (3.6)$$

ove nell'ultimo passaggio si riporta tutto in funzione di $L(ms)$ sfruttando la corrispondenza biunivoca $L(ms) \leftrightarrow L(\mu m)$. Di conseguenza, le dipendenze di k e v da $L(\mu m)$ portano ad una correzione rispetto alla linearità per variazioni non troppo grandi che si può inglobare considerando una funzione di tipo parabolico per riprodurre i dati sperimentali.

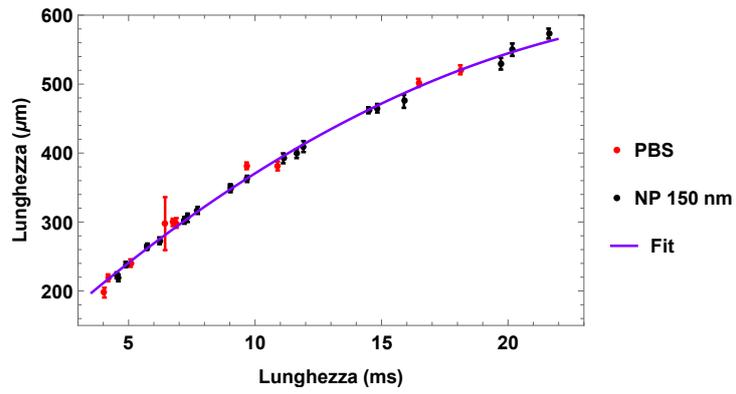
In conclusione, al fine di determinare una calibrazione $L(ms) \rightarrow L(\mu m)$ con il set di dati di figura 3.15(a), si effettua un fit parabolico nella regione di interesse [3.5-22 ms] usando la funzione:

$$L(\mu m) = a + b \cdot L(ms) + c \cdot L(ms)^2$$

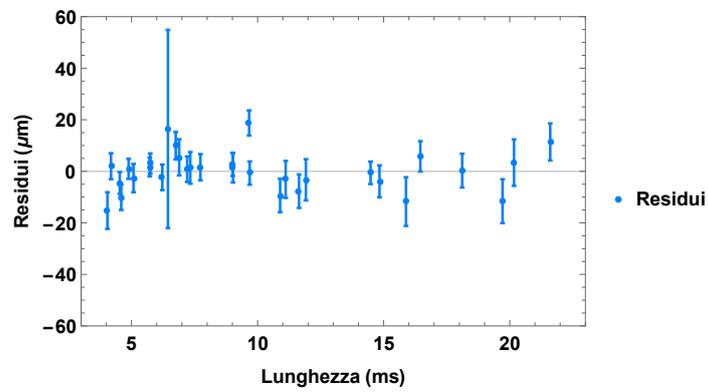
con cui convertire le misure di lunghezza della goccia ottenute col fotodiodo (espresse in ms) in lunghezze reali in μm . Nel fit si considerano sia le gocce con PBS che quelle con NP. I risultati sono riportati sia in tabella 3.2 che in figure 3.17(a) e 3.17(b).

Tabella 3.2: Risultati del Fit parabolico: $L(\mu m) = a + b \cdot L(ms) + c \cdot L(ms)^2$

Parametri Fit	Stime
$a(\mu m)$	$83 \pm 8 \mu m$
$b(\mu m/ms)$	$34 \pm 1 \mu m/ms$
$c(\mu m/ms^2)$	$-0.57 \pm 0.06 \mu m/ms^2$
R^2	0.999



(a)



(b)

Figura 3.17: Fit di conversione da tempo di passaggio in ms a lunghezza reale in μm (a) con grafico dei residui (b). I residui afferiscono a tutti i punti considerati (sia PBS che NP 150 nm).

Capitolo 4

Misure e Risultati sperimentali

In questo capitolo si presentano le misure e i risultati ottenuti servendosi dell'apparato sperimentale descritto nella sezione 3.3. Con il fotodiodo si è acquisito il segnale luminoso trasmesso da una guida interrotta dal canale microfluidico, allo scorrere in quest'ultimo sia di un flusso monofase che di un treno di gocce. Nella pratica sperimentale ha un ruolo cruciale l'accoppiamento tra il campione e l'ottica del fascio, realizzato con tecnica di End-Butt-Coupling [43] (già richiamata al paragrafo 2.2.3): in essa si focalizza il fascio sulla guida di luce in ingresso e si muove il microscopio in modo che il suo obiettivo raccolga nel proprio fuoco il fascio uscente dalla guida di output. Si introduce pertanto un ulteriore grado di libertà legato all'accoppiamento, inevitabilmente soggetto a possibili variazioni meccaniche nel tempo tali da provocare il disallineamento del campione e quindi il calo o la perdita della trasmissione luminosa da parte della guida.

4.1 Misure in flusso

Le misure in flusso sono effettuate utilizzando il set up sperimentale descritto al paragrafo 3.3.1, munito dell'amplificatore Lock-in SR830 DSP. Essendo l'accoppiamento non stabile nel tempo, i segnali ottenuti con queste misure non sono sempre costanti per via del possibile disallineamento delle guide rispetto in ingresso alla linea del fascio e in uscita

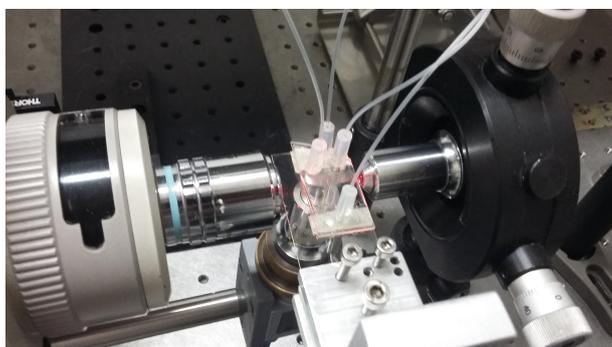


Figura 4.1: Il dispositivo opto-microfluidico accoppiato durante le misure: sono visibili il microscopio, l'obiettivo focalizzante in ingresso e il portacampione che lo movimenta. Anche l'obiettivo in ingresso e il microscopio sono movimentabili.

all'obiettivo del microscopio. Fissato il liquido in flusso nel canale e i parametri del Lock-in, la qualità dell'accoppiamento quindi è l'unico grado di libertà che può far variare il segnale nel corso della misura.

Dopo alcune misure preliminari al fine di determinare un metodo di misura riproducibile, si è deciso di effettuare le acquisizioni riportandosi ogni volta alla situazione di accoppiamento massimo. Questa corrisponde al raggiungimento della massima intensità trasmessa con il liquido in flusso nel canale variando con tecnica di End-Butt-Coupling l'allineamento e l'orientazione del campione e degli obiettivi. Il *software* di acquisizione del Lock-in SR830 DSP permette la visualizzazione su monitor in tempo reale dell'intensità rivelata dal fotodiodo e normalizzata dal Lock-in, consentendo allo sperimentatore di far partire la misura al raggiungimento della condizione di massimo. La durata di un accoppiamento è piuttosto variabile e dipende da molti fattori. Se comunque l'accoppiamento è di buona qualità, si può mantenere la stabilità nel segnale continuo per parecchi minuti.

Nei prossimi paragrafi si presentano le misure preliminari e quelle svolte con flusso di sospensioni contenenti NP. Per tutte le misure, il liquido è flussato con un controllo in pressione a 20 mbar. Inoltre, poichè il Lock-in amplifica il segnale e normalizza sull'intensità del laser in ingresso, i valori di intensità misurati sono espressi in unità arbitrarie.

4.1.1 Misure preliminari

In queste misure si verifica il rapporto costante in intensità tra i due fasci separati dal *beam splitter*, in modo che fluttuazioni del segnale siano da ricondurre al solo accoppiamento. Si presenta inoltre il computo dell'errore compiuto dallo sperimentatore sull'accoppiamento massimo e l'impatto del cambio di polarizzazione sul segnale trasmesso.

Suddivisione del fascio

Per permettere la normalizzazione, il *beam splitter* deve dividere il fascio in due rami (uno di controllo e uno di misura) in rapporto di intensità costante fra loro. Il controllo della costanza di questo rapporto si può fare posizionando il fotodiodo di misura (figura 3.5) subito dopo il *beam splitter* anzichè dopo il microscopio. L'amplificatore Lock-in normalizzando sull'intensità del laser fornisce come atteso un segnale con intensità costante, come riportato in figura 4.2, con una dispersione delle acquisizioni, stimabile dal rapporto tra l'errore quadratico medio σ e la media \bar{x} delle misure, inferiore all'1%.

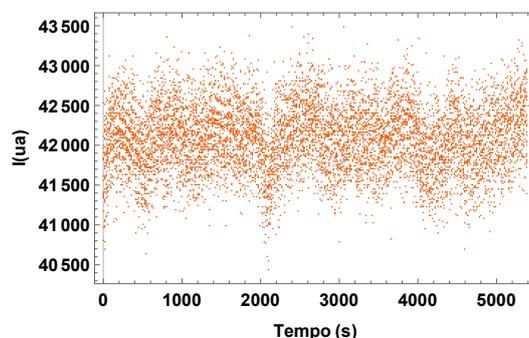


Figura 4.2: Intensità normalizzata misurata nella configurazione di controllo dello splitter: il segnale è costante entro le oscillazioni dello strumento di misura.

Disaccoppiamento

Il disaccoppiamento del campione entro un certo lasso di tempo è dovuto alla non perfetta stabilità meccanica dei supporti del campione stesso e delle ottiche. Pertanto, una volta raggiunta la condizione di accoppiamento massimo e fatta partire l'acquisizione, il segnale può diminuire nel corso della misura tanto più velocemente quanto non accurato era l'accoppiamento ottenuto. Del resto la sensibilità del sistema al disallineamento è di pochi μm (inferiore alla dimensione della guida ad indice graduato). Osservativamente, il disaccoppiamento può presentarsi smorzato nel tempo (figura 4.3(a)) oppure con andamento più irregolare (figura 4.3(b)): se l'accoppiamento raggiunto è ottimale, come si può vedere nelle figure, la stabilità può durare anche per minuti.

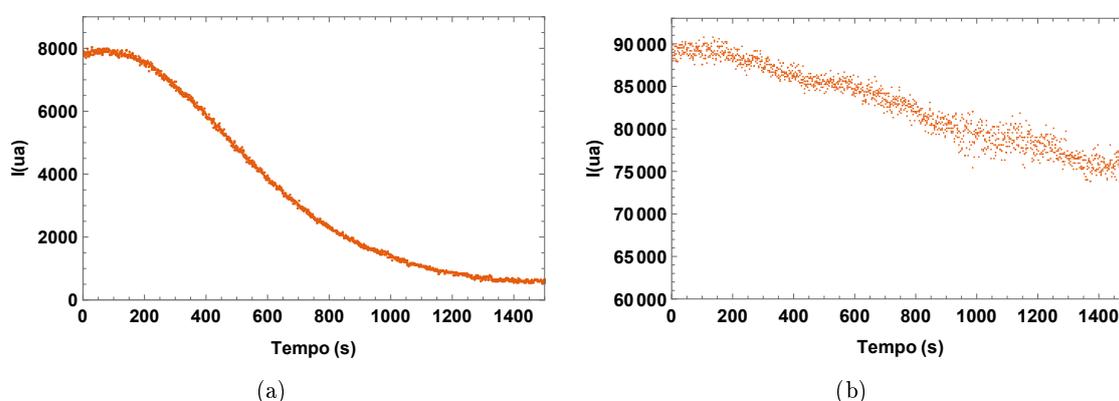


Figura 4.3: Segnali tipici di disaccoppiamento misurati nell'arco di 1500 s, esadecano (3% surfattante) nel canale a $P=20$ mbar, polarizzazione TE.

Errore dello sperimentatore nell'accoppiamento

Il metodo di misura scelto per le acquisizioni in flusso è l'ottenimento dell'accoppiamento massimo: per stimare l'errore compiuto sull'accoppiamento da parte dello sperimentatore si sono svolte 8 misure ripetute di intensità trasmessa con flusso di esadecano (3% di surfattante) e polarizzazione TE. Per ciascuna di esse si raggiunge la condizione di massimo accoppiamento e si fa partire la misura per la durata di circa un minuto. Poichè si verifica che la stabilità è mantenuta sempre entro almeno 20 secondi dall'inizio dell'acquisizione, come miglior stima per ognuna delle 8 misure si considera la media di tutte le campionature raccolte entro questo intervallo di tempo, minimizzando l'impatto del disaccoppiamento.

La media delle medie (\bar{x}_{TOT}) delle 8 misure fornisce invece la stima più accurata e precisa del valor vero della popolazione: pertanto in tabella 4.1 si riporta media (\bar{x}_{TOT}), errore della media ($\sigma_{\bar{x}_{TOT}}$), errore quadratico medio (σ_{TOT}) e dispersione massima Δ (in percentuale su \bar{x}_{TOT}) calcolati sulle medie delle 8 misure acquisite. In figura 4.4 si mostrano invece le medie delle singole 8 misure nei primi 20 secondi con associati come barre d'errore gli errori quadratici medi di ciascuna, indici della loro dispersione.

Come si può vedere, l'errore massimo compiuto dallo sperimentatore, valutabile considerando la dispersione massima Δ delle 8 medie in percentuale sulla media totale \bar{x}_{TOT} , è pari a circa il 6%, con un errore quadratico medio associato pari, in percentuale su \bar{x}_{TOT} , al 2%. Pertanto il metodo di misura adottato risulta accurato e preciso.

Tabella 4.1: Media (\bar{x}_{TOT}), errore della media ($\sigma_{\bar{x}_{TOT}}$), errore quadratico medio (σ_{TOT}) e dispersione massima Δ (in percentuale su \bar{x}_{TOT}) calcolati sulle medie delle 8 misure singole, prendendo per tutte solo i primi 20 secondi di acquisizione.

$\bar{x}_{TOT} \pm \sigma_{\bar{x}_{TOT}} (ua)$	$\sigma_{TOT} (ua)$	$\sigma_{TOT}/\bar{x}_{TOT} (\%)$	$\Delta/\bar{x}_{TOT} (\%)$
80900 ± 600	2000	$\sim 2\%$	$\sim 6\%$

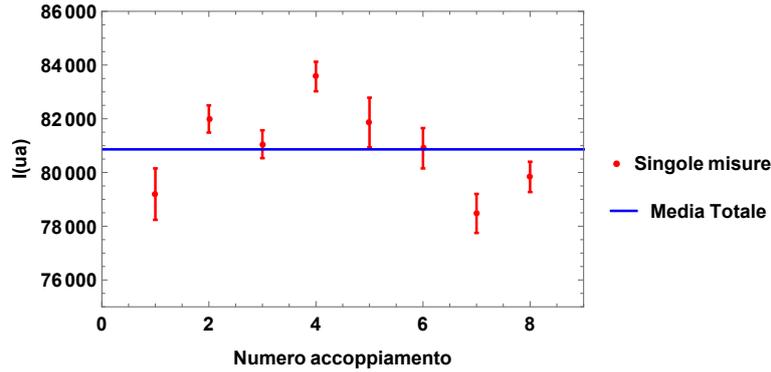


Figura 4.4: Stima dell'errore compiuto sull'accoppiamento da parte dello sperimentatore: medie per ogni misura nei primi 20 secondi con associati gli errori quadratici medi di ciascuna, indici della loro dispersione.

Polarizzazione TE e TM

Al variare della polarizzazione si ha un cambio dell'intensità trasmessa dalla guida, come si può vedere in figura 4.5 ove si confrontano a parità di condizioni la trasmissione in polarizzazioni TE e TM con esadecano (3% surfattante) in flusso nel canale. Tutte le misure nel presente lavoro di tesi considerano solo la polarizzazione TE, poichè essa è quella richiesta in altri stadi ottici da integrare in futuro nel Lab-On-a-Chip in $LiNbO_3$.

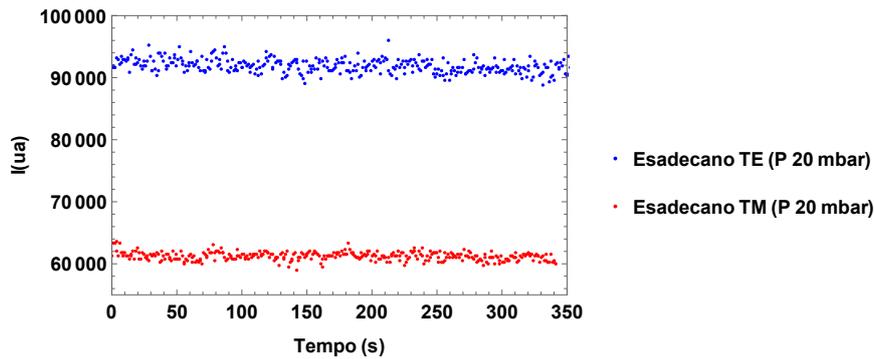


Figura 4.5: Intensità trasmessa con flusso di Esadecano (3% surfattante) con polarizzazioni TE e TM.

Considerando come migliore stima per entrambe le misure la media nei primi 20 secondi con errore della media associato, per cui $I_{TM} = 61900 \pm 200 ua$ e $I_{TE} = 93700 \pm 200 ua$, il rapporto tra i valori di intensità con le due polarizzazioni diverse è:

$$\frac{I_{TM}}{I_{TE}} = 0.668 \pm 0.003$$

4.1.2 Flusso con Nanoparticelle

Con l'apparato sperimentale descritto al paragrafo 3.3.1 e tenendo conto delle osservazioni preliminari riportate in quello precedente, si sono effettuate misure di intensità trasmessa con flusso di PBS 0.1 mM con o senza NP in sospensione, considerando le soluzioni contenenti NP di diametri 400, 250, 150, 100, 50 e 10 nm riportate al paragrafo 3.3.3. Le misure sono state svolte sempre con polarizzazione TE e con il metodo di accoppiamento massimo con misure ripetute validato al paragrafo precedente.

La procedura sperimentale scelta prevede, per una specifica soluzione contenente NP, di acquisire ogni volta misure ripetute in flusso con solo PBS seguite da misure ripetute con la sospensione di NP considerata. In questo modo si ha sempre un confronto diretto e ravvicinato nel tempo della trasmissione luminosa in presenza e in assenza di nanoparticelle nel liquido in flusso. Va osservato che la misura in flusso presenta alcune problematiche legate al possibile deposito di NP nel canale. Per evitare questo, si effettuano misure in tempi brevi, tenendo in flusso le soluzioni con NP per al massimo 20 minuti, coerentemente con quanto osservato in figura 3.11. Un modo migliore e più affidabile di procedere è però passare alle misure in goccia: la microfluidica a gocce garantisce infatti la non interazione del contenuto interno della goccia con le pareti del canale [4], fornendo maggiori garanzie sull'assenza di deposito di NP nel corso delle misure.

Si ottengono quindi un set di misure ripetute in flusso con PBS 0.1 mM senza NP e uno con NP in sospensione di un dato diametro: per ogni singola misura si calcola la media entro i primi 20 secondi di acquisizione (per via della migliore stabilità dell'accoppiamento), quindi per ogni tipo di soluzione si calcola la media totale delle medie (\bar{x}_{PBS} e \bar{x}_{NP}), con associato l'errore della media, e l'errore quadratico medio (σ_{PBS} e σ_{NP}). I risultati sono riportati per tutte le soluzioni di NP in tabella 4.2.

Tabella 4.2: Media (\bar{x}), con associato errore della media ($\sigma_{\bar{x}}$), ed errore quadratico medio (σ) delle medie delle singole misure in flusso con PBS 0.1 mM e con le sospensioni di PBS 0.1 mM contenenti NP di diametri differenti.

Diametro (nm)	$\bar{x}_{PBS}(ua)$	$\sigma_{PBS}(ua)$	$\bar{x}_{NP}(ua)$	$\sigma_{NP}(ua)$
400 nm	6610 ± 50	100	6760 ± 90	200
250 nm	6800 ± 40	100	6390 ± 40	100
150 nm	6580 ± 50	100	6070 ± 60	200
100 nm	6790 ± 70	200	6450 ± 70	200
50 nm	6770 ± 70	100	6470 ± 30	100
10 nm	6850 ± 70	200	6540 ± 80	200

Si riportano nelle figure 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11 i plot a dispersione per i primi 100 s di misura e gli istogrammi delle acquisizioni per i primi 20 secondi per le sospensioni contenenti NP rispettivamente di 400, 250, 150, 100, 50 e 10 nm. Nei plot a dispersione si può osservare come le misure si mantengano sempre costanti entro i primi 20 secondi e in alcuni casi anche ben oltre (ad esempio in figure 4.7(a) e 4.8(a)). Gli istogrammi invece permettono di evidenziare una buona sensibilità rispetto al solo PBS in flusso per alcuni tipi di soluzioni, in particolare quelle con diametro 250 nm (figura 4.7(b)), 150 nm (figura 4.8(b)) e 100 nm (figura 4.9(b)).

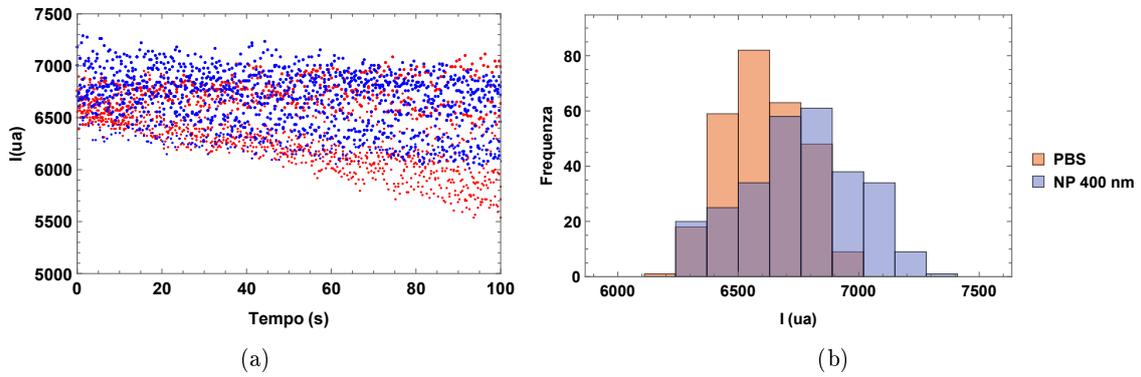


Figura 4.6: Misure in flusso con confronto tra PBS 0.1 mM e la soluzione contenente NP di 400 nm: in (a) plot a dispersione per i primi 100 s di misura, in (b) istogrammi delle acquisizioni per i primi 20 secondi.

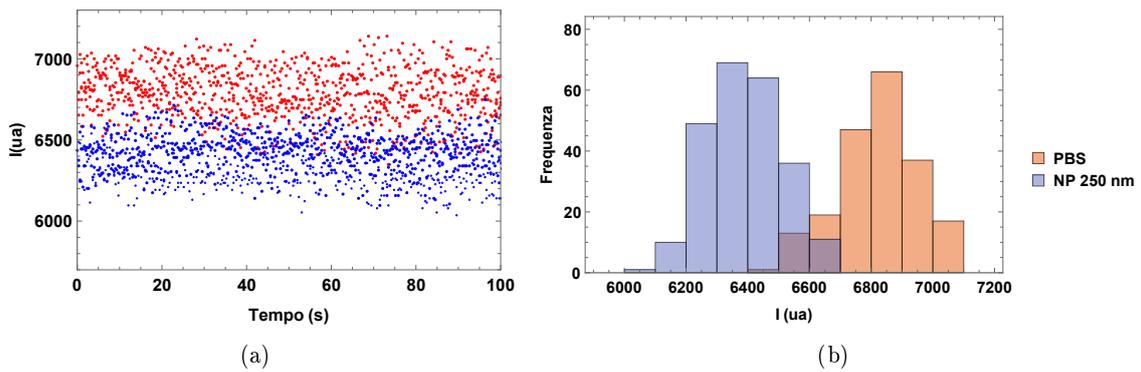


Figura 4.7: Misure in flusso con confronto tra PBS 0.1 mM e la soluzione contenente NP di 250 nm: in (a) plot a dispersione per i primi 100 s di misura, in (b) istogrammi delle acquisizioni per i primi 20 secondi.

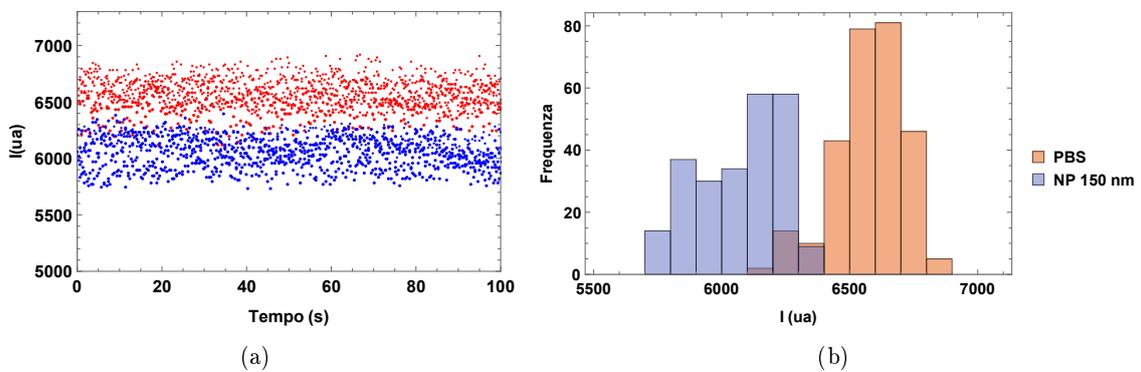


Figura 4.8: Misure in flusso con confronto tra PBS 0.1 mM e la soluzione contenente NP di 150 nm: in (a) plot a dispersione per i primi 100 s di misura, in (b) istogrammi delle acquisizioni per i primi 20 secondi.

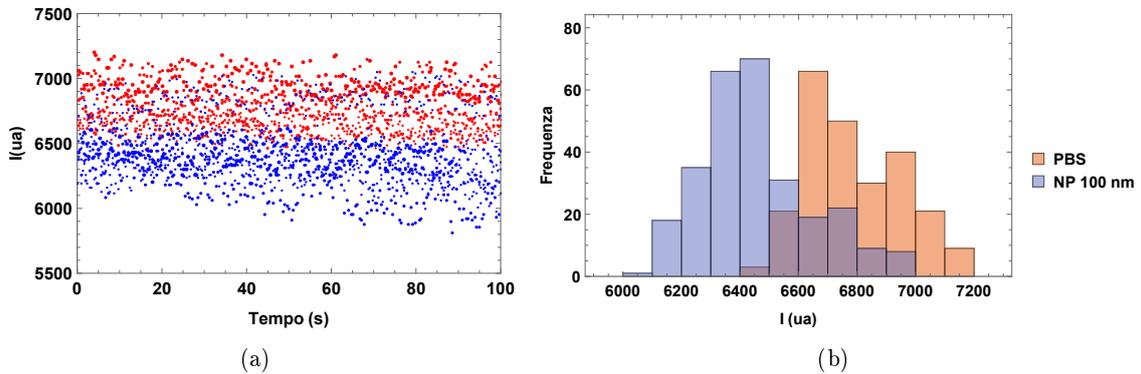


Figura 4.9: Misure in flusso con confronto tra PBS 0.1 mM e la soluzione contenente NP di 100 nm: in (a) plot a dispersione per i primi 100 s di misura, in (b) istogrammi delle acquisizioni per i primi 20 secondi.

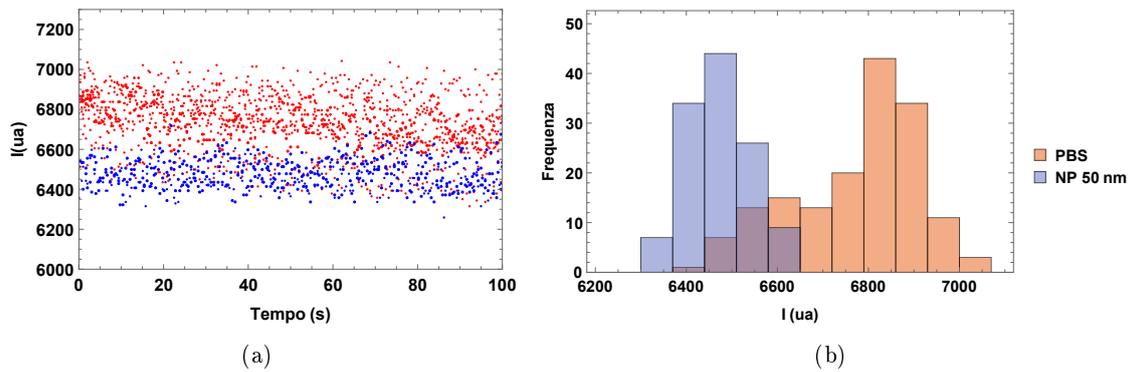


Figura 4.10: Misure in flusso con confronto tra PBS 0.1 mM e la soluzione contenente NP di 50 nm: in (a) plot a dispersione per i primi 100 s di misura, in (b) istogrammi delle acquisizioni per i primi 20 secondi.

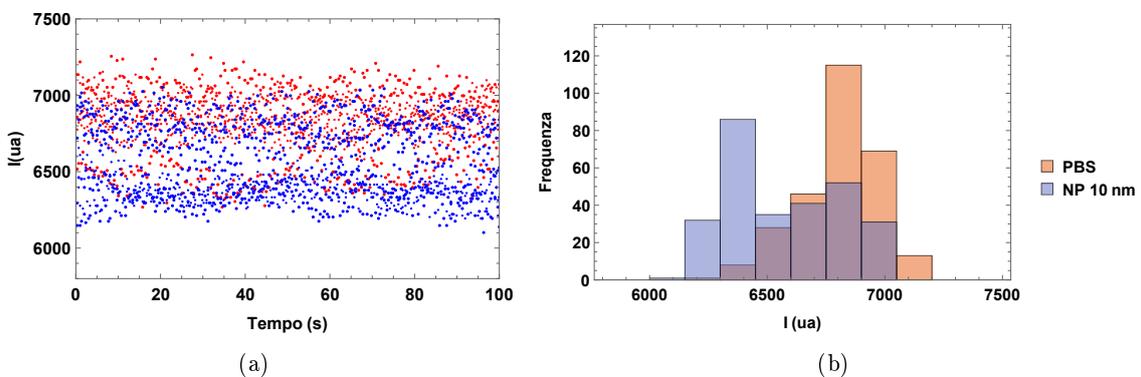


Figura 4.11: Misure in flusso con confronto tra PBS 0.1 mM e la soluzione contenente NP di 10 nm: in (a) plot a dispersione per i primi 100 s di misura, in (b) istogrammi delle acquisizioni per i primi 20 secondi.

A questo punto occorre stimare la sensibilità rispetto alle caratteristiche delle NP, ricordando però che per le soluzioni considerate sia il diametro che la concentrazione delle NP sono variabili (tabella 3.1). Non si possono pertanto trarre conclusioni dirette sui comportamenti in funzione del diametro o della densità numerica, poichè entrambi sono gradi di libertà.

A tal fine, si ricava per ogni sospensione una stima della modifica del segnale dovuto alla presenza di NP nel liquido, computando il rapporto tra valori medi totali delle misure con NP rispetto al solo PBS ($\bar{x}_{NP}/\bar{x}_{PBS}$) e associando ad esso l'errore ottenuto per propagazione: i risultati sono riassunti in tabella 4.3.

Tabella 4.3: Rapporto $\bar{x}_{NP}/\bar{x}_{PBS}$ del segnale medio del PBS 0.1 mM contenente NP e di quello del solo PBS per le misure flussate con le sospensioni di PBS contenenti NP di diversi diametri.

Diametro (nm)	$\bar{x}_{NP}/\bar{x}_{PBS}$
400 nm	1.02 ± 0.02
250 nm	0.94 ± 0.01
150 nm	0.92 ± 0.01
100 nm	0.95 ± 0.01
50 nm	0.96 ± 0.01
10 nm	0.95 ± 0.02

I valori dei rapporti $\bar{x}_{NP}/\bar{x}_{PBS}$ confermano una sensibilità ottima per le sospensioni con NP di 250 nm e 150 nm e, in seconda battuta, per i diametri 100 e 50 nm.

Come invece già si poteva notare in figura 4.6(b), si ha una sensibilità limitata per le NP di diametro 400 nm, che forniscono una stima del rapporto $\bar{x}_{NP}/\bar{x}_{PBS}$ compatibile con l'unità. Del resto, andando a vedere in tabella 4.2 gli errori quadratici medi σ_{PBS} e σ_{NP} delle misure associate, si osserva come le due popolazioni siano sovrapponibili. Appurata in precedenza (paragrafo 4.1.1) la precisione e l'accuratezza del procedimento di misura, si sono formulate due possibili spiegazioni:

- 1) il basso numero (~ 12) di NP intercettate dal fascio luminoso nel canale (tabella 3.1) non permette un'adeguata rilevazione della differenza rispetto al solo PBS,
- 2) le dimensioni delle NP di diametro 400 nm, confrontabili con quelle della guida ($\sim 3 \mu m$), producono effetti differenti rispetto a quelli dovuti alle altre taglie.

Per dirimere la questione, una verifica possibile, ad esempio, può essere la misura in flusso con una concentrazione maggiore di NP di diametro 400 nm, per osservare in tal caso se il rapporto di sensibilità $\bar{x}_{NP}/\bar{x}_{PBS}$ cresca (validando l'ipotesi 2) o cali (validando l'ipotesi 1). Purtroppo, con le soluzioni, gli apparati e le tempistiche a disposizione non è stato possibile svolgere questa misura.

Escludendo la soluzione con NP di diametro pari a 400 nm per le sue peculiarità, si osserva che tutte le soluzioni contenenti NP presentano rapporto di sensibilità $\bar{x}_{NP}/\bar{x}_{PBS}$ inferiore a 1 e incompatibile con l'unità al di fuori dell'errore statistico. Pertanto la presenza di NP nel liquido porta ad una diminuzione della luce raccolta rispetto al solo PBS. L'interpretazione che si può fornire di questo risultato è legata ovviamente alle proprietà ottiche delle NP, che in funzione delle loro dimensioni diffondono e assorbono luce: per NP

con raggi piccoli prevalgono gli effetti assorbitivi, mentre al crescere del loro diametro aumenta la quantità di luce diffusa. Se è piuttosto ovvio che l'assorbimento porti ad un calo dell'intensità trasmessa, più complesso è l'impatto dello *scattering*, dipendente dalla geometria di diffusione. Tuttavia, nella presente situazione, in cui un fluido monofase riempie del tutto il canale microfluidico, il liquido contenente NP ha caratteristiche disperdenti: si può pensare cioè che la luce diffusa dalle NP sia dispersa nel canale e non raggiunga più la guida di ricezione, portando ad una diminuzione del segnale luminoso. È per questo motivo quindi che si registra una trasmissione di luce inferiore per tutte le taglie considerate di NP nel liquido in flusso, sia per le più piccole (ove c'è maggiore assorbimento) sia per le più grandi (che diffondono maggiormente la luce nel canale).

La misura in flusso, oltre a presentare problematiche di deposito, non fornisce ulteriori informazioni su dimensioni e densità delle NP di Au acquistate. Nella sezione successiva si presentano le misure in goccia, cercando di comprendere se la particolare geometria della goccia consenta un *sensing* migliore in diametro e concentrazione per le soluzioni acquistate.

4.2 Misure in goccia

Le misure di trasmissione luminosa al passaggio di un treno di gocce nel canale microfluidico sono svolte mediante l'apparato sperimentale descritto nella sezione 3.3.2. In questo caso, il segnale acquisito dal fotodiodo è scandito nel tempo in modo riproducibile e periodico dal transito delle gocce (si riveda in merito la figura 3.16 nella sezione 3.3.4). La variazione in trasmissione indotta da una goccia è legata alla sua forma e composizione: lo studio che si presenta è finalizzato a comprendere come l'intensità raccolta cambi in funzione del diametro e della concentrazione delle nanoparticelle in sospensione nella goccia micrometrica.

Come già detto, le gocce sono prodotte in configurazione di T-junction (figura 3.6 nella sezione 3.3.2), utilizzando come fase continua esadecano (3% di surfattante) e come fase dispersa PBS 0.1 mM con o senza NP sospese di diametro variabile. Il controllo in pressione è ottenuto ponendo la pressione della fase continua P_C a 54.5 mbar e variando quella della fase dispersa P_D lungo tutto il range possibile per la produzione di gocce (sperimentalmente ca. $33 \div 47$ mbar), seguendo il protocollo sperimentale definito nella sezione 3.3.4 per assicurarsi di produrre gocce nell'intorno delle stesse condizioni. Ciò consente di studiare l'andamento della trasmissione luminosa in funzione della lunghezza delle gocce di un treno, interpolando i dati sperimentali con curve locali che permettano il confronto, a parità di lunghezza, tra gocce di contenuto diverso, stimando così l'impatto che la presenza di NP produce sull'intensità trasmessa dalla goccia. Infatti, come discusso nella sezione 3.3.4, non è praticabile cercare di riprodurre gocce identiche nello stesso modo e confrontarne direttamente i segnali con fasi disperse differenti.

Una migliore comprensione del perché non si usi un approccio a singole gocce si può avere osservando figura 4.12: in essa sono mostrati i segnali associati a due gocce di lunghezza simile con e senza NP di diametro 400 nm. Per avere un accostamento efficace, i segnali sono rinormalizzati in modo che la tensione dell'olio per entrambi sia allo stesso livello, rendendoli indipendenti dall'intensità del laser e dall'accoppiamento. Come si può vedere, un confronto diretto dei segnali non è affidabile in quanto per via delle fluttuazioni

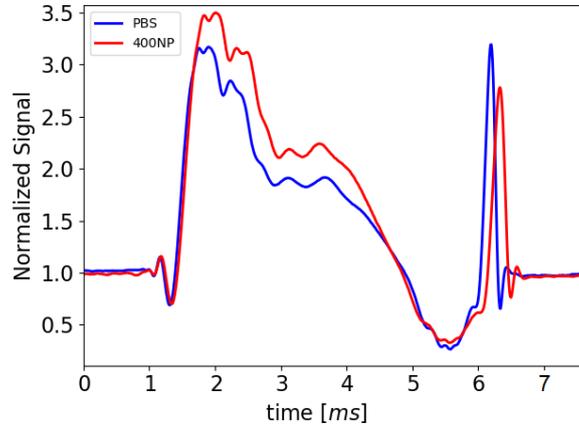


Figura 4.12: Confronto dei segnali nel tempo associati a due gocce di lunghezza simile per solo PBS e per PBS con NP sospese di diametro 400 nm. Per avere un confronto efficace, i segnali sono rinormalizzati in modo che la tensione dell'olio per entrambi sia allo stesso livello, rendendosi indipendenti dall'intensità del laser e dall'accoppiamento.

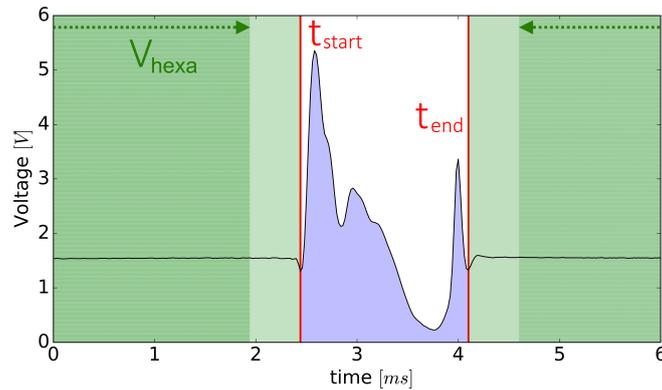


Figura 4.13: L'integrale del segnale associato al transito di una goccia è calcolato tra t_{start} e t_{end} corrispondenti al primo e all'ultimo minimo che si individuano nella variazione del segnale rispetto al voltaggio continuo dell'olio.

statistiche non si ottengono mai gocce lunghe esattamente uguali cambiandone unicamente il contenuto. Inoltre, per avere una stima quantitativa degli effetti delle NP con valenza statistica, un raffronto dei soli segnali per due gocce non è sufficiente: a tal fine occorre quindi considerare un set di più segnali di gocce appartenenti allo stesso treno ed estrapolare un parametro medio che esprima la loro trasmissione luminosa. Applicando l'approccio descritto, con questo parametro medio si può poi ottenere una curva in funzione della lunghezza delle gocce del treno e svolgere così i confronti al variare del contenuto della fase dispersa utilizzata.

Un buon parametro di raffronto deve esprimere l'intensità trasmessa da una goccia tenendo conto della variazione di intensità del laser e dell'accoppiamento tra il campione e le ottiche. Infatti, l'accoppiamento non è sempre riottenuto nelle medesime condizioni (dispersione massima stimata 6% al paragrafo 4.1.1) e nel tempo diminuisce portando ad un riscaldamento dei segnali in intensità ma non in forma. Questo parametro deve inoltre essere riproducibile e calcolabile per tutte le gocce del treno, per poterne ricavare un valore

medio da associare alle gocce di quella determinata lunghezza.

Il parametro scelto, che soddisfa tutti questi requisiti, è il valore medio del segnale dovuto al transito della goccia normalizzato sul voltaggio medio associato all'esadecano immediatamente prima e dopo la variazione del segnale. Con riferimento alla figura 4.13, ciò equivale a svolgere l'integrale del segnale compreso tra t_{start} e t_{end} , dividerlo per $t_{end} - t_{start}$ e normalizzarlo sul valor medio di V_{hexa} . In formule per una singola goccia risulta:

$$\bar{V}_{goccia} = \frac{I}{L(ms)} = \frac{1}{\bar{V}_{hexa} \cdot (t_{end} - t_{start})} \cdot \int_{t_{start}}^{t_{end}} V(t) \cdot dt \quad (4.1)$$

ove $L(ms) = t_{end} - t_{start}$ e I è l'integrale normalizzato. I tempi t_{start} e t_{end} corrispondono al primo e all'ultimo minimo che si individuano nella variazione del segnale rispetto al voltaggio continuo dell'olio, scelti per riproducibilità poichè sempre presenti in ogni tipologia di goccia. Normalizzare rispetto alla tensione dell'olio (come fatto anche in figura 4.12) rende invece indipendente il parametro da cambiamenti dell'intensità del laser e dell'accoppiamento. La media di questo parametro può essere calcolata su tutto il treno di gocce costituenti una singola misura, restituendone una stima statistica accurata.

Nei paragrafi successivi si presentano le misure svolte in goccia, studiando in dettaglio:

- gocce prodotte con le soluzioni acquistate di NP di Au di diametri 400, 250, 150, 100, 50 e 10 nm,
- gocce prodotte con le soluzioni diluite a densità numerica inferiore per NP di diametri 400, 250 e 150 nm, per valutare l'andamento al variare della concentrazione,
- un confronto a pari densità numerica per i diametri 150, 250 e 400 nm, per vedere il comportamento in funzione della dimensione.

Tutte le misure seguenti sono svolte in polarizzazione TE.

4.2.1 Soluzioni standard

In questa sezione si presenta lo studio delle gocce prodotte usando come fase dispersa le sospensioni di PBS 0.1 mM contenenti NP descritte nella sezione 3.3.3. Il metodo sperimentale scelto prevede sempre l'acquisizione di un set di misure ripetute di gocce con solo PBS 0.1 mM prima di effettuare le misure in goccia con una sospensione di NP. Un set completo di misure ripetute si ottiene variando P_D lungo tutto il range di pressioni possibili per produrre gocce, fissando $P_C = 54.5$ mbar. Si ottengono così due set di misure di PBS con e senza NP sospese, con il PBS senza NP che funge da *baseline* in analogia con quanto fatto nella sezione 4.1.2 per le misure in flusso.

Grazie agli accorgimenti esposti alla sezione 3.3.4, ogni singola misura con un dato treno di gocce (durata < 30 secondi) presenta alta riproducibilità nel segnale periodico rivelato dal fotodiode e indotto dal transito delle gocce. Come esposto in precedenza, i segnali ottenuti per ciascuna singola misura sono analizzati ricavando i valori medi di $\frac{I}{L(ms)}$ e $L(ms)$ su tutte le gocce del treno. Ogni misura individua pertanto un punto nel grafico $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ e un set completo di misure fornisce una curva in funzione di $L(ms)$ riproducibile ed associabile ad una data soluzione. Al riguardo in figura 4.14 si può vedere

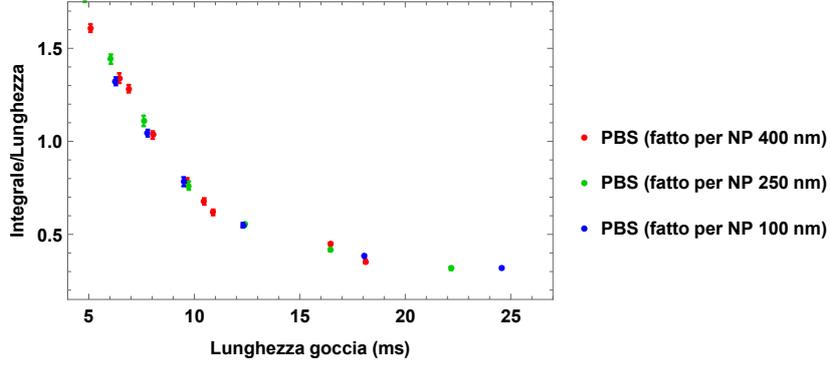


Figura 4.14: Riproducibilità della curva $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ del PBS senza NP: 3 acquisizioni effettuate in giorni differenti come *baseline* per le misure in goccia con NP di diametro 400, 250 e 100 nm.

la riproducibilità della curva $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ per 3 acquisizioni di PBS senza NP, effettuate in giorni differenti come *baseline* per le misure in goccia con NP di 400, 250 e 100 nm.

Utilizzando quindi un approccio fenomenologico, nel presente lavoro di tesi si è investigata la possibilità di riprodurre localmente gli andamenti dei dati sperimentali $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ mediante funzioni di interpolazione in intervalli limitati di applicabilità, in modo da poter svolgere con esse un confronto tra gocce della stessa lunghezza. In figure 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19 e 4.20 si mostrano i grafici $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ per le gocce di PBS con e senza NP a confronto per rispettivamente diametri 400, 250, 150, 100, 50 e 10 nm, affiancando per ogni diametro i grafici in scala lineare (a) e logaritmica in entrambi gli assi (b).

Valutando quindi la distribuzione dei dati nei grafici, in tutti i plot logaritmici nelle regioni di lunghezze al di sotto di 20 ms si può osservare un andamento ad intervalli locali lineare: ciò ci permette di considerare dei fit all'interno di questi intervalli con funzioni a potenza $y = ax^b$, che in scala logaritmica si riportano a delle rette. In termini dei parametri scelti le funzioni locali prese in considerazione sono esprimibili come:

$$\frac{I}{L(ms)} = a \cdot L^b(ms) \quad (4.2)$$

che riscritta in scala logaritmica risulta infatti:

$$\ln[I/L(ms)] = b \cdot \ln[a] + b \cdot \ln[L(ms)] \quad (4.3)$$

A questo punto si svolge un ragionamento puramente empirico sull'impatto che le NP hanno sulla trasmissione luminosa della goccia, al fine di ricavarne una stima quantitativa semplice basandosi esclusivamente sull'interpretazione diretta dei dati sperimentali. Nei plot logaritmici si può osservare come negli intervalli con comportamento locale lineare le curve $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ per il PBS con e senza NP mostrino andamenti paralleli, differenziandosi così solo per un fattore di scala locale legato all'intervallo. Come si può vedere anche osservando l'immagine di figura 4.12, è ragionevole pensare che l'influenza delle NP si possa tradurre, per gocce in un intorno di lunghezze, in un rapporto di scala che trasli localmente la curva del PBS di una certa quantità, poichè si fornisce una maggiore o minore trasmissione alla goccia.

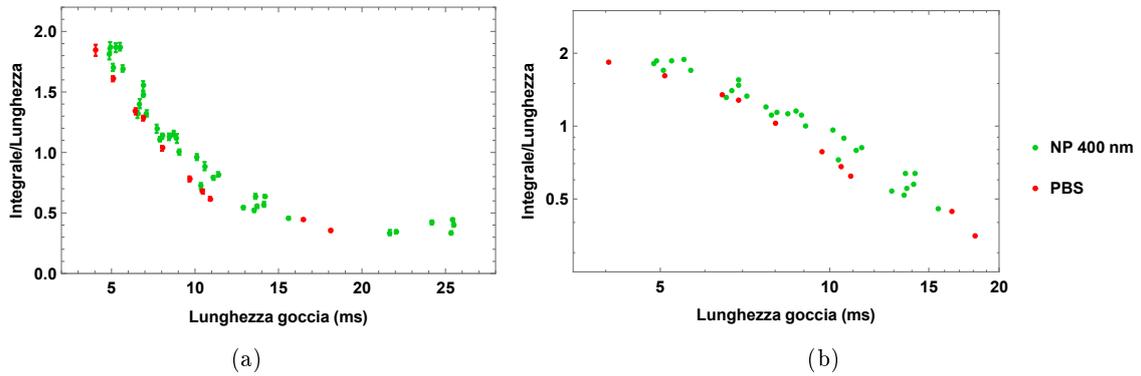


Figura 4.15: Gocce con PBS 0.1 mM con e senza NP di diametro 400 nm: grafico $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ in scala lineare (a) e logaritmica in entrambi gli assi (b).

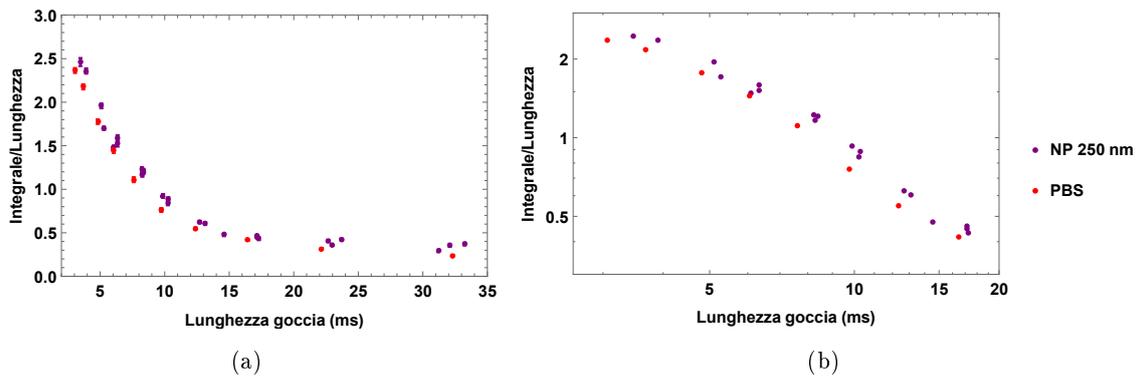


Figura 4.16: Gocce con PBS 0.1 mM con e senza NP di diametro 250 nm: grafico $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ in scala lineare (a) e logaritmica in entrambi gli assi (b).

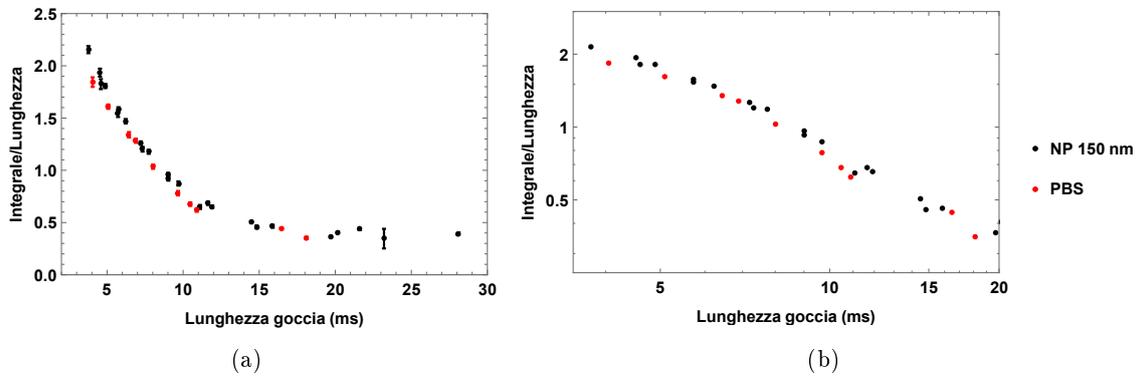


Figura 4.17: Gocce con PBS 0.1 mM con e senza NP di diametro 150 nm: grafico $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ in scala lineare (a) e logaritmica in entrambi gli assi (b).

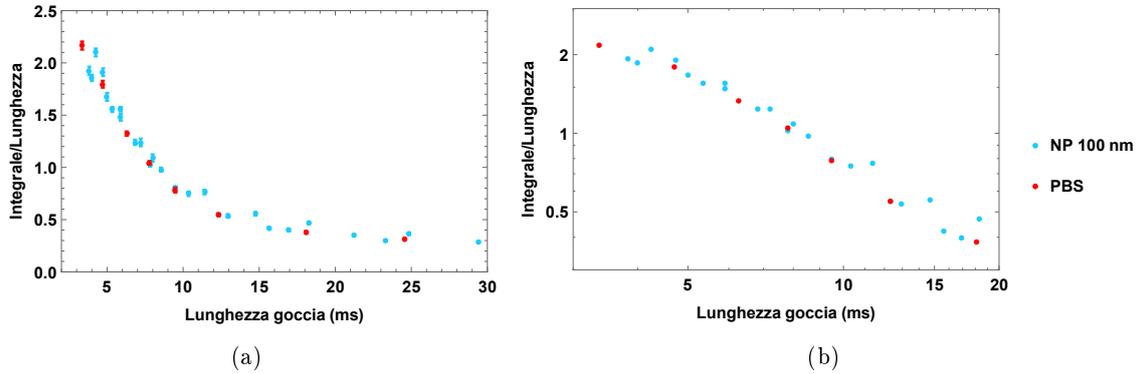


Figura 4.18: Gocce con PBS 0.1 mM con e senza NP di diametro 100 nm: grafico $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ in scala lineare (a) e logaritmica in entrambi gli assi (b).

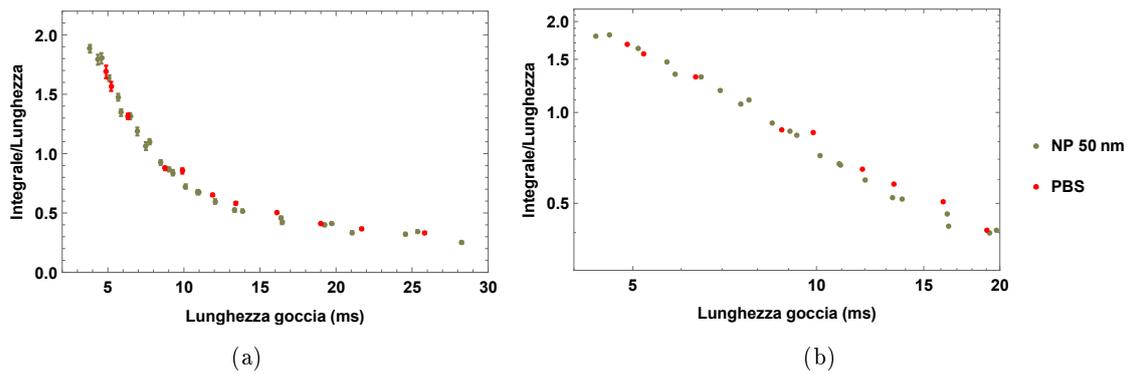


Figura 4.19: Gocce con PBS 0.1 mM con e senza NP di diametro 50 nm: grafico $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ in scala lineare (a) e logaritmica in entrambi gli assi (b).

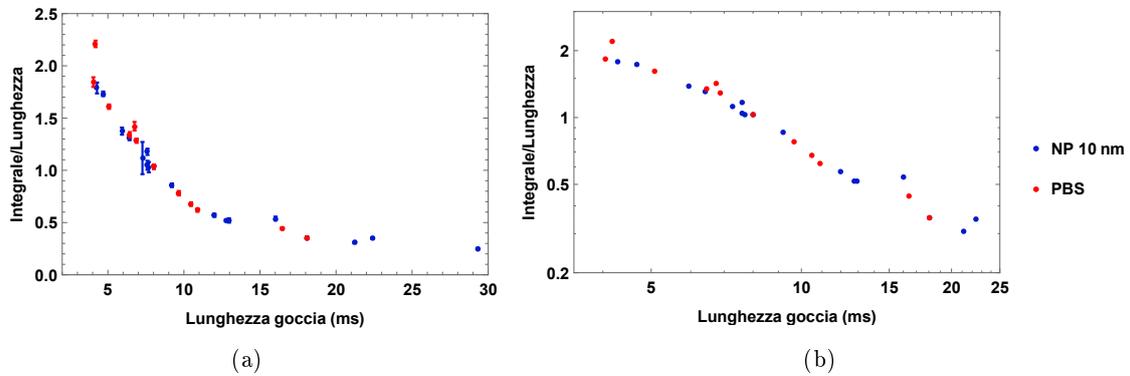


Figura 4.20: Gocce con PBS 0.1 mM con e senza NP di diametro 10 nm: grafico $\frac{I}{L(ms)}$ vs $L(ms)$ in scala lineare (a) e logaritmica in entrambi gli assi (b).

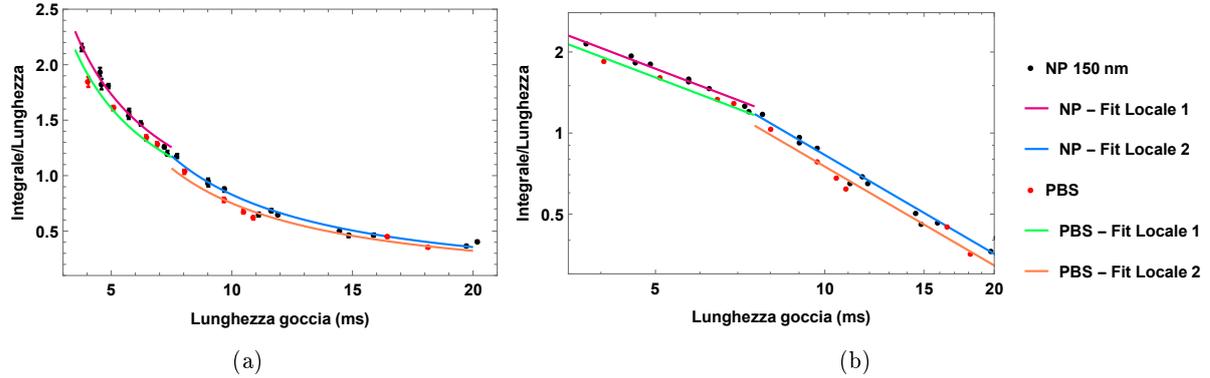


Figura 4.21: Gocce con PBS 0.1 mM con e senza NP di diametro 150 nm: fit locali $\frac{I}{L(ms)}$ su $L(ms)$ in scala lineare (a) e logaritmica in entrambi gli assi (b).

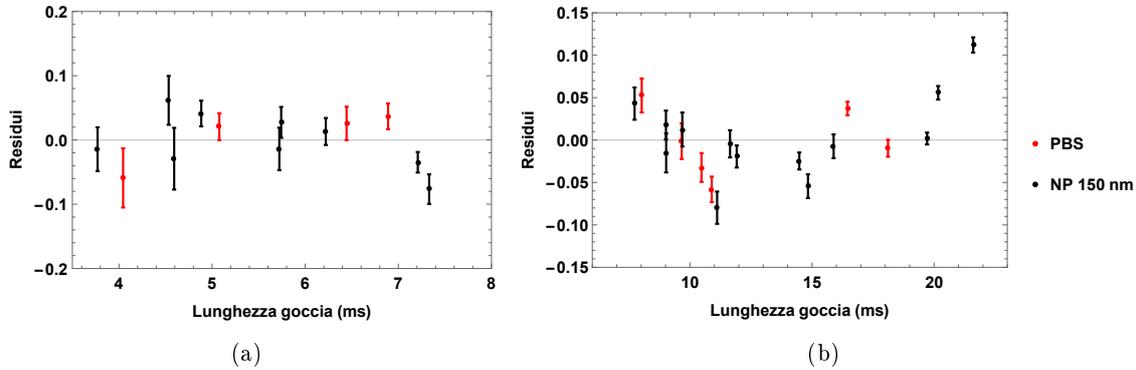


Figura 4.22: Residui dei fit locali $\frac{I}{L(ms)}$ su $L(ms)$ per gocce con PBS 0.1 mM con e senza NP di diametro 150 nm: fit locale 1 (a) e 2 (b)

Pertanto, sulla base di questa osservazione e per come si configura la funzione locale di fit in (4.3), una volta individuato un intervallo nei grafici logaritmici in cui l'andamento è localmente lineare, si può considerare il parametro b come il coefficiente angolare di due rette parallele, una per il PBS puro e l'altra per le NP, mentre il termine a è un fattore di scala dipendente dal contenuto della goccia stessa.

In questi termini, nella descrizione empirica locale delle curve che si sta svolgendo, i due coefficienti assumono ruoli diversi e ben specifici per le due curve in un dato intervallo con lo stesso andamento lineare:

- b racchiude tutta la dipendenza dalla lunghezza ed è uguale sia per la curva locale del solo PBS sia per quella del PBS con NP,
- a è il termine di scala dipendente dal contenuto della goccia, in questo caso dal diametro D e dalla densità numerica ρ_N delle NP, ed è diverso per il PBS puro (a_{PBS}) e per la sospensione di NP ($a_{NP}(D, \rho_N)$).

Conseguentemente, l'analisi dati che si svolge sulle curve dei grafici 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19 e 4.20 consiste in:

- 1) individuare degli intervalli nel plot logaritmico entro cui gli andamenti delle due curve di PBS con e senza NP risultano rettilinei e paralleli,
- 2) effettuare un fit usando l'espressione (4.2) su tutti i punti dell'intervallo preso, per gocce di PBS sia con che senza NP, per ricavare il parametro b ,
- 3) svolgere nell'intervallo preso due fit distinti per NP e PBS usando la funzione (4.2), con il parametro b fissato al punto 2) e unici parametri variabili $a_{NP}(D, \rho_N)$ e a_{PBS} ,
- 4) calcolare il rapporto tra le due curve nell'intervallo preso, facendo semplicemente il quoziente dei fattori di scala $a_{NP}(D, \rho_N)$ e a_{PBS} .

Poichè tutte le curve differiscono localmente solo per i fattori di scala locali a , gli intervalli di lunghezze individuati al punto 1) sono simili per tutte le sospensioni: infatti si osservano due intervalli con andamento lineare, uno per $L(ms) \gtrsim 8 - 9 ms$ e l'altro per $L(ms) \lesssim 8 - 9 ms$. In figura 4.21 si mostrano per la sospensione di diametro 150 nm le funzioni locali di fit per il PBS e le NP, che, come si può vedere, riproducono bene i dati sperimentali. In figura 4.22 invece si mostrano i grafici con i residui dei fit locali con b fisso per trovare a , che presentano andamento equamente distribuito.

Tuttavia, per svolgere il confronto a parità di lunghezza, si devono individuare degli intorno fissati di lunghezze a cui associare i rapporti ottenuti con i coefficienti a delle relative curve locali. A tal fine, si scelgono due tipologie di gocce per il confronto riportate in tabella 4.4: una è di forma quasi sferica (denotata come A), l'altra di lunghezza superiore a due volte il canale (denotata B). Le gocce vengono definite in base ad un intorno di lunghezze in ms e convertite in μm grazie al fit di tabella 3.17(a), sezione 3.3.4.

Tabella 4.4: Tipologie di gocce per il confronto a parità di lunghezza: A è di forma quasi sferica, B è di lunghezza superiore a due volte il canale. Le gocce sono definite in base ad un intorno di lunghezze in ms e convertite in μm grazie al fit di tabella 3.2. $L(\mu m)/w$ esprime la lunghezza normalizzata sulla larghezza del canale, $w \sim 200 \mu m$.

Tipologia	$L(ms)$	$L(\mu m)$	$L(\mu m)/w$
A	4 – 6 ms	200 – 270 μm	$\sim 1 - 1.35$
B	14 – 16 ms	450 – 480 μm	$\sim 2.25 - 2.4$

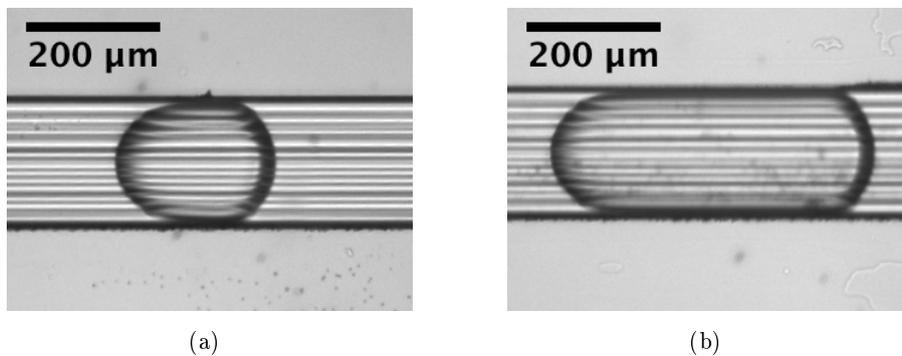


Figura 4.23: Immagini nel canale microfluidico delle due tipologie di gocce considerate: A (a), di forma quasi sferica (200-270 μm), e B (b), di lunghezza superiore a due volte il canale (450-480 μm).

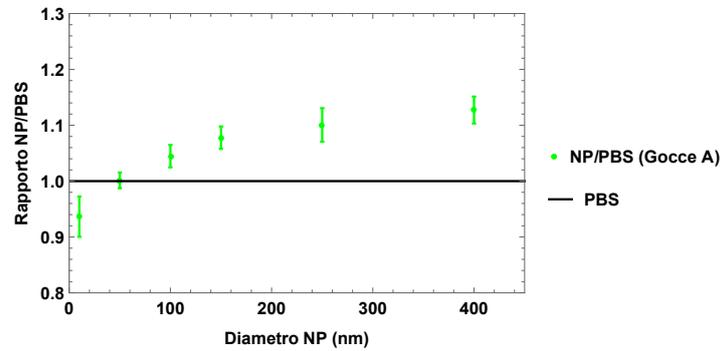
Di conseguenza, effettuati i rapporti tra i fattori di scala $a_{NP}(D, \rho_N)$ e a_{PBS} , si definisce come parametro che esprime l'impatto delle NP sulla trasmissione della goccia il rapporto:

$$\frac{NP}{PBS} = \frac{a_{NP}(D, \rho_N)}{a_{PBS}} \quad (4.4)$$

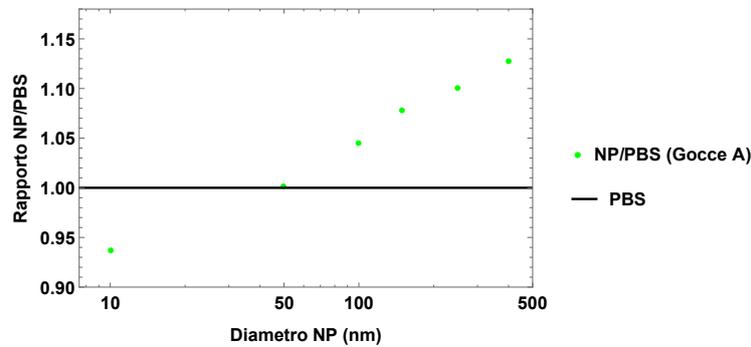
che si confronta per le tipologie di gocce A e B in tabella 4.5 in funzione dei diametri e delle concentrazioni delle soluzioni acquistate (tabella 3.1). In figure 4.24 e 4.25 invece si riportano per entrambe le tipologie di gocce il grafico in funzione del solo diametro.

Tabella 4.5: Rapporti $\frac{NP}{PBS}$ per le tipologie di gocce A e B ottenuti come quozienti dei coefficienti di scala $a_{NP}(D, \rho_N)$ e a_{PBS} delle funzioni locali di fit per le sospensioni con NP e il PBS puro.

D (nm)	ρ_N (NP/mL)	NP/PBS (Gocce A)	NP/PBS (Gocce B)
400 nm	$1.9 \cdot 10^8$ NP/mL	1.13 ± 0.02	1.18 ± 0.03
250 nm	$7.1 \cdot 10^8$ NP/mL	1.10 ± 0.03	1.13 ± 0.03
150 nm	$3.6 \cdot 10^9$ NP/mL	1.08 ± 0.02	1.10 ± 0.03
100 nm	$3.8 \cdot 10^9$ NP/mL	1.04 ± 0.02	1.04 ± 0.04
50 nm	$3.5 \cdot 10^{10}$ NP/mL	1.00 ± 0.01	0.94 ± 0.01
10 nm	$6.0 \cdot 10^{12}$ NP/mL	0.94 ± 0.04	0.97 ± 0.03



(a)



(b)

Figura 4.24: Rapporti di scala NP/PBS per gocce di tipo A in scala lineare (a) e con scala logaritmica solo sull'asse delle ascisse (b).

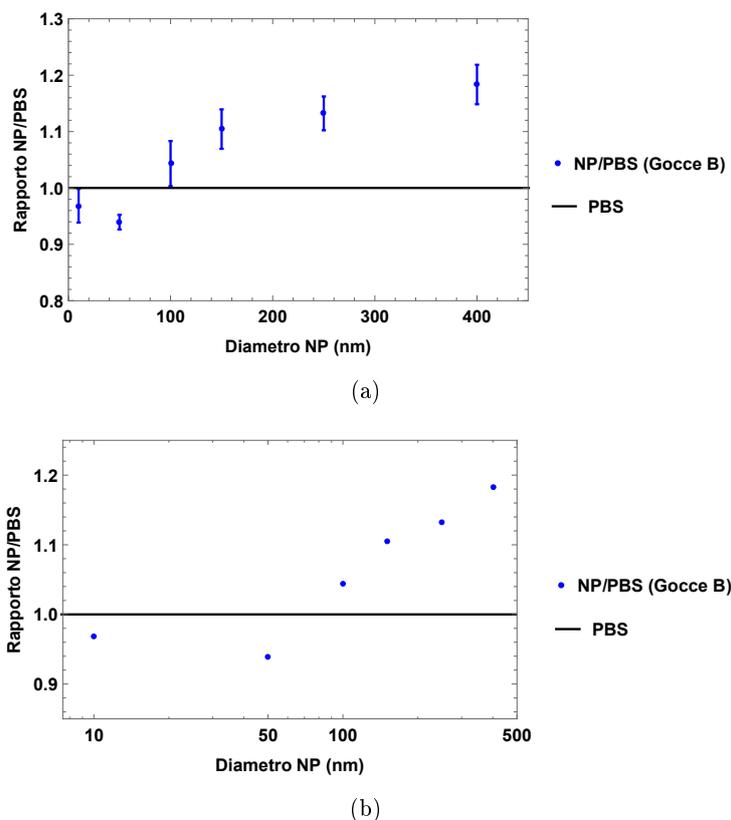


Figura 4.25: Rapporti di scala NP/PBS per gocce di tipo B in scala lineare (a) e con scala logaritmica solo sull'asse delle ascisse (b).

Non si possono svolgere considerazioni quantitative sulla base di questi grafici, poiché oltre al diametro anche la densità numerica ρ_N costituisce un grado di libertà: nelle prossime due sezioni si presenta infatti uno studio a diametro o densità fissati. Tuttavia, dal punto di vista fenomenologico, i grafici ci forniscono delle informazioni interessanti su quali siano gli effetti che le NP producono sulla trasmissione in goccia, soprattutto se si pongono a confronto con i risultati delle misure in flusso (tabella 4.3).

Le misure in goccia infatti presentano una maggiore sensibilità in funzione del raggio rispetto alle misure in flusso: questo è inevitabilmente dovuto alla diversa geometria di illuminazione e rivelazione. In particolare, i risultati in flusso fornivano valori al variare del diametro e della densità non troppo dissimili tra di loro e inferiori all'unità. In quelle misure si evidenziava una maggiore dispersione della luce da parte del fluido con nanoparticelle tale da causare una diminuzione della trasmissione luminosa della goccia.

In queste misure invece si osserva un comportamento completamente differente. La maggior parte dei rapporti è superiore all'unità e questo implica un incremento della trasmittività da parte delle NP. Si osserva inoltre un trend di evidente crescita del rapporto NP/PBS con il diametro, ma questo aspetto non ha dirette implicazioni quantitative poiché anche ρ_N varia. Tuttavia un confronto diretto lo si può fare rispetto alle misure in flusso: empiricamente si può constatare come le discrepanze tra i rapporti in flusso e in goccia tendano a crescere con il raggio. Una possibile spiegazione di questo fenomeno si può trovare nella geometria differente di illuminazione e rivelazione dovuta al confinamen-

to delle NP all'interno di una goccia. Questa geometria infatti influenza il modo in cui la luce scatterata dalle NP viene diffusa nel canale: si può pensare cioè che la luce diffusa in questo caso non sia dispersa del tutto nel canale, come in precedenza nelle misure in flusso, ma che venga convogliata maggiormente nella guida di luce di uscita proprio grazie alla geometria della goccia, portando, nei casi con rapporto superiore all'unità, ad un incremento del segnale rispetto al PBS. Due conferme in tal senso sono:

- la crescita dello scostamento in funzione del diametro tra le misure in flusso e in goccia: la luce scatterata infatti è maggiore per diametri più grandi,
- per i diametri più piccoli (50 e 10 nm), ove la luce diffusa è inferiore rispetto a quelli più grandi, non c'è effetto amplificante e il rapporto di impatto delle NP risulta inferiore all'unità o al più compatibile con essa.

4.2.2 Variazione in forma

Osservando la tabella 4.5 non si possono trarre conclusioni risolutive sull'influenza della forma della goccia sulla sua trasmissione luminosa in presenza di NP. La statistica a disposizione infatti non è sufficientemente alta. Almeno qualitativamente, però, si può vedere come per le NP più grandi il rapporto NP/PBS sia maggiore per la tipologia di goccia B rispetto ad A. Una possibile spiegazione di questo fatto può essere il maggior numero di NP presenti nella goccia, che, partecipando al fenomeno di reindirizzamento della luce diffusa, producono una trasmissione maggiore.

Per ottenere una variazione in forma più netta e acquisire più statistica, occorrerebbe studiare anche altri regimi di pressioni, fissando ad esempio la pressione della fase continua a livelli più alti ed effettuando confronti a parità di lunghezza, per indagare il ruolo della velocità. Questo non è stato svolto giacché esulava dagli scopi della presente tesi.

4.2.3 Variazione in densità

Per ottenere l'andamento della trasmissione luminosa della goccia in funzione delle caratteristiche delle NP, occorre variare la densità numerica delle sospensioni acquistate in modo da poter confrontare i rapporti NP/PBS in funzione di uno solo dei due gradi di libertà in gioco: il diametro D o la densità numerica ρ_N . In questa sezione si presenta il confronto al variare di ρ_N e a parità di diametro D delle NP. Le soluzioni considerate hanno NP di diametro 400, 250 e 150 nm: queste soluzioni sono state scelte per il loro alto rapporto NP/PBS nelle misure in goccia, ricavato nella sezione 4.2.1 (tabella 4.5), che facilita lo studio al diminuire della loro concentrazione.

Si sono quindi diluite le sospensioni di PBS 0.1 mM con NP di diametro 400, 250 e 150 nm con l'aggiunta di altro PBS 0.1 mM mediante una micropipetta, ottenendo altre tre sospensioni per ogni diametro. Per le misure con queste soluzioni si è proceduto come con le soluzioni non diluite, acquisendo set completi di misure di PBS con e senza NP della sospensione considerata, ottenendo successivamente mediante fit locali a potenza i rapporti di impatto delle NP sulla trasmissione della goccia.

I risultati ottenuti in funzione delle densità numeriche e del numero approssimato di NP nel semicono di illuminazione, sono riportate per le due tipologie di gocce A e B nelle tabelle 4.6, 4.7 e 4.8 e nelle figure 4.26, 4.27 e 4.28 per i diametri 400, 250 e 150 nm.

Tabella 4.6: Rapporti $\frac{NP}{PBS}$ ottenuti per le sospensioni con NP 400 nm con variazione in densità per le tipologie di gocce A e B.

D (nm)	ρ_N (NP/mL)	n° NP illuminate	NP/PBS (Gocce A)	NP/PBS (Gocce B)
400 nm	$1.9 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 12	1.13 ± 0.02	1.18 ± 0.03
400 nm	$9.5 \cdot 10^7$ NP/mL	~ 6	0.89 ± 0.05	0.86 ± 0.02
400 nm	$6.3 \cdot 10^7$ NP/mL	~ 4	0.88 ± 0.03	0.88 ± 0.01
400 nm	$4.8 \cdot 10^7$ NP/mL	~ 3	0.93 ± 0.02	0.93 ± 0.01

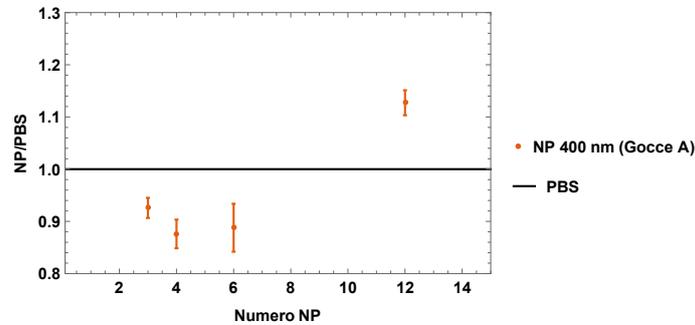
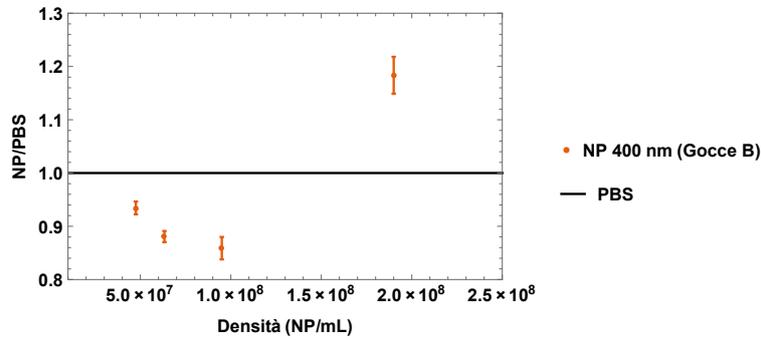
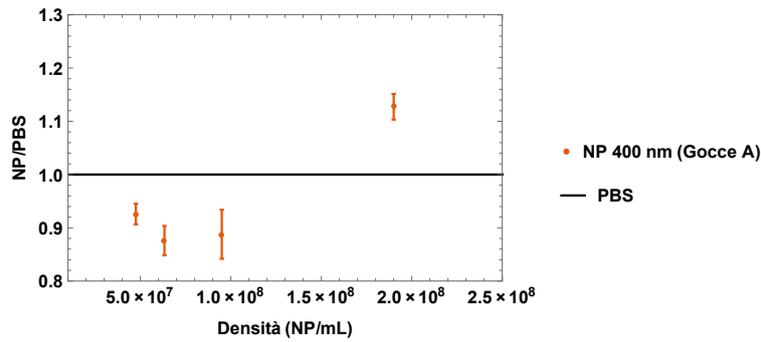


Figura 4.26: Rapporti $\frac{NP}{PBS}$ per le sospensioni con NP 400 nm in funzione della densità per le tipologie di gocce A (a) e B (b) e del numero di NP illuminate per la tipologia A (c).

Tabella 4.7: Rapporti $\frac{NP}{PBS}$ ottenuti per le sospensioni con NP 250 nm con variazione in densità per le tipologie di gocce A e B.

D (nm)	ρ_N (NP/mL)	n° NP illuminate	NP/PBS (Gocce A)	NP/PBS (Gocce B)
250 nm	$7.1 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 45	1.10 ± 0.02	1.13 ± 0.03
250 nm	$3.6 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 22	0.99 ± 0.03	1.01 ± 0.03
250 nm	$2.4 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 15	0.89 ± 0.01	0.93 ± 0.02
250 nm	$1.8 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 11	0.83 ± 0.02	0.86 ± 0.02

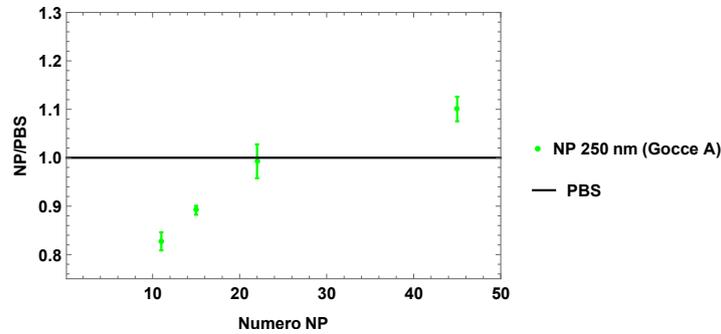
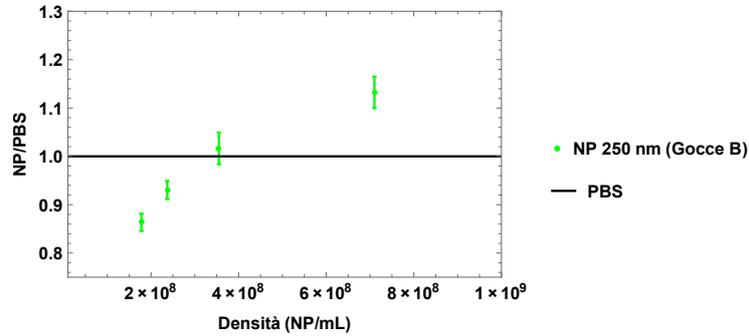
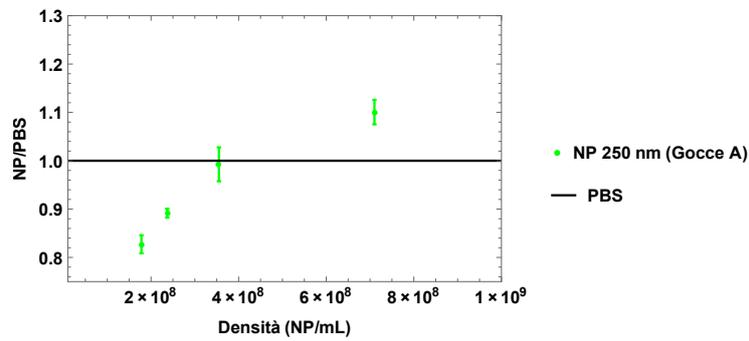
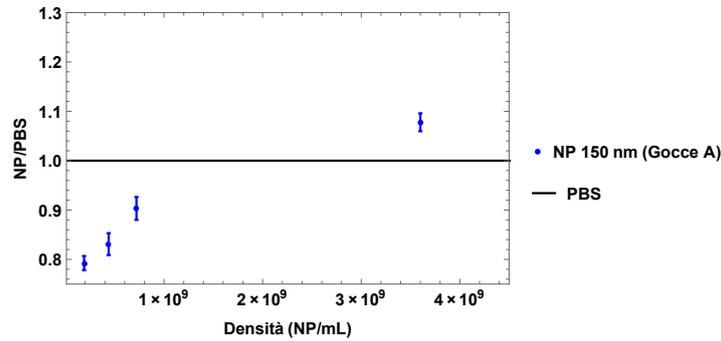


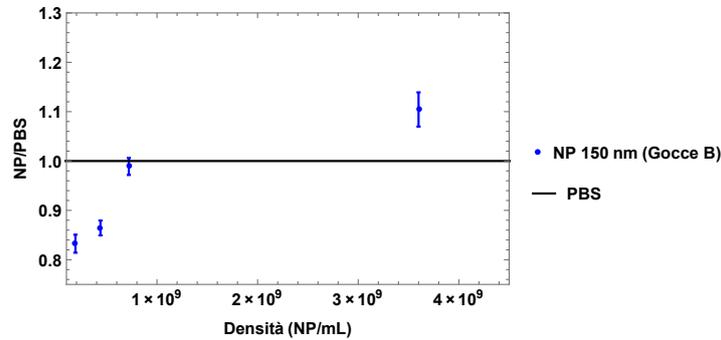
Figura 4.27: Rapporti $\frac{NP}{PBS}$ per le sospensioni con NP 250 nm in funzione della densità per le tipologie di gocce A (a) e B (b) e del numero di NP illuminate per la tipologia A (c).

Tabella 4.8: Rapporti $\frac{NP}{PBS}$ ottenuti per le sospensioni con NP 150 nm con variazione in densità per le tipologie di gocce A e B.

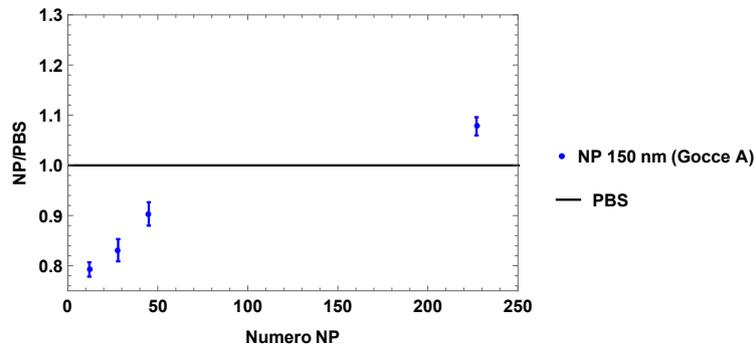
D (nm)	ρ_N (NP/mL)	n° NP illuminate	NP/PBS (Gocce A)	NP/PBS (Gocce B)
150 nm	$3.6 \cdot 10^9$ NP/mL	~ 230	1.08 ± 0.02	1.10 ± 0.03
150 nm	$7.2 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 45	0.90 ± 0.02	0.99 ± 0.02
150 nm	$4.4 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 28	0.83 ± 0.02	0.86 ± 0.02
150 nm	$1.9 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 12	0.79 ± 0.01	0.83 ± 0.02



(a)

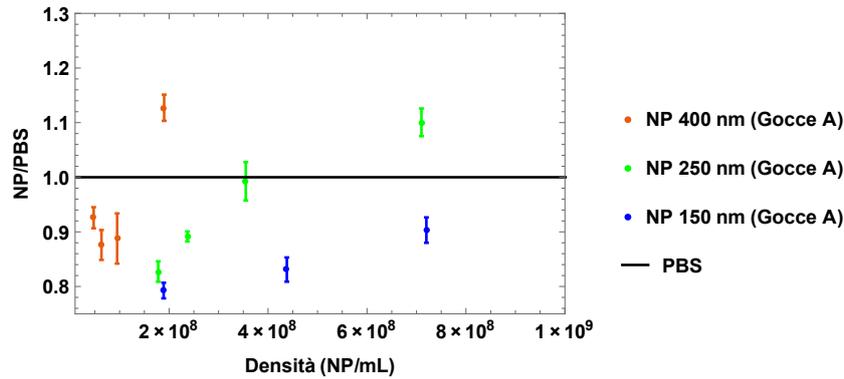


(b)

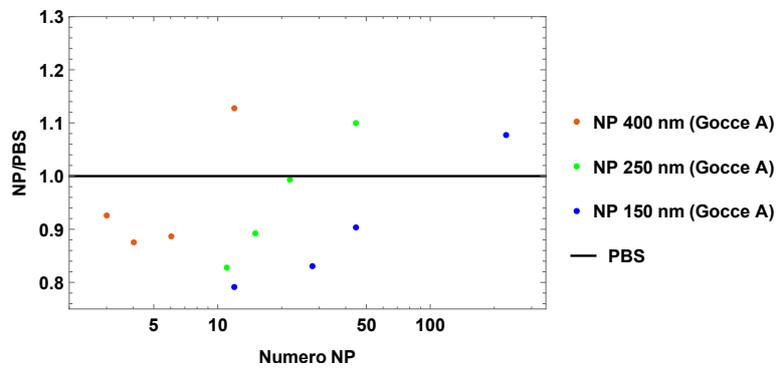


(c)

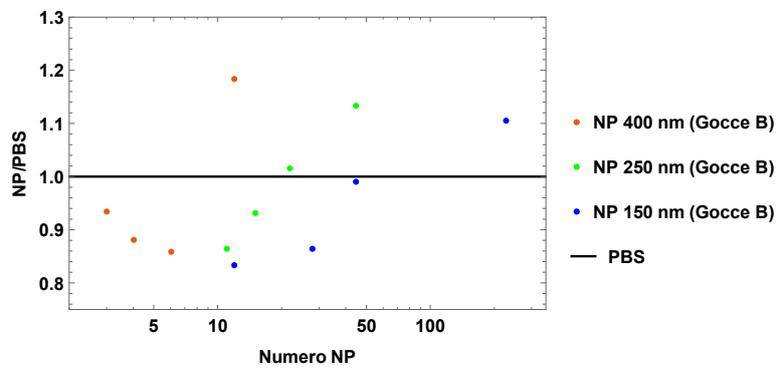
Figura 4.28: Rapporti $\frac{NP}{PBS}$ per le sospensioni con NP 150 nm in funzione della densità per le tipologie di gocce A (a) e B (b) e del numero di NP illuminate per la tipologia A (c).



(a)



(b)



(c)

Figura 4.29: Rapporti $\frac{NP}{PBS}$ per le sospensioni con NP 400, 250 e 150 nm viste insieme in funzione della densità in scala lineare per le tipologie di gocce A (a) e del numero di NP illuminate, con scala logaritmica solo sull'asse delle ascisse, per le tipologie A (b) e B (c).

In figure 4.29(b) e 4.29(c) si riportano invece il rapporto NP/PBS in funzione del numero di NP illuminate nella goccia con scala logaritmica solo sull'asse delle ascisse. Questi grafici, rispetto a quelli in funzione della densità, risultano più chiari per fornire un'interpretazione fenomenologica dell'impatto delle NP sulla trasmissione della goccia al variare del loro numero (o della loro concentrazione numerica, i due termini differiscono solo per il volume di illuminazione).

Infatti, come si può osservare in figura 4.26 per le NP di diametro 400 nm, l'andamento tende all'unità avvicinandosi a densità e numeri di NP illuminate molto bassi ($n^\circ \text{ NP} \sim 3-4$): ciò in effetti è coerente con l'attesa, in quanto poche NP inducono una piccola variazione rispetto al puro PBS. Contrariamente a quanto visto però nella sezione 4.2.1, in questa zona del grafico 4.26 il rapporto NP/PBS è inferiore a uno anche per delle NP di diametro grande come 400 nm, con un loro aumento da 3 a 4 che restituisce una diminuzione del rapporto misurabile.

Tuttavia, quando il numero di NP illuminate aumenta (figure 4.26, 4.27 e 4.28), per tutti i diametri il rapporto di impatto evidenzia un cambio di tendenza, diventando crescente con il numero al punto che, oltre una certa densità di NP, si ottiene un effetto di incremento del segnale rispetto al PBS, con rapporto di impatto maggiore di uno. Questo andamento crescente del rapporto è ben evidenziato nei grafici relativi alle sospensioni con diametri 250 e 150 nm (figure 4.27 e 4.28), ove però il numero di NP considerato è sempre maggiore o uguale a 11 unità: in essi quindi non si prende in considerazione la regione a densità numeriche molto basse in cui poche nanoparticelle, come mostrato in figura 4.26, presentano un comportamento più disperdente. In particolare, dall'osservazione delle figure 4.29(b) e 4.29(c) per i punti relativi alle NP di 250 e 150 nm, si può vedere come, per un numero di NP sufficientemente alto, il rapporto di impatto in funzione del numero di NP illuminate sia monotono crescente e potrebbe presentare un andamento di carattere logaritmico che andrebbe ulteriormente indagato e confermato.

Riassumendo quanto visto, si può desumere dai dati sperimentali che:

- l'andamento di NP/PBS per ρ_N molto basse mostra che la dispersione della luce dovuta alle poche NP presenti nella goccia determina un calo della trasmissione rispetto al PBS,
- per un numero di NP illuminate prossimo all'unità l'aggiunta di altre NP sembra portare ad una diminuzione ulteriore della trasmissione finché non si raggiunge una sorta di numero critico oltre il quale cambia l'andamento,
- per un numero di NP illuminate sufficientemente alto, l'aggiunta di altre NP determina una crescita del rapporto di impatto NP/PBS, inizialmente inferiore all'unità e poi, oltre un certo numero di NP dipendente dal diametro, superiore a uno con un incremento del segnale rispetto al PBS.

Con queste osservazioni, si potrebbero interpretare i dati sperimentali ipotizzando che a densità molto basse poche NP disperdano la luce incidente, deviandola maggiormente dalla guida di ricezione e determinando un'intensità raccolta inferiore. Quando però il numero di NP illuminate è abbastanza elevato, si innescherebbe un fenomeno diverso, legato anche alla geometria della goccia, tale da portare ad un maggiore indirizzamento della luce diffusa verso la guida di ricezione, facendo crescere il rapporto di impatto con il numero di NP illuminate e quindi con la quantità di luce diffusa all'interno della goccia.

4.2.4 Variazione in diametro

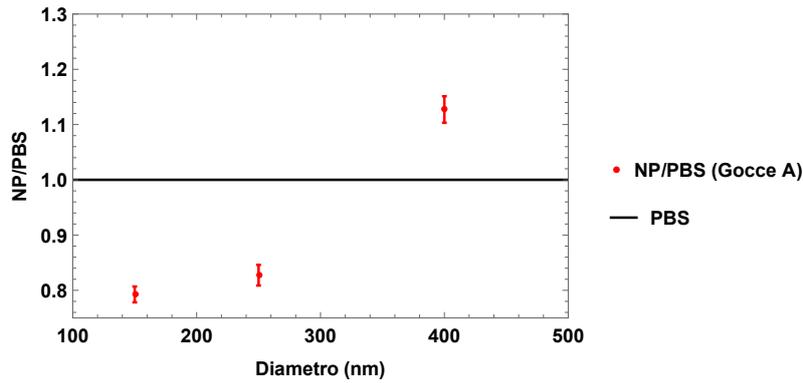
L'ultima analisi che si presenta riguarda il confronto in funzione del diametro per una densità costante di NP nella goccia. Usando una micropipetta, si sono diluite con del PBS

puro 0.1 mM le sospensioni acquistate di PBS contenenti NP di diametri 150 e 250 nm per ottenere una densità pari a quella nominale della sospensione con NP di 400 nm. Si osserva comunque che la diluizione non restituisce densità esattamente identiche.

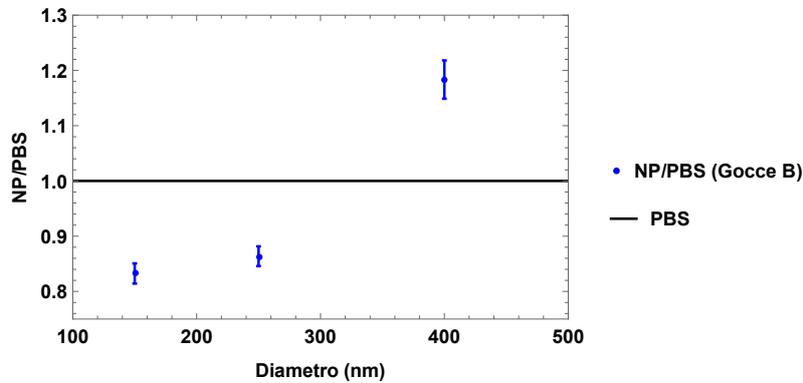
Per le misure e l'analisi si applicano le stesse procedure descritte in precedenza. In tabella 4.9 si riportano, in funzione del diametro e della densità numerica precisa, i rapporti NP/PBS ottenuti per le sospensioni considerate con pari densità numerica $\rho_N \sim 1.9 \cdot 10^8$ NP/mL. In figura 4.30 invece si mostra il rapporto NP/PBS in funzione del diametro per entrambe le tipologie di gocce A e B prese in analisi in questa tesi.

Tabella 4.9: Rapporti $\frac{NP}{PBS}$ ottenuti per le sospensioni con NP 150, 250 e 400 nm con pari densità numerica $\rho_N \sim 1.9 \cdot 10^8$ NP/mL.

D (nm)	ρ_N (NP/mL)	n° NP illuminate	NP/PBS (Gocce A)	NP/PBS (Gocce B)
400 nm	$1.9 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 12	1.13 ± 0.02	1.18 ± 0.03
250 nm	$1.8 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 11	0.83 ± 0.02	0.86 ± 0.02
150 nm	$1.9 \cdot 10^8$ NP/mL	~ 12	0.79 ± 0.01	0.83 ± 0.02



(a)



(b)

Figura 4.30: Rapporti NP/PBS in funzione del diametro con densità fissata $\rho_N \sim 1.9 \cdot 10^8$ NP/mL per le tipologie di gocce A (a) e B (b) considerate in questa tesi.

Come si può vedere, solo per il diametro 400 nm si entra in regime di incremento del segnale: per un numero di NP illuminate pari a 11-12 non si riesce quindi a superare l'unità con NP di diametro 150 e 250 nm. Inoltre, il rapporto NP/PBS, a parità di densità, mostra una tendenza di crescita con il diametro delle NP in sospensione nella goccia. Seguendo le interpretazioni fornite precedentemente, la possibile spiegazione di questo fenomeno si può ricercare nel legame diretto (per numeri di NP sufficientemente alti) tra il rapporto di impatto e la potenza di *scattering* delle NP, che è funzione crescente del loro diametro in accordo con i risultati della teoria di Mie [47]: per questo motivo diametri maggiori diffondono una quantità maggiore di luce nella goccia, portando ad un incremento del rapporto NP/PBS.

Capitolo 5

Conclusioni

In questa tesi, si è studiato l'utilizzo di un dispositivo opto-microfluidico in Niobato di Litio per la rivelazione di nanoparticelle d'Oro all'interno di una goccia micrometrica. Lo scopo principale del presente lavoro è stato comprendere come nanoparticelle d'Oro confinate entro una goccia interagiscono con un fascio luminoso, studiando il segnale di intensità trasmessa in funzione del diametro e della concentrazione delle NP nella sospensione.

Nella prima parte della tesi, si è presentato in dettaglio il processo di fabbricazione del dispositivo, caratterizzandone la qualità nei vari passaggi. Il risultato più importante di questa analisi è stata la stima della precisione della fotolitografia nella realizzazione di un array di strisce di photoresist rimosse (sezione 2.2.1). Il valore medio in larghezza delle strisce è risultato compatibile con la larghezza nominale di $3 \mu m$ delle strisce della maschera UV utilizzata, con una dispersione pari a $\sigma = 0.3 \mu m$.

L'utilizzo di sospensioni contenenti NP di Au in un chip microfluidico presenta alcune problematiche che sono state trattate in dettaglio nelle sezioni 3.3.3 e 3.3.4: per ovviare ad esse, si è definito un protocollo sperimentale di misura che ha assicurato l'ottenimento di misure statisticamente valide, spostando per le misure in goccia l'attenzione dal confronto a singole gocce ad uno sulle curve, in funzione della lunghezza, di parametri ottenibili direttamente dalle misure. Con l'apparato sperimentale in dotazione quindi si sono effettuate due tipologie di misure: con flusso monofase o con treno di gocce nel canale.

Le misure in flusso (sezione 4.1.2) con sospensioni di NP in PBS 0.1 mM di diversi diametri e concentrazioni hanno evidenziato una diminuzione della trasmissione di luce da parte del liquido nel canale. Si è fornita una spiegazione in merito richiamando la teoria di Mie e le proprietà ottiche delle NP, che assorbono e diffondono luce in quantità differenti in base alla loro dimensione e alla lunghezza d'onda incidente. In una geometria come quella del canale microfluidico con flusso monofase, i dati sperimentali mostrano che il fluido con NP disperde maggiormente la luce, portando ad intensità rilevate inferiori rispetto al PBS privo di NP.

Le misure in goccia (sezione 4.2) rispetto a quelle in flusso hanno evidenziato risultati nettamente differenti. Per estrapolare le stime dei rapporti di impatto che la presenza di NP comporta sulla trasmissione, si sono studiate le curve, in funzione della lunghezza, del segnale medio di intensità trasmessa associato alle gocce. In questo modo, si sono evidenziati in intervalli limitati dei comportamenti approssimabili come leggi di potenza con dei termini di scala locali dipendenti dal contenuto della goccia, ovvero dal diametro e dalla

densità delle NP ivi sospese. A parità di sospensione, il rapporto NP/PBS così determinato mostra una differenza rispetto alle misure in flusso che risulta tendenzialmente crescente con il diametro. In particolare, le misure in goccia presentano per i diametri maggiori un incremento del segnale medio associato alle gocce quando vi sono NP in sospensione, con un rapporto di impatto ottenuto superiore all'unità. L'interpretazione che si propone per questi risultati è che la geometria differente offerta dalla misura in goccia influenza il modo in cui la luce scatterata dalle NP viene diffusa nel canale. Si può pensare cioè che la luce diffusa in questo caso non sia dispersa del tutto nel canale, come in precedenza nelle misure in flusso, ma che venga convogliata maggiormente verso la guida di luce di uscita proprio grazie alla geometria della goccia, portando, nei casi con rapporto superiore all'unità, ad un incremento del segnale rispetto al PBS. Tuttavia, un confronto efficace e quantitativo dei rapporti di impatto non può prescindere dal fissare il diametro o la densità numerica delle nanoparticelle racchiuse all'interno delle gocce.

Si sono variate pertanto le sospensioni di PBS con NP di diametro 400, 250 e 150 nm, diluendole in concentrazioni più basse e svolgendo uno studio in funzione della densità a diametro fissato. Ciò ha portato all'osservazione di fenomeni molto interessanti, che consentono una migliore comprensione del modo con cui le NP confinate in una goccia interagiscono con il fascio luminoso. A tal fine, è risultato molto più esplicativo considerare il numero medio di NP illuminate dalla guida d'ingresso anziché la densità numerica. Nelle misure con diametro 400 nm, numeri di NP illuminate prossimi a uno ($n^\circ \sim 3-4$) presentano rapporti di impatto inferiori all'unità con un andamento che si desume essere decrescente con l'aggiunta di poche singole NP. Questo è coerente con l'attesa, in quanto asintoticamente per numero di NP tendente a uno il rapporto dovrebbe avvicinarsi all'unità. D'altro canto, si osserva come con circa 12 NP illuminate di diametro 400 nm si entri già in regime di incremento del segnale ($NP/PBS > 1$), cosa che sembra suggerire l'esistenza di un numero critico di NP oltre cui si avrebbe un cambio di comportamento rispetto all'aumento di NP. Infatti, le altre due taglie prese in considerazione, 250 e 150 nm, in cui non viene indagata la regione con numero prossimo all'unità, presentano un andamento monotono crescente con il numero di NP illuminate. Esse mostrano bene come all'aumentare della densità cresca anche il rapporto di impatto, inizialmente inferiore all'unità e poi, oltre un certo numero di NP dipendente dal loro diametro, superiore a uno, con incremento del segnale rispetto al PBS puro.

Per interpretare questi dati sperimentali, si è ipotizzato che a densità molto basse poche NP disperdano la luce incidente, deviandola maggiormente dalla guida di ricezione e determinando un'intensità raccolta inferiore. Solo quando il numero di NP illuminate è abbastanza elevato si innescherebbe un fenomeno diverso legato anche alla geometria della goccia, tale da portare ad un crescente indirizzamento della luce diffusa verso la guida di ricezione e ad un aumento del rapporto di impatto con il numero di NP illuminate e con la quantità di luce diffusa all'interno della goccia.

Infine, l'analisi svolta a parità di densità e al variare del diametro presenta un risultato crescente del rapporto NP/PBS in funzione del diametro, comportamento coerente con l'idea che, per un numero sufficiente di NP illuminate, il rapporto di impatto sia crescente con la quantità di luce diffusa all'interno di una goccia, poichè la sezione d'urto di *scattering* delle NP aumenta con il loro raggio in accordo con la teoria di Mie.

In conclusione, gli obiettivi della tesi sono stati pienamente raggiunti. In questo lavoro si è mostrato come un dispositivo opto-microfluidico possa essere utilizzato per analizzare particelle sub-micrometriche disperse in un fluido al variare della loro taglia. È stato predisposto un protocollo di misura affidabile e riproducibile, di cui sono stati anche messi in evidenza i limiti di rilevabilità e di sensibilità. Inoltre, si sono osservati per la prima volta interessanti fenomeni di interazione che coinvolgono nanoparticelle contenute in gocce disperse in un altro fluido. Questi fenomeni, che pongono le basi per lo sviluppo di nuove tecniche di rivelazione di nanoparticelle in diametro e concentrazione, saranno oggetto di futuri studi e approfondimenti.

Bibliografia

- [1] J. Choi, H. Song, et al. **Microfluidic assay-based optical measurement techniques for cell analysis: A review of recent progress.** *Biosens. Bioelectron.*, 77:227–236, 2016.
- [2] K.F. Lei. **Microfluidic Systems for Diagnostic Applications A Review.** *J. Lab. Autom.*, 17:330–347, 2012.
- [3] J.P. McMullen and K.F. Jensen. **Integrated microreactors for reaction automation: New approaches to reaction development.** *Ann. Rev. Anal. Chem.*, 3:19–42, 2010.
- [4] C. N. Baroud, F. Gallaire, and R. Dangla. **Dynamics of microfluidic droplets.** *Lab Chip, The Royal Society of Chemistry*, 10:2032–2045, 2010.
- [5] H. Song, D. Chen, and R. F. Ismagilov. **Reactions in droplets in microfluidic channels.** *Angew Chem Int Ed Engl*, 45(44):7336–56, 2006.
- [6] G. Bettella. **Integrated Opto-Microfluidic Lab-on-a-Chip in Lithium Niobate for Droplet Generation and Sensing.** PhD thesis, PhD School of Physics, University of Padova, 2016.
- [7] G. Bettella, G. Pozza, et al. **Integrated opto-microfluidics platforms in lithium niobate crystals for sensing applications.** *Proc. SPIE*, 9365:9365170–9365178, 2015.
- [8] G. Bettella, G. Pozza, S. Kroesen, R. Zamboni, et al. **Lithium Niobate Micromachining for the Fabrication of Microfluidic Droplet Generators.** *Micromachines*, 8:185, 2017.
- [9] R. S. Weis and T. K. Gaylord. **Lithium niobate: Summary of physical properties and crystal structure.** *Appl. Phys. A*, 37:191–203, 1985.
- [10] R. J. Holmes and D. M. Smyth. **Titanium diffusion into LiNbO₃ as a function of stoichiometry.** *Journal of Applied Physics*, 55:3531–3535, 1984.
- [11] M. Evander and J. Nilsson. **Acoustofluidics 20: Applications in acoustic trapping.** *Lab Chip, The Royal Society of Chemistry*, 12:4667–4676, 2012.
- [12] X. Du et al. **Surface acoustic wave induced streaming and pumping in 128° Y-cut LiNbO₃ for microfluidic applications.** *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 19, 2009.

- [13] J. Shi, X. Mao, D. Ahmed, et al. **Focusing microparticles in a microfluidic channel with standing surface acoustic waves (SSAW)**. *Lab Chip, The Royal Society of Chemistry*, 8:221–223, 2008.
- [14] W. J. Stark, P. R. Stoessel, W. Wohlleben, and A. Hafner. **Industrial applications of nanoparticles**. *Chem. Soc. Rev.*, 44:5793, 2015.
- [15] C. Fang, N. Bhattarai, C. Sun, and M. Zhang. **Functionalized Nanoparticles with Long-Term Stability in Biological Media**. *Small*, 5(14):1637–1641, 2009.
- [16] S. R. Ahmed, S. Oh, et al. **Synthesis of Gold Nanoparticles with Buffer-Dependent Variations of Size and Morphology in Biological Buffers**. *Nanoscale Research Letters*, pages 65–76, 2016.
- [17] G. Doria, J. Conde, B. Veigas, et al. **Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications**. *Sensors*, 12:1657–1687, 2012.
- [18] W. H. De Jong and P. J. Borm. **Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards**. *Int J Nanomedicine*, 3(2):133–149, 2008.
- [19] F. Tian, F. Bonnier, A. Casey, et al. **Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape**. *Analytical Methods*, 6:9116–9123, 2014.
- [20] P. Quaresma, I. Osório, G. Dória, et al. **Star-shaped magnetite and gold nanoparticles for protein magnetic separation and SERS detection**. *RSC Advance*, 4:3659–3667, 2014.
- [21] O. D. Hendrickson et al. **Methods of Detection and Identification of Manufactured Nanoparticles**. *MOLECULAR BIOPHYSICS*, 56(6):961–986, 2011.
- [22] K. Nassau, H.J. Levinstein, and G.M. Loiacono. **Photonic applications of lithium niobate crystals**. *J. Chem. Phys. Solids*, 27:983–988, 1966.
- [23] L. Arizmendi. **Photonic applications of lithium niobate crystals**. *phys. stat. sol. (a)*, 201(2):253–283, 2004.
- [24] E. L. Wooten et al. **A review of lithium niobate modulators for fiber-optic communications systems**. *Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 6:69–82, 2000.
- [25] O. Alibart et al. **Quantum photonics at telecom wavelengths based on lithium niobate waveguides**. *Journal of Optics*, 18, 2016.
- [26] A. Rauber. **Chemistry and physics of lithium niobate**. *Current topics in materials science*, 1:481–601, 1978.
- [27] T. Volk et al. **Lithium niobate: defects, photorefraction and ferroelectric switching**. *Springer Science and Business Media*, 115, 2008.

- [28] P. Lerner, C. Legras, and J. Dumas. **Stechiometrie des monocristaux de metaniobate de lithium.** *Journal of crystal Growth*, 3:231–235, 1968.
- [29] Qingkun Li et al. **First-principles study on the formation energies of intrinsic defects in LiNbO₃.** *Journal of Physics and Chemistry of Solids, Elsevier*, 68(7):1336–1340, 2007.
- [30] R. Bhatt, I. Bhaumik, et al. **Control of Intrinsic Defects in Lithium Niobate Single Crystal for Optoelectronic Applications.** *Crystals*, 7:23–43, 2017.
- [31] R. Zamboni. **Optofluidic application of a Mach-Zehnder interferometer integrated in lithium niobate for droplet sensing.** Master’s thesis, Department of Physics, University of Padova, 2017.
- [32] Yongfa Kong et al. **New doped lithium niobate crystal with high resistance to photorefraction—LiNbO₃:In.** *Appl. Phys. Lett.*, 66:280, 1995.
- [33] M. Wöhlecke, G. Corradi, and K. Betzler. **Optical methods to characterise the composition and homogeneity of lithium niobate single crystal.** *Applied physics B*, 63(4):323–330, 1996.
- [34] L. Garbellotto. **Integrated opto-microfluidic platform in LiNbO₃ crystal toward a new concept of miniaturized microphotometry.** Master’s thesis, Department of Physics, University of Padova, 2017.
- [35] W. Petasch, B. Kegel, H. Schmid, K. Lendenmann, and H.U. Keller. **Low-pressure plasma cleaning: a process for precision cleaning applications.** *Surface and Coatings Technology, Elsevier*, 97:176–181, 1997.
- [36] S. M. Langelier, L. Y. Yeoa, and J. Friend. **UV epoxy bonding for enhanced SAW transmission and microscale acoustofluidic integration.** *Lab Chip, The Royal Society of Chemistry*, 12:2970–2976, 2012.
- [37] G. F. Christopher and S. L. Anna. **Microfluidic methods for generating continuous droplet streams.** *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40:319–336, 2007.
- [38] A. D. Griffiths and D. S. Tawfik. **Miniaturising the laboratory in emulsion droplets.** *TRENDS in Biotechnology, Elsevier*, 24:395–402, 2006.
- [39] J. Bennès, S. Ballandras, and F. Chérioux. **Easy and versatile functionalization of lithium niobate wafers by hydrophobic trichlorosilanes.** *Applied Surface Science*, 255:1796–1800, 2008.
- [40] T. Manifar, A. Rezaee, M. Sheikhzadeh, and S. Mittler. **Formation of uniform self-assembly monolayers by choosing the right solvent: OTS on silicon wafer, a case study.** *Applied Surface Science*, 254:4611–4619, 2008.
- [41] M. E. McGovern, K. M. R. Kallury, and Michael Thompson. **Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane.** *Langmuir, American Chemical Society*, 10:3607–3614, 1994.

- [42] Bahaa E. A. Saleh. *Fundamentals of Photonics*. Wiley, 2001.
- [43] R. Hunsperger, A. Yariv, and A. Lee. **Parallel end-butt coupling for optical integrated circuits**. *Applied Optics*, 16(4):1026–1032, 1977.
- [44] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A. Stonec, and G. M. Whitesides. **Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up**. *Lab Chip, The Royal Society of Chemistry*, 6:437–446, 2006.
- [45] I. Freestone, N. Meeks, M. Sax, and C. Higgitt. **The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology**. *Gold Bulletin*, 40(4):270–277, 2007.
- [46] D. Thompson. **Michael Faraday’s recognition of ruby gold: the birth of modern nanotechnology**. *Gold Bulletin*, 40(4):267–269, 2007.
- [47] G. Mie. **Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions**. *Annalen der Physik*, 25:377–445, 1908.
- [48] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz. **The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment**. *J. Phys. Chem. B*, 107:668–677, 2003.
- [49] M. Quinten. *Optical Properties of Nanoparticle Systems: Mie and Beyond*. Wiley, 2011.
- [50] K. A. Pikal-Cleland et al. **Effect of Glycine on pH Changes and Protein Stability During Freeze–Thawing in Phosphate Buffer Systems**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(9):1969–1979, 2002.
- [51] A. Voller, D. Bidwell, G. Huldt, and E. Engvall. **A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria**. *Bull World Health Organ.*, 51(2):209–211, 1974.
- [52] M. Pineda et al. **Identification of a Membrane Protein, LAT-2, That Co-expresses with 4F2 Heavy Chain, an L-type Amino Acid Transport Activity with Broad Specificity for Small and Large Zwitterionic Amino Acids**. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(28):19738–19744, 1999.