



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Chimiche

Corso di Laurea in Scienza dei Materiali

Tesi di Laurea

**Sviluppo di un setup microfluidico
drop-on-demand per lo studio dell'accumulo di
particelle micrometriche**

Relatore

Dr. Davide Ferraro

Laureando

Marco Prevedello

Anno Accademico 2025/2026

Abstract

La microfluidica di gocce viene sempre più impiegata per manipolare particelle solide micrometriche in applicazioni bioanalitiche, quali saggi di agglutinazione e immunocattura. A differenza dei traccianti molecolari, che seguono fedelmente le linee di flusso, queste particelle risentono di effetti inerziali e gravitazionali e tendono ad accumularsi in prossimità dei punti di ristagno del campo di ricircolazione interno alla goccia, con un pattern fortemente dipendente dalla geometria del canale. Se il comportamento nei canali circolari e in quelli rettangolari con aspect ratio ben distinto da 1 è stato ampiamente caratterizzato in letteratura, il caso del canale a sezione quadrata resta a oggi inesplorato.

Questa tesi è stato quindi sviluppato e caratterizzato un setup microfluidico droplet-on-demand, che consente la generazione di gocce singole con controllo indipendente su volume e tempistica. La caratterizzazione ha confermato la dipendenza lineare attesa tra lunghezza della goccia, tempo di apertura della valvola e pressione dell'acqua ($R^2 > 0,97$). Il setup è stato poi usato per misurare, tramite microscopia ad alta velocità, i profili di accumulo di particelle in canali quadrati al variare della velocità della goccia (Ca tra $2,6 \times 10^{-4}$ e $4,15 \times 10^{-3}$) e dell'aspect ratio (2-8).

A differenza delle nuvole localizzate osservate nei canali circolari e rettangolari, si riscontra un gradiente di concentrazione continuo lungo l'intera goccia, dipendente in modo marcato dall'aspect ratio ma indipendente dalla velocità e da Ca , un comportamento che suggerisce una topologia dei vortici interni più complessa rispetto ai casi finora studiati in letteratura.

Indice

Abstract	i
1 Introduzione	1
1.1 Microfluidica	1
1.2 Microfluidica di gocce	2
1.3 Campi di moto	4
1.4 Accumulo di particelle	5
2 Caratterizzazione setup droplet-on-demand	9
2.1 Setup droplet-on-demand	9
2.2 Misura e presentazione dei risultati	10
3 Accumulo di particelle	13
3.1 Setup e procedura misure di accumulo	13
3.2 Presentazione dati	17
3.3 Confronto con la letteratura	21
4 Conclusioni	22
Bibliografia	23

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Microfluidica

La microfluidica è la branca della fluidodinamica che si occupa dello studio e della manipolazione di fluidi confinati a scale micrometriche, tipicamente con volumi compresi tra 10^{-9} e 10^{-18} litri [1,2]. A queste scale la dinamica dei flussi è profondamente diversa da quella osservata su scala macroscopica, a causa della dipendenza lineare dalle dimensioni caratteristiche del sistema di uno dei parametri fondamentali della fluidodinamica, il numero di Reynolds:

$$\text{Re} = \frac{\rho U L}{\mu} \quad (1.1)$$

dove ρ è la densità del fluido, U la sua velocità caratteristica, L una lunghezza caratteristica del sistema e μ la viscosità dinamica. Re esprime il rapporto tra i contributi inerziale e viscoso alla dinamica del flusso [1]. Alle scale tipiche dei dispositivi microfluidici, dell'ordine delle centinaia di micrometri, Re assume valori molto inferiori all'unità: la dinamica del sistema è quindi dominata dalle forze viscosi, e i flussi risultano laminari, privi di turbolenza, con linee di flusso parallele. Questa condizione contrasta nettamente con il regime turbolento tipico dei sistemi macroscopici, caratterizzato invece da vorticità e caoticità su più scale, Figura 1.1.

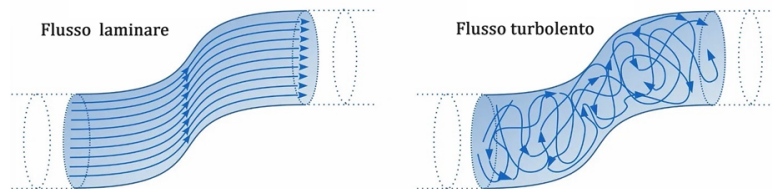


Figura 1.1: Schematizzazioni di flussi laminari e turbolenti all'interno di un condotto.

Una diretta conseguenza operativa di questo regime è che le soluzioni dell'equazione di Navier–Stokes, approssimata a bassi numeri di Reynolds nella forma dell'equazione di Stokes, risultano più semplici da trattare matematicamente e godono di simmetria temporale. Il flusso laminare rappresenta dunque una condizione ideale per lo studio e, soprattutto, per

il controllo del comportamento dei fluidi: le traiettorie delle particelle fluide possono essere predette e manipolate con grande precisione [1].

Dal punto di vista sperimentale, questa controllabilità viene sfruttata all'interno di dispositivi di dimensioni comprese tra i 10 e i 100 μm , costituiti da reti di microcanali collegati tra loro tramite giunzioni e comunicanti con l'esterno tramite capillari. La possibilità di realizzare canali larghi da poche centinaia di nanometri a poche centinaia di micrometri consente un controllo estremamente fine di volumi di fluido dell'ordine dei microlitri e picolitri. È in questo contesto che, negli ultimi decenni, si è affermato il concetto di "lab on a chip": dispositivi capaci di racchiudere al loro interno l'intera catena di operazioni necessarie allo svolgimento di uno o più processi sperimentali, grazie alla loro versatilità, compattezza e al basso costo di produzione [1].

1.2 Microfluidica di gocce

Uno degli ambiti applicativi più sviluppati della microfluidica è la microfluidica di gocce, che si occupa della generazione e della caratterizzazione di emulsioni, ossia sistemi composti da fluidi immiscibili (liquido-liquido o liquido-gas) dispersi l'uno nell'altro [1,3,4]. Sebbene un'emulsione possa essere prodotta anche con metodi rudimentali, come l'agitazione meccanica di due liquidi immiscibili, l'impiego di dispositivi microfluidici consente di generare direttamente emulsioni monodisperse, composte cioè da gocce di dimensioni pressoché identiche, con un controllo, una riproducibilità e un'efficienza di gran lunga superiori a quelli ottenibili con approcci classici [1]. Questa capacità ha reso la microfluidica di gocce un campo in rapido sviluppo, sfruttato in numerosi ambiti chimici, biologici e farmaceutici, poiché ciascuna goccia può essere trattata come un micro-reattore isolato e indipendente, all'interno del quale è possibile incapsulare e far reagire reagenti, molecole o particelle in volumi estremamente ridotti.

La generazione delle gocce avviene in corrispondenza di specifiche strutture del chip, dette giunzioni, dove la fase dispersa e la fase continua entrano in contatto. Esistono diverse geometrie di giunzione utilizzate a questo scopo; tra queste, una delle più diffuse per la sua semplicità costruttiva ed efficienza è la T-junction, Figura 1.2. In questa configurazione, un canale principale trasporta la fase continua, mentre un canale ad essa ortogonale immette la fase dispersa direttamente nel punto di incontro tra i due flussi [1]. La formazione della goccia è governata dall'azione combinata dello sforzo di taglio esercitato dalla fase continua sul volume di fase dispersa che penetra nel canale principale e del gradiente di pressione che si sviluppa in prossimità della giunzione.

A seconda del rapporto tra i flussi e delle viscosità delle due fasi, la produzione di gocce in una T-junction può avvenire secondo due regimi distinti [1,5]. Nel regime di dripping,

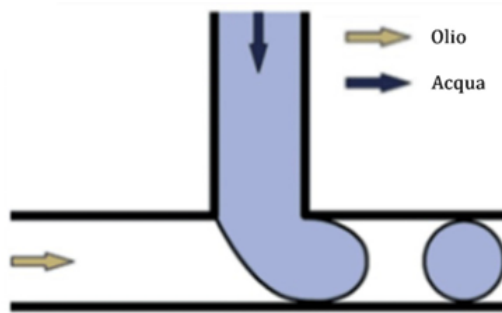


Figura 1.2: Schema di funzionamento di una T-junction.

tipico di capillary number relativamente elevati, la goccia si stacca prima di occupare l'intera sezione del canale principale, e il distacco è dominato dallo sforzo di taglio. Nel regime di squeezing, che caratterizza la maggior parte delle condizioni operative tipiche della microfluidica ($Ca \lesssim 10^{-2}$), la goccia in crescita arriva invece a bloccare quasi completamente la sezione del canale principale, costringendo la fase continua a scorrere attraverso sottili film residui tra la goccia e le pareti del canale; questo genera un accumulo di pressione a monte della goccia che ne “strozza” progressivamente il collo fino alla rottura [5].

Il limite di questi approcci passivi (come la T-junction), è che la dimensione delle gocce, la loro spaziatura e la loro velocità non si possono controllare in maniera indipendente [5]. Un approccio alternativo, detto droplet-on-demand (DOD), consiste invece nel produrre singole gocce di volume arbitrario, in istanti di emissione scelti a piacere, anziché come conseguenza automatica di un flusso continuo (Churski et al., 2009). Questo si ottiene interrompendo e ripristinando a comando il flusso della fase dispersa tramite un elemento di valvolaggio, che può basarsi su meccanismi molto diversi tra loro (elettrici, magnetici, capillari, termocapillari o puramente meccanici) [6].

Il vantaggio principale di un sistema DOD rispetto alla generazione continua è il controllo indipendente su ciascuna goccia prodotta: è possibile predisporre sequenze di gocce di volume, intervallo temporale e composizione chimica diversi tra loro, il tutto gestito e riprodotto in modo affidabile da computer [6]. Questa capacità rende il DOD uno strumento particolarmente utile per applicazioni che richiedono un controllo fine e riproducibile delle condizioni sperimentali goccia per goccia, come lo screening combinatorio di condizioni di reazione, la sintesi controllata di sequenze di reagenti diversi, o l'esecuzione di protocolli automatizzati di reazioni chimiche e biochimiche su piccoli volumi di campione (Churski et al., 2009). È proprio questa versatilità a motivare l'impiego di un setup droplet-on-demand nel presente lavoro di tesi.

1.3 Campi di moto

Un aspetto importante nel trasporto delle gocce, all'interno dei canali, è il campo di moto indotto dalla presenza dell'interfaccia immiscibile. Nella microfluidica monofase il flusso presenta un classico profilo di Poiseuille, con velocità massima sull'asse centrale del canale. In presenza di due fasi, una dispersa e una continua, il campo di moto viene invece alterato dal fatto che la goccia e la fase esterna non possono miscelarsi: le due fasi viaggiano a velocità diverse, poiché la goccia si muove a una velocità costante V_d , inferiore alla velocità massima raggiunta dalla fase esterna. Gli elementi di fluido che scorrono a una velocità superiore a V_d raggiungono quindi la goccia e sono costretti a cambiare direzione quando arrivano all'interfaccia; nel sistema di riferimento della goccia, questo si traduce nella comparsa di zone di ricircolo e di punti di ristagno, ovvero punti a velocità nulla, come mostrato in Figura 1.3 [7].

Lo stesso ragionamento vale anche per l'interno della goccia: sarebbe un errore pensare che il fluido al suo interno si muova uniformemente alla velocità V_d . La descrizione corretta è piuttosto quella di una goccia che rotola contro le pareti laterali del canale, come un nastro trasportatore [7]. Una schematizzazione qualitativa di questo campo di moto è fornita in Figura 1.3, per una situazione bidimensionale corrispondente a una sezione di un tubo circolare.

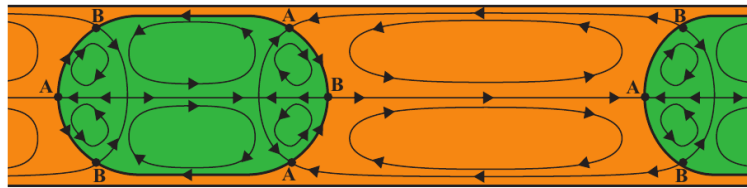


Figura 1.3: Topologia delle zone di ricircolo contro-rotanti indotte dalla presenza dell'interfaccia.

I campi di moto tridimensionali nei canali rettangolari presentano caratteristiche simili a quelle di Figura 1.3, ma con dinamiche più complesse in corrispondenza degli angoli del canale, dove la fase continua bypassa la goccia attraverso i cosiddetti gutter, Figura 1.4. Diversi studi hanno inoltre dimostrato una forte dipendenza di questi campi di moto dal numero capillare Ca e dall'aspect ratio del canale [7]. Ciò nonostante, l'idea di zone di ricircolo e punti di ristagno indotti dalla presenza di una goccia resta un concetto generale valido, con importanti implicazioni sul trasporto, sul mescolamento e sulla dispersione degli analiti nel flusso.

In termini di mescolamento, il trasporto della goccia migliora sempre l'omogeneizzazione dei reagenti disciolti in entrambe le fasi, rispetto al semplice flusso di Poiseuille monofase, grazie all'advezione trasversale che introduce. Questo mescolamento può tuttavia risultare inefficiente in alcune regioni della goccia, poiché le singole zone di ricircolo restano idrodinamicamente

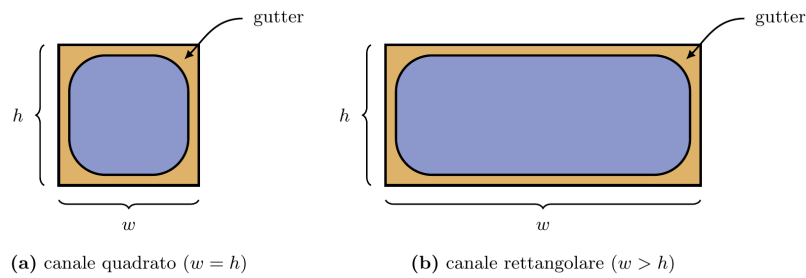


Figura 1.4: Schematizzazione della geometria dei gutters in canali rettangolari e quadrati.

isolate tra loro [7]. I punti di ristagno assumono un ruolo cruciale quando, invece di specie disciolte, si considerano particelle solide sospese nella goccia: come discusso nella Sezione successiva, la loro dinamica può portare a un vero e proprio accumulo locale, in netto contrasto con l'omogeneizzazione favorita dal mescolamento delle specie disciolte descritto sopra.

1.4 Accumulo di particelle

Oltre alla dispersione di specie molecolari o nanoparticellari, la microfluidica di gocce viene sempre più spesso impiegata per manipolare fasi solide di dimensioni micrometriche, quali cellule o particelle polimeriche e magnetiche, in un'ampia gamma di applicazioni bioanalitiche [8]. Le particelle magnetiche, in particolare, sono largamente utilizzate come supporto solido nell'estrazione in fase solida magnetica, per la cattura selettiva e la purificazione di acidi nucleici, proteine, piccole molecole e vescicole extracellulari, oltre che nei saggi di agglutinazione, in cui la formazione di aggregati particellari fornisce un'indicazione qualitativa o quantitativa della presenza di uno specifico analita [8].

A differenza dei traccianti molecolari o nanometrici, che seguono fedelmente le linee di flusso e vengono efficacemente omogeneizzati dalle ricircolazioni interne indotte dal moto della goccia, le particelle solide di dimensioni micrometriche risentono in modo non trascurabile di effetti inerziali e di sedimentazione gravitazionale. La loro traiettoria all'interno della goccia risulta quindi dal bilancio tra la sedimentazione e il trascinamento idrodinamico esercitato dal fluido circostante, e può discostarsi significativamente da quella di un semplice tracciante [8]. Diversi lavori in letteratura hanno documentato questo fenomeno: è stato osservato, ad esempio, l'accumulo di globuli rossi al retro di gocce allungate in capillari circolari, utile per la separazione di sangue e plasma [9], così come l'accumulo di particelle in specifiche regioni di gocce che scorrono in canali rettangolari, con un comportamento dipendente da dimensione, velocità della goccia e densità delle particelle [10]; altri studi hanno inoltre proposto una descrizione quantitativa del fenomeno tramite il parametro di Shields, un numero adimensionale che confronta le forze gravitazionali e quelle di trascinamento agenti sulle particelle [11]. Un elemento ricorrente in questi lavori è che le particelle tendono ad accumularsi

in prossimità dei punti di ristagno del pattern di ricircolazione interna, piuttosto che distribuirsi omogeneamente come farebbe un tracciante disciolto. Il modo specifico in cui questo accumulo si manifesta dipende in modo determinante dalla geometria della sezione del canale. Nei canali circolari la ricircolazione interna alla goccia è assialsimmetrica, e le particelle si accumulano in un'unica nuvola al retro della goccia, con un'intensità che aumenta all'aumentare del numero capillare Ca [8], Figura 1.5. Nei canali rettangolari, invece, la presenza dei gutter agli angoli della sezione rompe questa simmetria e genera un flusso vorticoso tridimensionale: le particelle si accumulano comunque al retro della goccia, ma suddivise in due nuvole distinte vicino alle pareti laterali, e la loro estensione diminuisce all'aumentare di Ca , Figura 1.6, un andamento opposto rispetto al caso circolare [8]. Tale inversione di tendenza è legata a un cambiamento della forma della goccia con Ca , che altera la geometria dei gutter e produce, oltre una soglia $Ca \approx 2 \times 10^{-3}$, un'inversione del verso del flusso al fronte della goccia [10].

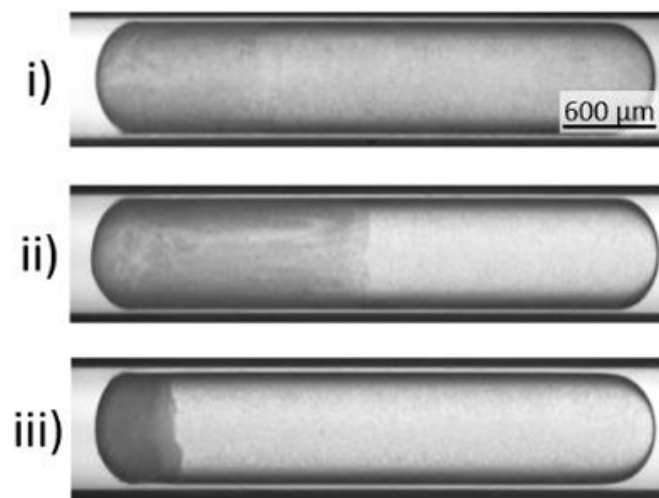


Figura 1.5: Accumulo in canali circolari per valori crescenti di Ca : i) 5×10^{-4} , ii) $2,3 \times 10^{-3}$, iii) $5,5 \times 10^{-3}$.

Questo comportamento ha conseguenze pratiche di segno opposto a seconda dell'applicazione considerata. Da un lato, l'accumulo locale delle particelle può risultare vantaggioso, ad esempio nei saggi di agglutinazione, dove favorisce l'aumento della concentrazione locale dell'analita. Dall'altro, esso costituisce una limitazione significativa nelle applicazioni di immunocattura, dove l'obiettivo è massimizzare la superficie di particella disponibile per il legame con il bersaglio molecolare: la formazione di zone di accumulo riduce infatti la frazione di superficie funzionalizzata effettivamente accessibile agli analiti [8]. Ne emerge un trade-off fondamentale, opposto a quanto avviene per le specie disciolte: se una maggiore velocità della goccia migliora il mescolamento della fase liquida e quindi l'omogeneizzazione dei reagenti molecolari, la stessa velocità favorisce contemporaneamente l'accumulo delle particelle solide, riducendo l'efficacia dei processi che dipendono dall'intera superficie particellare.

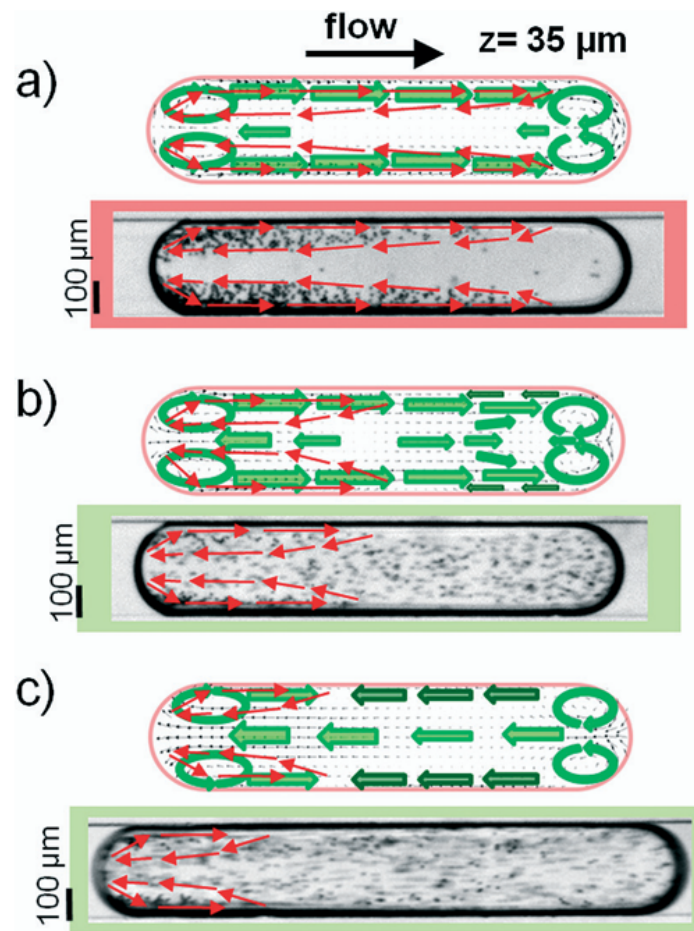


Figura 1.6: Accumulo in canali rettangolari per valori crescenti di Ca : a) $Ca = 0,7 \times 10^{-3}$, b) $Ca = 2,6 \times 10^{-3}$, c) $Ca = 5,5 \times 10^{-3}$.

Come l'accumulo dipenda dall'aspect ratio del canale rettangolare, ossia dal rapporto tra le due dimensioni della sua sezione, resta tuttavia una domanda sostanzialmente aperta in letteratura: gli studi condotti finora si concentrano su geometrie rettangolari con un rapporto larghezza/altezza fissato e ben distinto da 1 (ad esempio $300 \times 100 \mu\text{m}$) [10], lasciando inesplorato il caso particolare, e più simmetrico, del canale a sezione quadrata. Comprendere e prevedere come l'accumulo di particelle dipenda dai parametri controllabili del sistema come: velocità della goccia, aspect ratio della goccia (rapporto tra lunghezza e larghezza) e geometria del canale risulta quindi essenziale per l'ottimizzazione delle applicazioni bioanalitiche basate su particelle in microfluidica di gocce. È precisamente attorno a questo obiettivo che si sviluppa il presente lavoro di tesi, che si concentra sullo studio dell'accumulo di particelle in gocce che scorrono in canali a sezione quadrata (un caso finora non indagato sistematicamente in letteratura) al variare della velocità della goccia e del suo aspect ratio.

Capitolo 2

Caratterizzazione setup droplet-on-demand

2.1 Setup droplet-on-demand

Il setup microfluidico droplet-on-demand utilizzato in questo lavoro è composto da diverse componenti, il cui schema è riportato in Figura 2.1. Il chip microfluidico in PDMS, realizzato per softlitografia, presenta canali a sezione quadrata di lato 0,71 mm; il chip è sollevato e tenuto in posizione da un supporto da banco ottico: questo accorgimento permette di posizionare la telecamera per la misura delle gocce senza che il suo campo visivo venga ostruito dai tubi capillari, che si innestano nel chip dalla parte inferiore e ne collegano le diverse componenti.

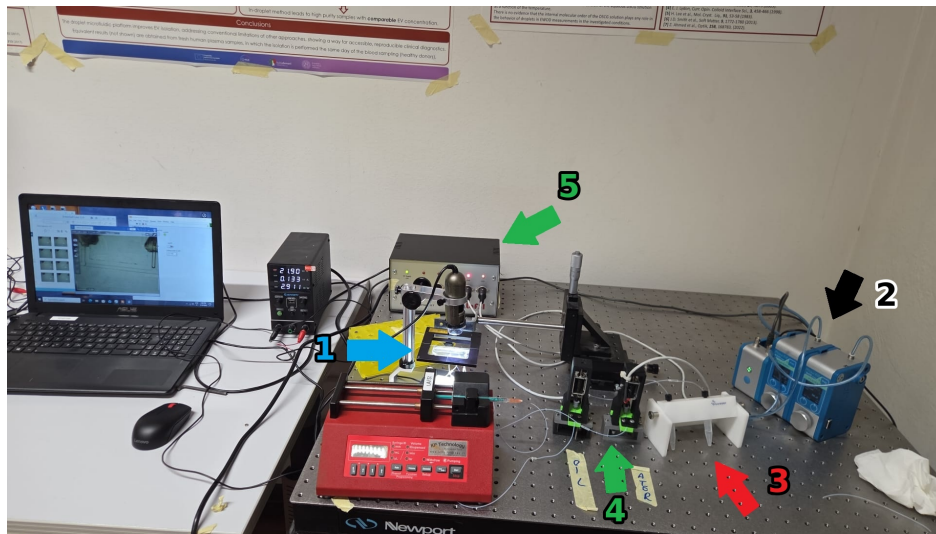


Figura 2.1: Fotografia del setup droplet-on-demand: 1) chip microfluidico, 2) controllori di pressione, 3) provette serbatoio di acqua e olio, 4) pinch valves e 5) centralina di controllo delle pinch valves.

Il moto dei due liquidi all'interno dei canali è generato da due controllori di pressione (prodotti da Fluigent), collegati direttamente all'impianto a pressione dell'edificio, in grado di esercitare una pressione controllata con precisione al millibar. Ciascun modulo genera un flusso d'aria che viene trasportato tramite tubi capillari fino a una provetta, utilizzata come serbatoio rispettivamente per l'acqua e per l'olio; da qui, i due liquidi vengono spinti

lungo ulteriori tubi capillari fino a raggiungere le entrate 1 e 2 del chip, Figura 2.2, dedicate rispettivamente all'olio e all'acqua.

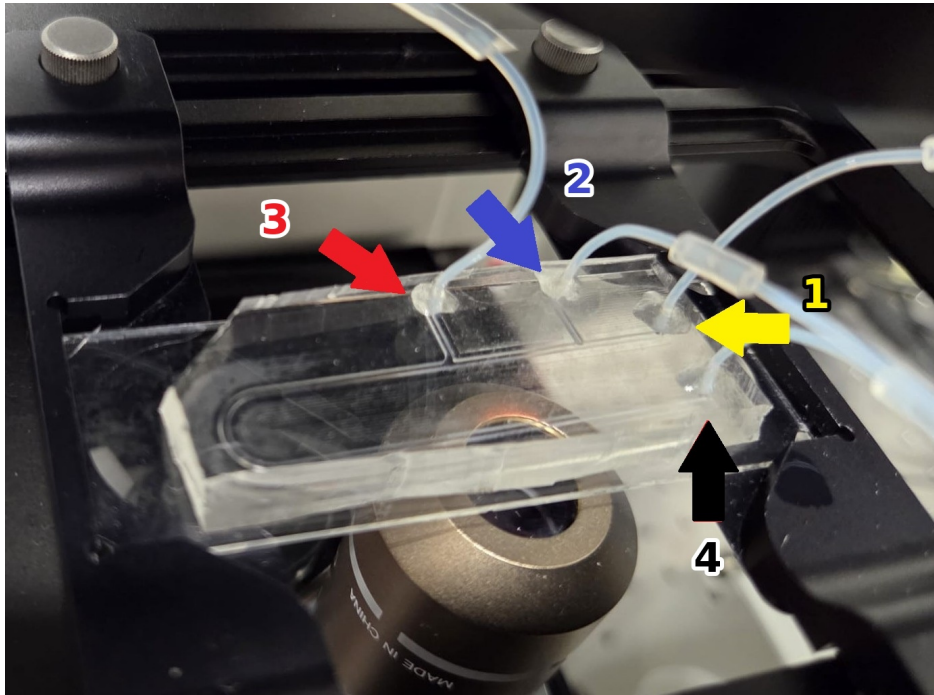


Figura 2.2: Fotografia del chip microfluidico con entrate numerate.

Lungo i due tubi che collegano le provette di olio e acqua al chip sono montati altrettanti sistemi di clampaggio chiamati pinch valves, in grado di strozzare a comando il tubo in corrispondenza di un'apposita giunzione in silicone posta a metà tubo, bloccandone così il flusso: è questo il meccanismo che rende il sistema effettivamente “on demand”, permettendo di avviare e interrompere l'emissione delle gocce in modo indipendente dai due canali.

Il tubo collegato all'uscita 4 del chip convoglia il liquido verso una provetta di raccolta, mentre l'entrata 3, non utilizzata in questa configurazione, è chiusa con una siringa al solo scopo di mantenere la pressione all'interno del circuito. L'intero sistema controllori di pressione, telecamera e centralina di controllo delle pinch valves è infine collegato a un computer, da cui è possibile gestire e coordinare il funzionamento del setup.

2.2 Misura e presentazione dei risultati

Lo scopo della caratterizzazione del setup droplet-on-demand è verificare la dipendenza lineare attesa tra la lunghezza della goccia e il tempo di apertura del flusso d'acqua, e tra la lunghezza della goccia e la pressione applicata al flusso d'acqua.

Questa dipendenza è attesa sulla base del funzionamento del setup: in condizioni normali l'olio è libero di fluire mentre l'acqua è bloccata dalla valvola; quando si decide di generare

una goccia avviene uno scambio, per cui il flusso d'olio viene bloccato mentre all'acqua è permesso di fluire. Dopo un tempo determinato (tempo di apertura, t_{open}) l'acqua viene nuovamente bloccata e l'olio ricomincia a fluire, permettendo la rottura dell'interfaccia olio-acqua, e quindi la formazione di una goccia secondo il meccanismo della T-junction. Poiché la velocità con cui l'acqua viene immessa nel canale dipende dalla pressione applicata, ci si aspetta una proporzionalità diretta tra la lunghezza della goccia e la pressione dell'acqua; allo stesso modo, ci si aspetta una proporzionalità diretta tra la lunghezza della goccia e il tempo per cui il flusso d'acqua viene lasciato libero di fluire. Dipendenze lineari di questo tipo sono infatti state osservate anche da [6].

Per verificare queste dipendenze è stata condotta una serie di misure così strutturata: per ciascun tempo di apertura sono state raccolte 10 gocce, sulle quali sono state calcolate media e deviazione standard della lunghezza. La procedura è stata ripetuta per 5 diversi tempi di apertura, e sui punti così ottenuti è stato effettuato un fit lineare. L'intera procedura è stata poi ripetuta per 4 diverse pressioni dell'acqua (20, 30, 50 e 60 mbar), mantenendo costante la pressione dell'olio. Tra una serie di misure e la successiva è stato fatto fluire solo olio per un certo intervallo di tempo, in modo che la resistenza idraulica a valle della T-junction non venisse alterata dalla presenza di gocce o di acqua nel canale data la viscosità diversa dall'olio, garantendo così la massima ripetibilità delle misure. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 2.3. Infine, i valori delle pendenze ricavate dai fit lineari sono stati riportati in funzione della pressione dell'acqua usata nella relativa serie di misure Figura 2.4.

Come si osserva in Figura 2.3, per tutte e quattro le pressioni testate la lunghezza della goccia cresce linearmente con il tempo di apertura, con un ottimo accordo con il modello lineare (R^2 compreso tra 0,984 e 0,998). Le pendenze ottenute dai fit sono $m = 3,58 \pm 0,14$ mm/s a 20 mbar, $m = 5,35 \pm 0,23$ mm/s a 30 mbar, $m = 8,30 \pm 0,21$ mm/s a 50 mbar e $m = 11,48 \pm 0,85$ mm/s a 60 mbar: la pendenza cresce quindi in modo monotono con la pressione, come atteso. Riportando queste pendenze in funzione della pressione (Figura 2.4) si osserva a sua volta un andamento compatibile con una proporzionalità diretta con $R^2 = 0,975$. L'intercetta è compatibile con zero entro l'incertezza, coerentemente con l'aspettativa che a pressione nulla non vi sia flusso d'acqua e quindi pendenza nulla; questo supporta l'ipotesi di proporzionalità diretta tra pendenza e pressione, oltre che tra lunghezza e tempo di apertura, come atteso dal funzionamento del setup. Si nota inoltre che tutti e quattro i fit di Figura 2.3 hanno un'intercetta positiva e non nulla (tra 1,2 e 1,9 mm circa), compatibile con l'esistenza di una lunghezza minima di goccia anche per tempi di apertura molto brevi, verosimilmente legata al tempo di risposta finito della valvola nella fase di scambio tra acqua e olio, e al movimento di volumi finiti di liquido dovuti alla strozzatura del tubo capillare.

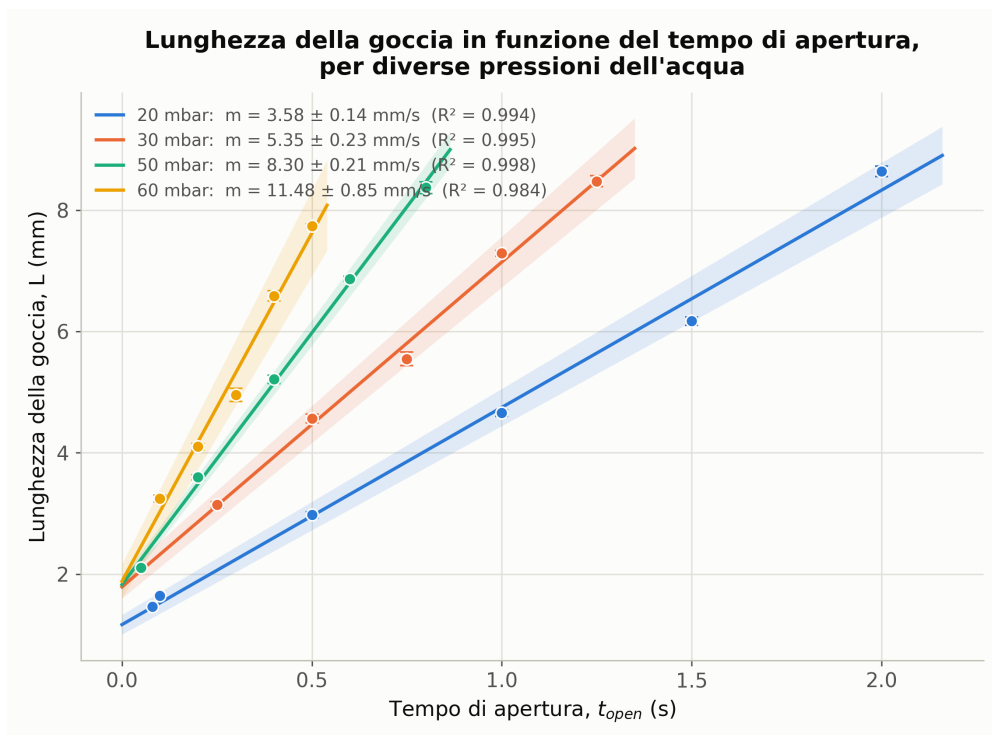


Figura 2.3: Grafico riguardante le misure di lunghezza raccolte in funzione del tempo di apertura.

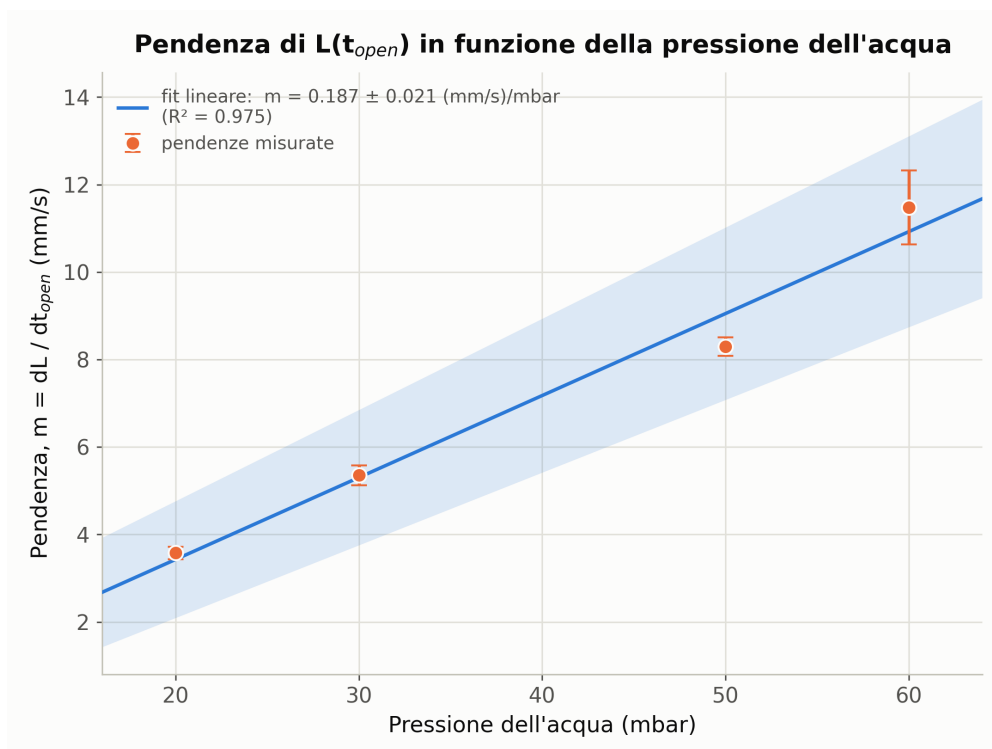


Figura 2.4: Valori delle pendenze dei fit di Figura 2.3 in funzione della pressione dell'acqua.

Capitolo 3

Accumulo di particelle

3.1 Setup e procedura misure di accumulo

Il setup utilizzato per le misure di accumulo è lo stesso setup droplet-on-demand descritto nel Capitolo 2, semplicemente trasferito su un'altra postazione dotata di banco ottico, per poter integrare nel sistema un microscopio ottico (Nikon Ti), Figura 3.1. Il chip è stato montato sul porta-vetrini di un microscopio ottico, movibile tramite l'apposito controller; sul microscopio è stata inoltre montata una fast camera (Phantom VEO-E310L), Figura 3.2, per poter effettuare le misure di accumulo con l'elevata precisione temporale necessaria. Nel dettaglio, le immagini riportate di seguito sono state acquisite ad una velocità di 300-500 frame per secondo (fps). Al setup sono state apportate due ulteriori modifiche. La prima consiste nel montaggio, sul tubo collegato all'ingresso 2 del chip, di un motorino vibrante, Figura 3.3, che serve a mantenere in agitazione la sospensione di particelle durante il suo scorrimento nel tubo [12]. La seconda consiste nel collegamento, al tubo collegato all'ingresso 3 del chip, di una siringa montata su una pompa a siringa (syringe pump): una volta impostato il diametro della siringa utilizzata, la pompa è in grado di generare un flusso di intensità scelta, espresso in $\mu\text{L}/\text{min}$.

La procedura per ottenere una misura di accumulo è la seguente. Anzitutto si prepara la sospensione di particelle micrometriche, a una concentrazione di 10^8 particelle/mL, che viene poi sonicata per circa 30 minuti; nel frattempo si fa fluire olio all'interno del chip per eliminare tutta l'aria presente. Una volta che tutte le componenti sono pronte si può procedere con le misure vere e proprie. In questa fase entrambe le provette che normalmente fungono da serbatoio, una per l'olio e una per l'acqua, vengono riempite di olio. Poiché la sospensione di particelle è tenuta in sospensione manualmente, prima di ogni ricarica del tubo questa va agitata con il lab dancer.

Per prelevare la sospensione di particelle e introdurla nel circuito, si collega una siringa al tubo di uscita e si aspira. Durante questa fase gli ingressi 1 e 3 restano bloccati: l'ingresso 1 è clampato e impedisce quindi che l'olio venga aspirato da quel ramo, mentre l'ingresso 3 è collegato alla pompa a siringa, in questo momento spenta, che quindi non permette al liquido di muoversi da quel lato. Lo scopo è aspirare la sospensione di particelle in modo da

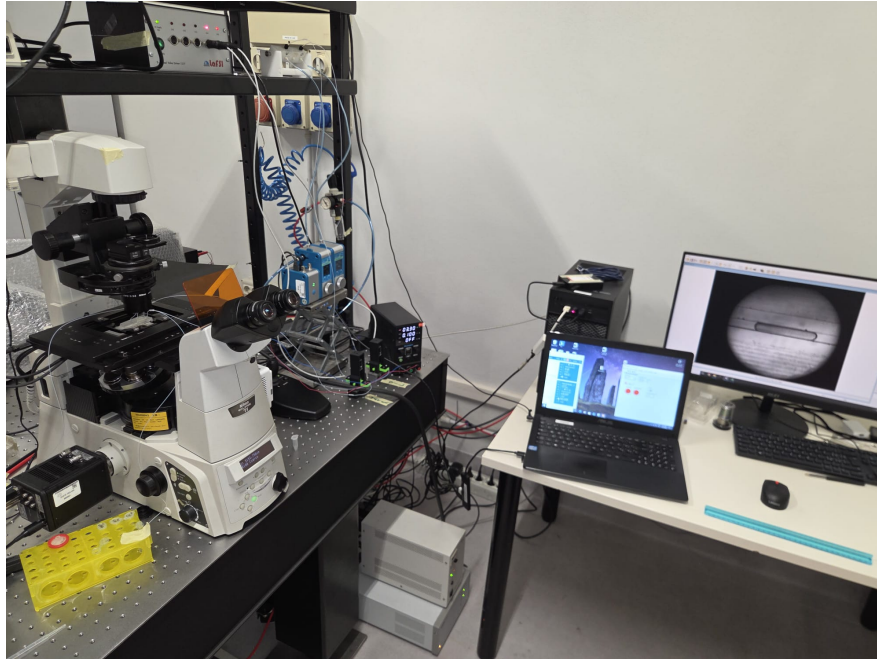


Figura 3.1: Setup DOD per la misura di accumulo di particelle nelle gocce.



Figura 3.2: Fast camera (Phantom VEO-E310L).

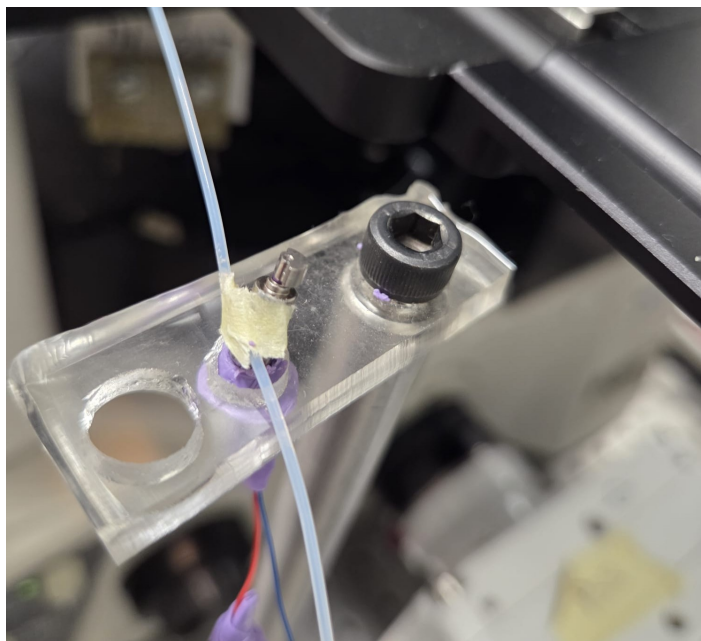


Figura 3.3: Motorino vibrante montato sul tubo capillare 2.

riempire con questa la porzione di tubo 2 compresa tra il sistema di clampaggio e il chip. Per rendere possibile questa operazione, il tubo capillare è stato tagliato subito dopo il sistema di clampaggio, e le due estremità sono state riunite tramite una guaina in silicone, così da poter aprire il sistema quando necessario: il tubo viene inserito nella provetta contenente la sospensione di particelle e, aspirando, si carica con la soluzione la porzione di tubo desiderata; il sistema viene poi richiuso, ripristinando la normale funzione DOD. Durante questa fase di ricarica occorre prestare particolare attenzione a non far entrare aria nei tubi: essendo comprimibile, in un sistema in cui la pressione viene continuamente accesa e spenta l'aria produrrebbe un fastidioso effetto cuscinetto, che andrebbe a influenzare le misure. Terminata la ricarica, si accende il motorino vibrante collegato alla stessa porzione di tubo contenente la sospensione di particelle e si scollega la siringa utilizzata per l'aspirazione, in modo che il tubo che funge da scarico del sistema torni libero di funzionare. A questo punto il sistema è pronto per generare la goccia.

È stato misurato l'andamento dell'accumulo di particelle in funzione della velocità della goccia e dell'aspect ratio. Sono stati scelti 4 valori di aspect ratio (2, 4, 6 e 8) per ciascuno di essi sono state osservate diverse velocità, determinate dai flussi impostati tramite la pompa a siringa: 30,5, 150, 305, 450 e 610 $\mu\text{L}/\text{min}$. Per ciascuna combinazione di aspect ratio e flusso è stato osservato l'andamento dell'accumulo su 6 gocce, da cui è stato ricavato un andamento medio. Tra una misura e l'altra viene sempre fatto scorrere solo olio per circa un minuto, in modo da evitare che la resistenza idraulica a valle della giunzione a T venga alterata dalla presenza di gocce o di soluzione nel canale.

Come si osserva nella Figura 2.2, l'ingresso 3 si trova più a valle rispetto alla T-junction;

poiché la pompa a siringa che determina il flusso della misura è collegata al chip proprio tramite l'ingresso 3, una volta generata la goccia questa viene fatta avanzare oltre l'ingresso 3 e quindi fermata, in modo da trovarsi nella posizione corretta perché la pompa possa spingerla al flusso prestabilito. A questo punto con la fast cam si registra un filmato della goccia in movimento. Successivamente per valutare quantitativamente la distribuzione delle particelle all'interno delle gocce, le immagini acquisite, Figura 3.4a), vengono elaborate in tre passaggi utilizzando ImageJ. In primo luogo, a ciascuna immagine viene sottratto lo sfondo utilizzando l'immagine del capillare vuoto (senza la goccia), ottenendo così un fotogramma in cui sono visibili soltanto la goccia e le particelle incorporate, Figura 3.4b). Successivamente, viene definita una regione di interesse (ROI) all'interno della goccia, escludendo le regioni di bordo, e viene calcolato il valore medio di grigio dei pixel ($\langle px \rangle$) all'interno della ROI, colonna per colonna lungo l'asse della goccia. Le medie risultanti vengono quindi normalizzate rispetto al valore minimo di ciascuna immagine ($\langle px \rangle / \langle px \rangle_{\min}$); di conseguenza, un valore di grigio prossimo a 1 indica la minima concentrazione locale di particelle; quindi, i valori che allontanano da 1 indicano una concentrazione di particelle. I valori dei pixel vengono tracciati in funzione della posizione della colonna della ROI (x), normalizzata rispetto alla lunghezza della goccia (L), consentendo un confronto diretto tra gocce con diverso rapporto d'aspetto (AR, aspect ratio), Figura 3.4c).

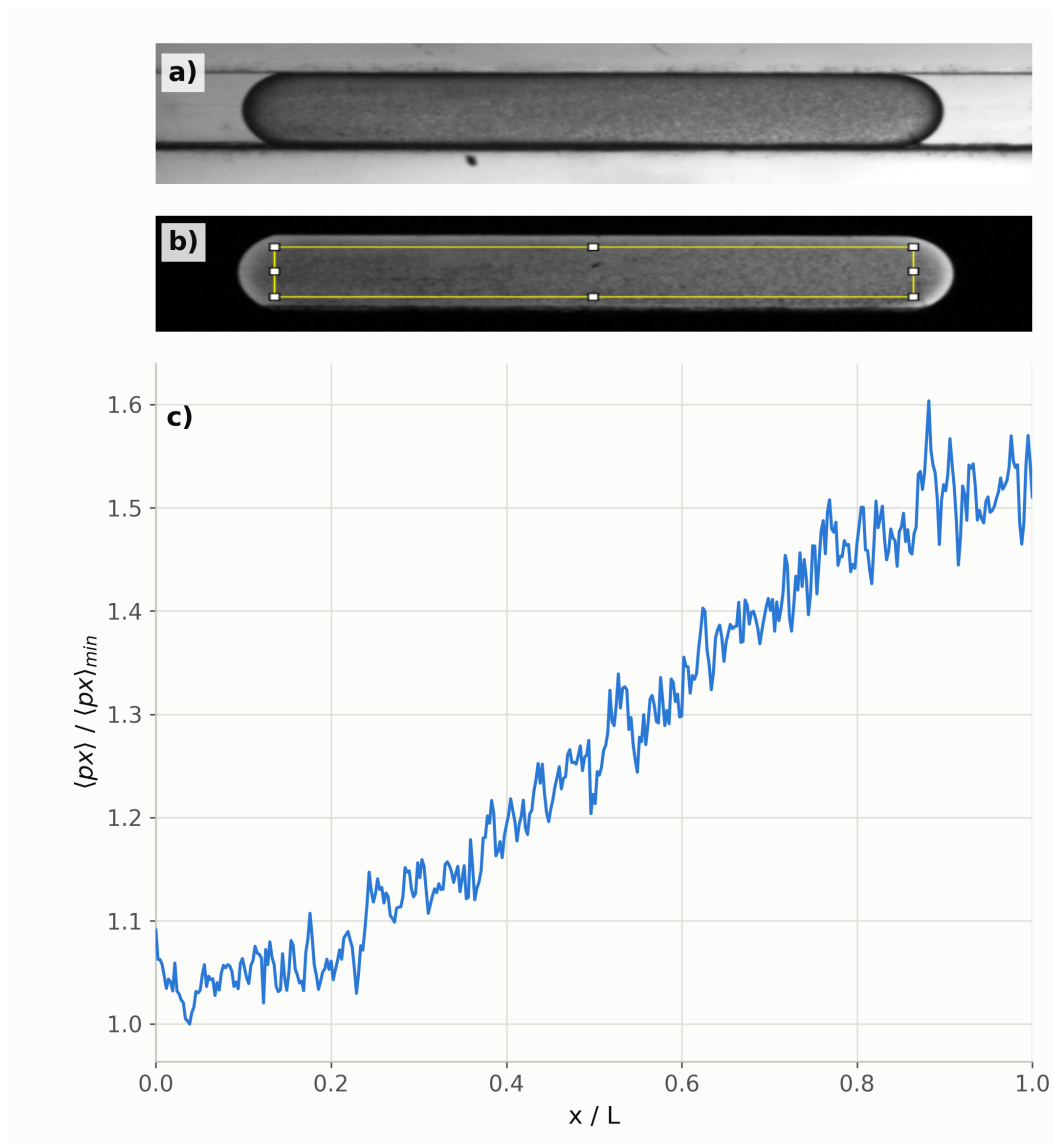


Figura 3.4: Processo per l'analisi di accumulo di particelle.

3.2 Presentazione dati

I dati raccolti sono riportati nelle figure seguenti. Le prime mostrano i profili di distribuzione normalizzata delle particelle ($\langle px \rangle / \langle px \rangle_{min}$) lungo la posizione normalizzata all'interno della goccia (x/L), a parità di aspect ratio e al variare della velocità ($AR = 2$ e $AR = 8$), e a parità di flusso impostato dalla pompa e al variare dell'aspect ratio (flussi di 30,5 e 610 $\mu\text{L}/\text{min}$), Figura 3.5.

Dai grafici si osserva come l'accumulo segua un andamento inconsueto, che si discosta da quello osservato sia nei canali circolari sia in quelli rettangolari discussi nell'introduzione: le particelle non si concentrano in una nuvola localizzata. Osservando i grafici che mostrano l'accumulo in funzione dell'aspect ratio è possibile riconoscere un andamento crescente

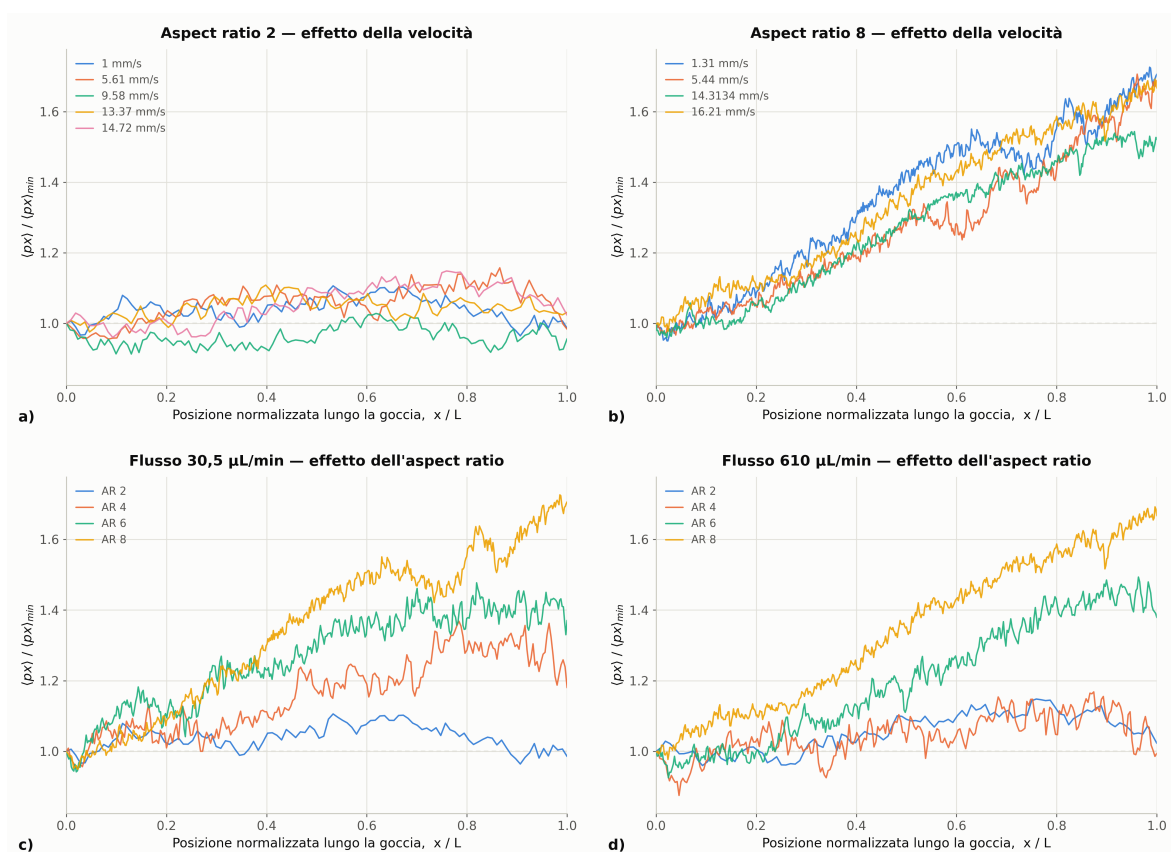


Figura 3.5: Grafici riguardanti i profili di accumulo: a) AR 2 in funzione della velocità, b) AR 8 in funzione della velocità, c) Flusso 30,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ in funzione di AR e d) flusso 610 $\mu\text{L}/\text{min}$ in funzione di AR.

pressoché costante, mentre nei grafici che mostrano l'accumulo in funzione della velocità si osserva come questa non sembri influenzarlo. In ogni caso, nei profili in cui è possibile riconoscere una distribuzione non piatta, e che quindi non corrisponde a un normale profilo dovuto alla sola diffusione, si osserva come la concentrazione di particelle cresca in maniera pressoché costante dall'estremità posteriore a quella anteriore della goccia. Per dare una lettura più quantitativa a questo andamento è stato effettuato un fit lineare su ciascun set di dati raccolto, con l'idea di utilizzare la pendenza della retta come parametro per quantificare l'intensità dell'accumulo, Figura 3.6.

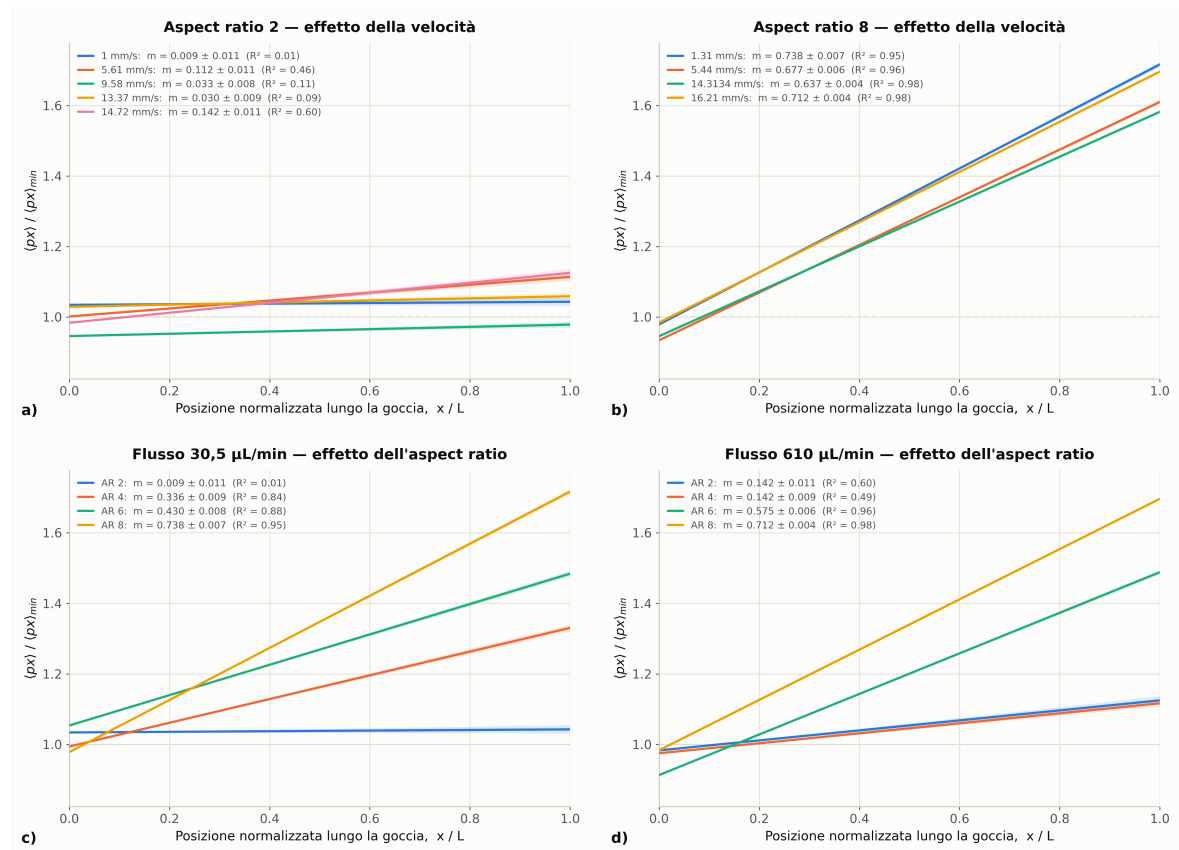


Figura 3.6: Fit lineari eseguiti sui profili di accumulo dei grafici in Figura 3.5.

Dai valori dei fit emergono due andamenti distinti. La velocità della goccia non sembra avere un'influenza sistematica sulla pendenza, e quindi sull'accumulo: per AR = 2 la pendenza resta compresa tra 0,009 e 0,142 al variare della velocità tra 1 e 14,7 mm/s, senza un andamento apprezzabile; per AR = 8 resta tra 0,63 e 0,73, anch'essa senza un trend riconoscibile. L'aspect ratio, al contrario, ha un effetto marcato: la pendenza cresce da valori prossimi a zero per AR = 2 fino a circa 0,72–0,74 per AR = 8, in modo pressoché lineare per entrambi i flussi testati.

Riportando le pendenze ottenute in funzione dell'aspect ratio (figura seguente) si osserva quindi una proporzionalità diretta tra pendenza dell'accumulo e aspect ratio, Figura 3.7.

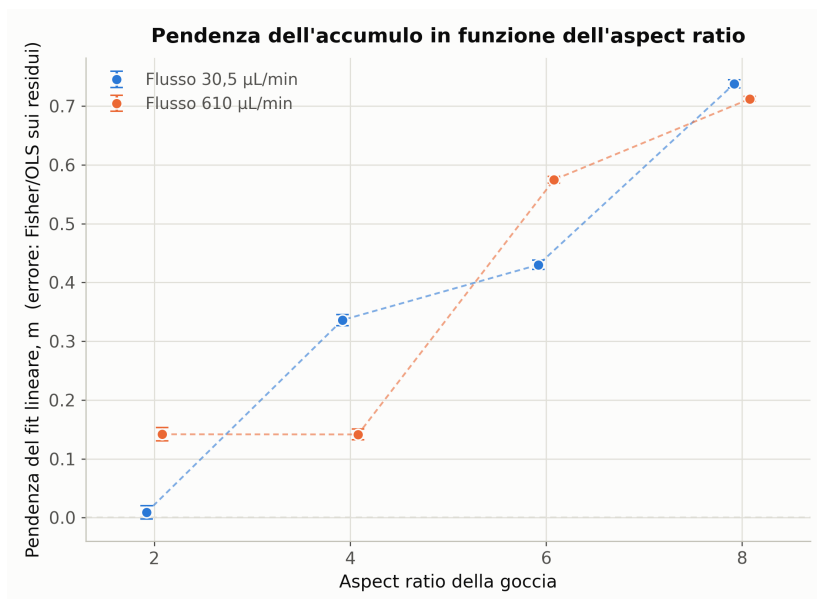


Figura 3.7: Pendenza d'accumulo in funzione dell'aspect ratio.

Questo andamento si distingue nettamente da entrambi i casi discussi in letteratura nel Capitolo 1: né dal pattern osservato nei canali circolari, dove le particelle si accumulano in un'unica nuvola concentrata al retro della goccia [8], né da quello nei canali rettangolari ad aspect ratio fissato, dove l'accumulo si divide in due nuvole distinte vicino alle pareti laterali, comunque al retro della goccia [10]. Nel caso qui osservato non compare invece una vera e propria nuvola localizzata, bensì un gradiente di concentrazione pressoché continuo lungo l'intera goccia, la cui intensità dipende dall'aspect ratio ma non dalla velocità.

3.3 Confronto con la letteratura

Per lo studio dell'accumulo in canali circolari e rettangolari, il principale parametro quantitativo utilizzato in letteratura è il numero capillare Ca . Anche nel presente lavoro è stato impiegato un range di valori di Ca confrontabile con quello riportato in letteratura: le misure coprono un intervallo che va da un minimo di $Ca \approx 2,6 \times 10^{-4}$ a un massimo di $Ca \approx 4,15 \times 10^{-3}$. Tuttavia, come mostrato dai dati presentati nel Capitolo 3.2, il profilo di accumulo osservato risulta indipendente dalla velocità della goccia e, di conseguenza sostanzialmente indipendente da Ca stesso (il Ca è proporzionale alla velocità a parità di proprietà dei fluidi).

L'andamento riscontrato nei dati a nostra disposizione mostra invece una plausibile dipendenza dall'aspect ratio della goccia, come evidenziato in Figura 3.7. Questo potrebbe essere dato dal fatto che l'aspect ratio influenza e modifica il campo dei moti interno della goccia, direttamente responsabile del pattern di accumulo studiati fin'ora. Potrebbero avere il loro ruolo in questo anche i gutter che presentano una geometria diversa rispetto a quella dei canali rettangolari studiati in letteratura, e potrebbero quindi determinare un'interazione differente tra la goccia e il flusso d'olio circostante, tale da alterare la forma dei vortici interni.

Dal profilo ottenuto non è tuttavia possibile attribuire l'accumulo osservato ai punti di ristagno del pattern di ricircolazione interna, come avviene invece nei canali circolari e rettangolari discussi in letteratura: non si osserva infatti un picco di concentrazione localizzato in un punto preciso della goccia, bensì un profilo continuo lungo l'intero corpo della goccia. Una possibile ipotesi è quindi che il pattern osservato non sia il risultato di semplici punti di accumulo localizzati, ma di una topologia dei vortici interni più complessa, in grado di guidare l'accumulo delle particelle lungo l'intera lunghezza della goccia.

Capitolo 4

Conclusioni

È stato affrontato lo studio dell'accumulo di particelle solide micrometriche in gocce che scorrono in canali a sezione quadrata, una geometria non ancora indagata sistematicamente in letteratura. A questo scopo è stato sviluppato e caratterizzato un setup microfluidico DOD, la cui caratterizzazione ha confermato la dipendenza lineare attesa tra lunghezza della goccia, tempo di apertura della valvola e pressione dell'acqua ($R^2 > 0,97$). Le successive misure di accumulo, condotte al variare della velocità della goccia (Ca tra $2,6 \times 10^{-4}$ e $4,15 \times 10^{-3}$) e dell'aspect ratio (2, 4, 6, 8), hanno mostrato un comportamento distinto da quello riportato in letteratura: mentre nei canali circolari e rettangolari le particelle si accumulano in una o più nuvole localizzate al retro della goccia con un'intensità dipendente da Ca , nel canale a sezione quadrata l'accumulo assume la forma di un gradiente di concentrazione continuo lungo l'intera goccia, la cui pendenza cresce da valori prossimi a zero per $AR = 2$ fino a circa 0,74 per $AR = 8$, senza alcuna dipendenza sistematica dalla velocità. L'assenza di una nuvola localizzata suggerisce che l'accumulo non sia riconducibile ai singoli punti di ristagno del pattern di ricircolazione interna, come avviene invece nei casi circolare e rettangolare, ma a una topologia dei vortici interni più complessa, possibilmente legata all'AR e alla diversa geometria dei gutter agli angoli del canale quadrato. Restano aperte alcune direzioni per lavori futuri quali: la verifica diretta della topologia dei vortici interni tramite μPIV , l'estensione del range di aspect ratio esplorato, e un confronto sistematico tra canali quadrati, circolari e rettangolari nelle stesse condizioni sperimentali.

Bibliografia

- [1] Camponogara, T. (2024). Fabbricazione e caratterizzazione di un dispositivo per la realizzazione di cristalli microfluidici. Tesi di Laurea, Università degli Studi di Padova.
- [2] Whitesides, G. M. (2006). The Origins and the Future of Microfluidics. *Nature*, 442, 368.
- [3] Seemann, R., Brinkmann, M., Pfohl, T., Herminghaus, S. (2012). Droplet Based Microfluidics. *Rep. Prog. Phys.*, 75, 016601.
- [4] Moragues, T. et al. (2023). Droplet-based microfluidics. *Nat. Rev. Methods Primers*, 3, 32.
- [5] Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Stone, H. A., Whitesides, G. M. (2006). Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction. *Lab Chip*, 6, 437–446.
- [6] Churski, K., Michalski, J., Garstecki, P. (2009). Droplet on demand system utilizing a computer controlled microvalve integrated into a stiff polymeric microfluidic device. *Lab Chip*, 10, 512–518.
- [7] Baroud, C. N., Gallaire, F., Dangla, R. (2010). Dynamics of microfluidic droplets. *Lab Chip*, 10, 2032.
- [8] Crestani, B. et al. (2026 manuscript). Solid microparticle dynamics in flowing droplets and consequences in confined enzymatic chemical reactions. *Droplet*. (accepted)
- [9] Sun, M., Khan, Z. S., Vanapalli, S. A. (2012). Blood plasma separation in a long two-phase plug flowing through disposable tubing. *Lab Chip*, 12, 5225.
- [10] Hein, M., Moskopp, M., Seemann, R. (2015). Flow field induced particle accumulation inside droplets in rectangular channels. *Lab Chip*, 15, 2879–2886.
- [11] Kurup, G. K., Basu, A. S. (2021). Field-free particle focusing in microfluidic plugs. *Biomicrofluidics*, 6, 022008 (nota: nel testo di Crestani citato come “2021” per il secondo lavoro dello stesso gruppo).
- [12] Poles, M. et al. (2023). Shaking Device for Homogeneous Dispersion of Magnetic Beads in Droplet Microfluidics. *Sensors*, 23, 5399.