

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Fisica e Astronomia "G. Galilei"
Corso di Laurea in Fisica

**Applicazione optofluidica di uno spettrofotometro
integrato in niobato di litio per misure di pH**

Relatore: Prof.ssa Cinzia Sada

Correlatore: Dott. Riccardo Zamboni

Laureanda: Sofia Saoncella

Matricola N. 1099275

Anno accademico 2016/2017

Indice

Introduzione	1
1 Apparato sperimentale	4
1.1 Setup per l'acquisizione near field	4
1.2 Chip: piattaforma opto-microfluidica	5
1.2.1 Fabbricazione	5
2 Protocollo di misura: processo e ottimizzazione	6
2.1 Trasmittanza di soluzioni: preparazione dei campioni	7
2.2 Misure di stabilità	8
2.3 Caratterizzazione del beam splitter	11
3 Trasmittanza: approccio standard	12
3.1 Studio della concentrazione di indicatore	13
3.2 Acquisizione e analisi dati: misure di assorbimento con spettrofotometro	14
4 Misure di trasmittanza: approccio opto-microfluidico	15
4.1 Tecnica di accoppiamento in guida	16
4.2 Stadio microfluidico	17
4.3 Metodo di acquisizione dei dati: circuito opto-microfluidico	18
4.4 Analisi dati	18
5 Misure in goccia	21
5.1 Tecniche di realizzazione delle gocce	21
5.2 Metodo di acquisizione dei dati	22
5.3 Analisi dati	24
5.4 Misure con gocce piccole	26
5.5 Soluzioni con Nile Blue A	28
Conclusioni	30
A Funzionamento dello spettrofotometro	33
B Funzionamento dell'amplificatore lock-in	33
Bibliografia	35

Introduzione

La tecnologia microfluidica porta con sé grandi promesse in quanto trova impiego in applicazioni tipiche di laboratorio permettendo di ridurre il volume dei reagenti da millilitri e microlitri a nanolitri e femtolitri e condurre le analisi in tempi significativamente inferiori, dell'ordine dei secondi o meno, come hanno già dimostrato alcuni studi [11].

Negli ultimi 20 anni le applicazioni della microfluidica si sono notevolmente ampliate a partire dalle origini nel campo della chimica micro-analitica fino ad invadere molteplici ambiti scientifici come lo screening ad alta capacità, l'analisi biologica delle cellule e delle proteine e gli studi sulla cinetica delle reazioni chimiche [8]. Grazie alle dimensioni ridotte dei dispositivi e all'elaborazione parallela dei dati, la microfluidica è stata sfruttata anche in una vasta gamma di applicazioni mediche tra cui la sintesi di biomolecole, la somministrazione di farmaci, i test diagnostici e di bio-sensing [12, 4].

I dispositivi utilizzati comprendono uno stadio fluidico per la generazione di gocce e il controllo indipendente di ognuna di esse può essere sfruttato per realizzare micro-reattori chimici trasportabili e analizzabili individualmente. Sebbene vengano continuamente sviluppate nuove tecniche di micro-fabbricazione e siano già stati creati sistemi microchimici integrando microdispositivi con sistemi microfluidici, l'uso di sensori chimici e fisici perfettamente integrati con lo stadio di micro-reattore è ancora in discussione anche se i metodi ottici VIS-NIR sono i più utilizzati per l'analisi dell'identificazione chimica. Infatti, i materiali più sfruttati per i dispositivi a base di micro-reattori (come ceramica, polimeri, acciaio inossidabile, vetro, silice e silicio) sembrano impedire la piena integrazione delle funzionalità microfluidiche e ottiche nella regione VIS-NIR, nonostante garantiscano bio- e micro-compatibilità di lavorazione.

In questo scenario, l'integrazione di molteplici stadi diversi su un singolo substrato è un punto chiave per promuovere la realizzazione di dispositivi innovativi utili in molte applicazioni che richiedono strumenti portatili, per velocizzare l'analisi e permettere lo studio di nuovi fenomeni [9]. Recentemente nuove prospettive sono state aperte dall'opto-microfluidica nei campi del bio-sensing, della manipolazione ottica e dell'incapsulamento (in microsferi e in altri bersagli biologici come cellule) [7]. In questi casi, il circuito microfluidico viene realizzato su materiali flessibili come polimeri di PDMS o PMMA mentre le funzionalità ottiche sono ottenute con fibre ottiche esterne ivi integrate o realizzate su substrati solidi come vetro o silice collegati al circuito microfluidico [3].

Anche i cristalli di niobato di litio (LiNbO_3) sono stati proposti nel campo della microfluidica, poiché questo cristallo consente di generare onde acustiche ad alta efficienza per spostare gocce sul substrato

in modo molto controllato, per la stabilità di miscelazione e pompaggio dei fluidi e per le sue proprietà piroelettriche e fotogalvaniche [13, 10, 6, 5]. Sorprendentemente, tutte le applicazioni citate sono state realizzate senza produrre un circuito microfluidico direttamente sul substrato di LiNbO_3 e senza l'integrazione degli stadi di rilevazione ottica anche se è un materiale molto sfruttato nel settore della fotonica e dell'ottica integrata.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un progetto più ampio che mira a combinare le proprietà ottiche e la versatilità dei cristalli di niobato di litio con la tecnica microfluidica che sfrutta l'utilizzo di gocce al fine di realizzare un dispositivo optofluidico interamente integrato in LiNbO_3 .

L'obiettivo principale è lo sviluppo di un dispositivo spettrofotometrico, in grado di monitorare il viraggio del pH di soluzioni chimiche a seconda della loro composizione. In particolare la piattaforma opto-microfluidica comprende più stadi interconnessi: la generazione delle gocce e il loro trasferimento attraverso un canale microfluidico direttamente inciso sul substrato cristallino e una fase di analisi che include l'uso di guide d'onda dove le proprietà ottiche delle gocce sono monitorate e rilevate.

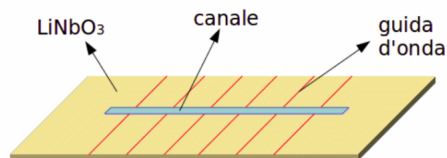


Figura 0.1: Schema della base di un chip opto-microfluidico in niobato di litio.

Per raggiungere questo obiettivo viene proposta una giunzione opto-fluidica realizzata accoppiando il canale microfluidico e due guide d'onda ai lati: una guida trasporta un segnale monocromatico ed è in grado di eccitare selettivamente una determinata risposta ottica nella goccia mentre la seconda raccoglie il segnale trasmesso e lo conduce alla fase di elaborazione.

In particolare gli obiettivi di questo lavoro di tesi sono la caratterizzazione della stabilità dell'accoppiamento dello stadio ottico con quello fluidico e la messa a punto di una tecnica per sfruttare la piattaforma opto-microfluidica integrata in LiNbO_3 per misurare il pH di soluzioni chimiche. A tal fine si sono realizzate misure di trasmittanza di una radiazione laser utilizzando il dispositivo e sfruttando la legge di Lambert-Beer. Tale legge afferma che l'assorbimento di una radiazione elettromagnetica monocromatica a lunghezza d'onda λ da parte di una soluzione che contiene N specie chimiche capaci di assorbire quella lunghezza d'onda è proporzionale alla somma pesata delle loro concentrazioni.

$$A_\lambda = -\log \frac{I}{I_0} = d \sum_{i=1}^N \epsilon_i^\lambda c_i \quad (1)$$

dove d è il cammino ottico, ϵ_i^λ è il coefficiente di estinzione della specie i alla lunghezza d'onda λ e c_i la concentrazione molare della specie i .

Si è adottato un protocollo di misura che prevede l'analisi delle soluzioni per step successivi: la misura degli spettri di assorbimento, la misura di trasmittanza con l'utilizzo del chip integrato facendo fluire in modo continuo all'interno del canale le soluzioni e infine la misura della trasmittanza in chip iniettandovi le soluzioni in forma di goccia.

La tesi è organizzata in sei sezioni: nella **prima** sezione vengono descritti l'apparato sperimentale e il dispositivo microfluidico utilizzati con alcuni accenni alla metodologia impiegata per la fabbricazione; nella **seconda** viene presentato il protocollo di misura che è stato adottato durante il lavoro, sono inoltre riportati gli studi preliminari effettuati per caratterizzare alcuni elementi del set-up; nelle sezioni **terza**, **quarta e quinta** vengono trattate rispettivamente le misure di spettrofotometria, di trasmittanza ottica con la tecnica del flusso continuo e con il metodo delle gocce includendo in ognuna l'analisi dei dati raccolti; infine **l'ultima parte** presenta i risultati ottenuti e le conclusioni che ne vengono tratte.

1 Apparato sperimentale

1.1 Setup per l'acquisizione near field

La tecnica near field è basata sull'accoppiamento ottico della luce laser con la guida d'onda e con l'apparato microfluidico oltre al rivelamento del fascio trasmesso in uscita dalla guida. Per realizzare le misure che coinvolgono l'uso del chip di niobato di litio è stato utilizzato un'apparato strumentale che comprende, nell'ordine in cui sono disposti, i seguenti elementi principali:

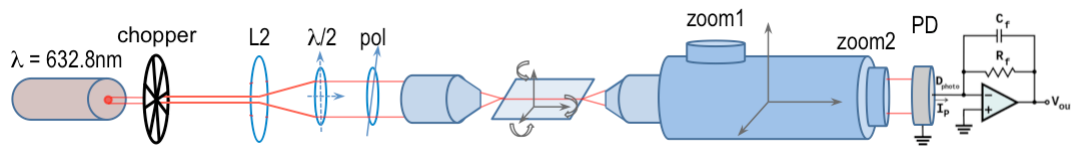


Figura 1.1: Schema degli elementi principali del setup near field.

- una sorgente laser di He-Ne alla lunghezza d'onda di 632.8nm con una potenza nominale di 4mW ;
- un beam splitter che divide il fascio alla percentuale di intensità 24%-76%;
- un optical chopper ovvero un dispositivo composto di un disco metallico rotante che modula l'intensità del fascio laser con una frequenza preimpostata;
- una lente confocale per garantire la collimazione del fascio;
- una lamina $\lambda/2$ e un polarizzatore regolabile che servono a selezionare la polarizzazione della sorgente in modo da eccitare entrambi i modi TE e TM della guida d'onda;
- un obiettivo $20\times$ che focalizza il fascio laser sulla superficie del campione garantendo un accoppiamento in guida a butt-coupling;
- il campione su cui è integrato il circuito opto-microfluidico con relativo supporto in grado di ruotarlo e traslarlo con sensibilità $1\mu\text{m}$ in 3D (x,y,z);
- un microscopio posizionato orizzontalmente con un obiettivo $20\times$ e due livelli di zoom sistemato su un supporto mobile nelle tre direzioni accoppiabile con un rivelatore, sia esso un CDD o un fotodiodo, (nel caso del CCD permette tramite opportune ottiche un ingrandimento complessivo di $15.5\text{ nm}/\text{pixel}$);

- un PIN diode (un fotodiode con base in silicio) per luce visibile che può essere posizionato sull'obiettivo del microscopio per misurare l'intensità luminosa all'uscita della guida di luce.

La strumentazione comprende anche un oscilloscopio analogico; un amplificatore lock-in che è in grado di amplificare l'ampiezza del segnale isolandolo dal rumore di background; una FAST acquisition Card accoppiata con un computer dotato di un apposito software che permette di registrare e visualizzare il segnale raccolto dal fotodiode e infine un sistema di tre pompe microfluidiche ¹ che permettono l'immissione delle soluzioni nel chip e il controllo dei flussi e delle pressioni.

1.2 Chip: piattaforma opto-microfluidica

L'elemento fondamentale è un circuito microfluidico con guide di luce integrate creato all'interno di un campione di niobato di litio. Il chip utilizzato è formato da un cristallo di niobato di litio rettangolare di dimensioni $23 \times 18 \text{ mm}$ e comprende due stadi: uno microfluidico e uno ottico.

Il passaggio microfluidico all'interno del chip può essere composto da un solo canale, oppure da una giunzione a T o da una giunzione a croce. Quest'ultima è la geometria usata in cui si differenziano tre rami di entrata e uno di uscita e con questa configurazione si possono produrre gocce di soluzione in olio facendo fluire due fluidi immiscibili agli ingressi del canale.

Lo stadio ottico è formato da guide d'onda realizzate drogando localmente il substrato con titanio mediante un processo di diffusione termica all'interno del materiale. Esse sono disposte perpendicolarmente al canale che le attraversa a circa metà della loro lunghezza. Le guide d'onda hanno lo scopo da un lato di illuminare le gocce perpendicolarmente alla direzione in cui scorrono e dall'altro di raccoglierne l'intensità trasmessa.

1.2.1 Fabbricazione

Alcuni studi sono stati realizzati interamente per la progettazione e la funzionalizzazione del canale microfluidico e la realizzazione delle guide d'onda integrate nel substrato di LiNbO_3 [1], in questa sezione vengono ricordati i passaggi fondamentali coinvolti nella realizzazione.

Lo stadio microfluidico del chip è formato da un canale realizzato lungo la direzione cristallografica y del substrato, dalle dimensioni di $200 \mu\text{m}$ di larghezza e $100 \mu\text{m}$ di profondità. La tecnica studiata per

¹OB1 MK3 pressure driven pump con 3 canali a 0-8bar e uno a 200mbar, risoluzione dei sensori: 0.006%, stabilità: 0.005%, tempo di risposta: 9ms, feedback con un sistema PID con flussimetri Bronkhorst. Flusso minimo: $1.6 \mu\text{L}/\text{min}$, flusso massimo: $3.3 \text{ mL}/\text{min}$, accuratezza: 0.2%, ripetibilità: 0.05%, tempo risposta: 35ms.

la fabbricazione si basa sull'incisione del canale mediante una lama con qualità ottiche. In questo modo le pareti dei canali risultano lucide e definite a sufficienza da permettere un buon accoppiamento con lo stadio ottico.

Un altro importante passaggio per lo sviluppo di un chip microfluidico è la sigillatura del canale scavato nel substrato. Viene utilizzato un coperchio di vetro incollato con NOA 68 (un fotopolimero utilizzato come collante per ottiche) che, in corrispondenza del canale, funge da parete superiore. In corrispondenza della fine del canale, sul coperchio vengono praticati dei fori dal diametro di 2mm che aprono ai pozzetti. Sui pozzetti vengono attaccati dei tubi in silicone MASTERFLEX utilizzando una piccola quantità di PDMS, un polimero che viene fatto successivamente reticolare con un trattamento a 70°C per due ore.

Per quanto riguarda lo stadio ottico, ci sono varie tecniche per realizzare le guide d'onda. Quella più comune è il drogaggio del niobato di litio con titanio tramite diffusione. Conseguente al drogaggio è l'aumento dell'indice di rifrazione del materiale necessaria affinché la luce alla lunghezza d'onda della sorgente laser si rifletta completamente al suo interno.

2 Protocollo di misura: processo e ottimizzazione

Il metodo che è stato elaborato al fine di giungere all'obiettivo di questo lavoro di tesi comprende una procedura preliminare di caratterizzazione dell'apparato che si specifica nella valutazione del tempo di stabilità dell'accoppiamento del dispositivo e nella descrizione quantitativa dell'azione del beam splitter utilizzato. Tale procedura consiste anche nella messa a punto di una tecnica ottimale per l'acquisizione dei dati con l'utilizzo del chip microfluidico e di una prassi per la realizzazione delle soluzioni che verranno usate come campioni per le misure di assorbimento.

In seguito, il protocollo elaborato per svolgere il lavoro di acquisizione dati si differenzia in tre tipologie di misura. La prima consiste nella misura, per mezzo di uno spettrofotometro, degli spettri di assorbimento delle soluzioni analizzate. Il secondo metodo si basa su misure di assorbimento della luce da parte delle soluzioni che fluiscono in modo continuo all'interno del canale microfluidico del chip. Infine, l'ultimo e definitivo procedimento di misura sviluppato consiste in misure di assorbimento dove le soluzioni, anziché in flusso continuo, vengono analizzate in forma di gocce che scorrono nel canale microfluidico.

Le grandezze di interesse che si sono studiate a partire da queste misure sono in particolare: la trasmittanza T delle soluzioni, definita come il rapporto tra l'intensità del fascio di luce trasmesso e l'intensità

del fascio incidente su un mezzo materiale (che in questo caso è un fluido):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Una grandezza correlata alla trasmittanza è l'optical density (OD), un parametro adimensionale che indica quanto un mezzo è in grado di attenuare l'intensità di una radiazione che lo attraversa. Essa è definita come:

$$OD = -\log_{10} \left(\frac{P_{out}}{P_{in}} \right) \quad (3)$$

ove P_{out} indica la potenza della radiazione che emerge dal mezzo e P_{in} la potenza della radiazione incidente.

In conclusione si sono confrontati i risultati ottenuti con i tre approcci di misura valutandone l'efficacia e l'attendibilità.

2.1 Trasmittanza di soluzioni: preparazione dei campioni

Parte essenziale per la realizzazione del dispositivo misuratore di pH è la sostanza test che si vuole analizzare. In questo lavoro si sono esaminate varie soluzioni con diversi valori di pH che sono state differenziate cromaticamente mediante l'aggiunta della stessa quantità di un indicatore di pH. Lo scopo di questo passaggio è che, una volta colorate, le soluzioni da trasparenti si differenziano visivamente per un viraggio di colore e di conseguenza assumono un coefficiente di assorbimento della luce diverso per ciascuna a seconda del pH. Per capire qual è la quantità di indicatore ottimale da aggiungere alle soluzioni è stato eseguito uno studio sistematico che verrà descritto nel seguito.

Le soluzioni sono state ottenute a partire da una soluzione iniziale molto basica (pH 12) di NaOH per mezzo di diluizioni successive, tuttavia i calcoli necessari alla realizzazione non verranno descritti nel dettaglio.

Sono state realizzate 8 soluzioni diluendo quella iniziale con acqua distillata per ottenere la successiva a pH inferiore. Poi quest'ultima è stata diluita a sua volta con la quantità d'acqua calcolata per ottenerne un'altra a pH ancora più basso e così via. L'indicatore di pH che si è utilizzato è il blu di bromotimolo ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$) che ha un intervallo di pH di viraggio tra 6 e 8. Le proporzioni di soluzione basica e acqua distillata utilizzate per la realizzazione delle soluzioni sono state calcolate in modo tale da ottenere un set di campioni con un range di pH che varia tra 6 e 9 in modo da poter osservare una scala cromatica che va dal giallo al blu al crescere del pH.



Figura 2.1: Soluzioni con valori di pH che vanno da 6.24 (acqua trasparente) a 9.29 (blu). Alle soluzioni è stato aggiunto il blu di bromotimolo.

Prima di aggiungere l'indicatore, i pH delle soluzioni sono stati misurati con un pH-metro. In particolare sono state eseguite delle misure ripetute, quattro per ogni campione da cui si è estratto il valore medio. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 1.

Tabella 1: Valori medi dei pH delle soluzioni utilizzate e relativo errore casuale.

Numero soluzione	Ph
1	6.24 ± 0.03
2	7.37 ± 0.01
3	7.085 ± 0.005
4	8.10 ± 0.02
5	8.83 ± 0.01
6	8.918 ± 0.009
7	8.523 ± 0.002
8	8.60 ± 0.03
9	9.29 ± 0.01

2.2 Misure di stabilità

In una fase preliminare alla registrazione dei dati si è voluta testare la stabilità dell'accoppiamento in guida. A questo scopo sono state effettuate delle acquisizioni su periodi di tempo della durata di due ore. Si è riempito interamente il canale microfluidico con olio (esadecano) e si è posizionato il chip in modo da avere il miglior accoppiamento possibile tra guida e laser.

L'olio infatti permette di vedere in modo più definito la guida illuminata dalla luce laser grazie ad un fenomeno legato al suo indice di rifrazione ($n = 1.434$), maggiore rispetto a quello dell'acqua ($n = 1.333$). Il parametro che definisce la quantità di radiazione che una fibra ottica (o in questo caso una guida d'onda) è in grado di trasmettere, e che dipende dall'indice di rifrazione del mezzo è l'apertura numerica (NA) definita come

$$NA = n \sin \theta \quad (4)$$

dove n indica l'indice di rifrazione del mezzo all'uscita della guida e θ è il semiangolo del cono di luce che esce dalla guida. L'apertura numerica di una fibra ottica è una grandezza adimensionale che caratterizza l'intervallo angolare entro cui la luce che incide sulla fibra viene trasmessa attraverso di essa.

Nel caso di una fibra ottica (o di una guida) l'apertura numerica viene definita nel seguente modo:

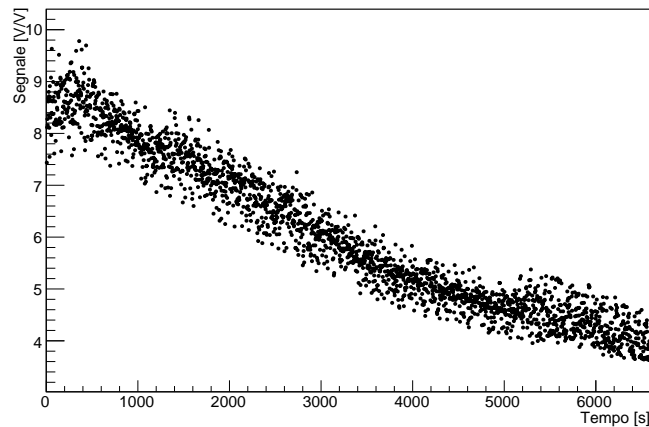
$$NA = \sqrt{n_{core}^2 - n_{clad}^2} \quad (5)$$

dove si è indicato con n_{core} l'indice di rifrazione del cuore della guida formato in tal caso da niobato di litio e titanio e con n_{clad} l'indice di rifrazione del rivestimento della guida composto da niobato di litio, perciò nel caso in questione il valore di NA è determinato nella fase di fabbricazione del chip. A parità di NA l'angolo di emissione della luce dalla guida dipende dall'indice di rifrazione del mezzo che il fascio attraversa: maggiore è l'indice di rifrazione, minore è l'angolo al vertice del cono in cui la luce viene emessa e quindi maggiore è l'intensità del fascio emergente. Detto ciò, poichè l'indice di rifrazione dell'esadecano è maggiore di quello dell'acqua, quando si realizza l'accoppiamento opto-microfluidico con il canale riempito d'olio il segnale trasmesso ha intensità maggiore rispetto al caso dell'acqua. Inoltre quando nel canale è presente acqua e il cono di luce è maggiore, è più probabile che si verifichi una perdita di intensità della radiazione dovuta a effetti di diffusione attraverso la superficie di vetro che riveste la parte superiore del chip.

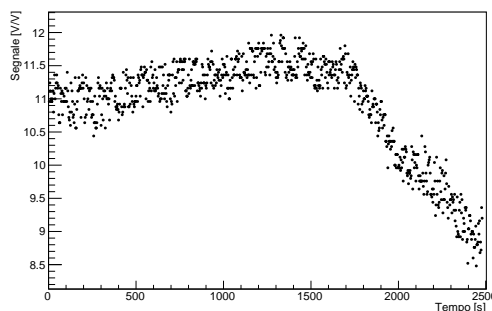
Dopo aver posizionato correttamente il chip si è inserito il fotodiodo davanti allo zoom posteriore del microscopio e si è verificato l'accoppiamento della guida osservando il segnale all'oscilloscopio. Quindi, si è collegato il fotodiodo al modulo lock-in e si sono registrati i valori di tensione corrispondenti all'intensità luminosa in uscita dalla guida normalizzati all'intensità del laser. Per effettuare la normalizzazione si è utilizzato un beam splitter che divide il fascio in due e la radiazione meno intensa è stata raccolta con un secondo fotodiodo.

Con una misurazione così protratta nel tempo si è potuto osservare che l'accoppiamento della guida non rimane stabile. Infatti, come si vede in figura 2.2 (a), dopo circa due ore, il segnale (misurato in V/V poichè è normalizzato in tensione) si riduce del 60% con un andamento lineare.

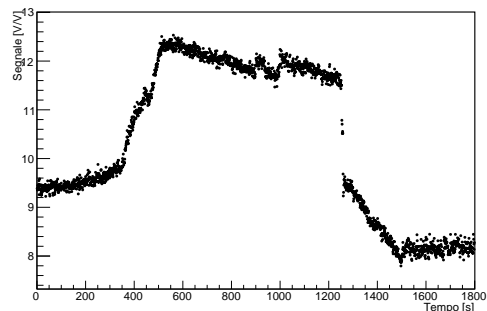
Si sono formulate alcune ipotesi sulla causa del disaccoppiamento, ad esempio l'instabilità dei micrometri relativi ai supporti sia del campione che del microscopio. Tuttavia si è notato che già durante la fase di accoppiamento piccolissimi spostamenti dei micrometri portavano a evidenti cambiamenti del segnale rivelato dal fotodiodo. Perciò sono sufficienti anche piccole vibrazioni dell'apparato per spostare il microscopio o il campione dalla configurazione iniziale e compromettere la corretta rivelazione del segnale.



(a) Segnale in uscita dalla guida d'onda al variare del tempo in una misura della durata di 2h.



(b) Segnale in uscita dalla guida d'onda durante una misura di 40 minuti.



(c) Andamento dei flussi durante la medesima misura.

Figura 2.2: Grafici del segnale della guida d'onda e dei flussi che dimostrano la non correlazione tra l'instabilità dell'accoppiamento e quella del flusso delle soluzioni.

Un secondo effetto a cui si potrebbe attribuire la causa dell'instabilità dell'apparato è il flusso costante delle pompe microfluidiche. Alcune misure di sono state effettuate a verifica dell'ipotesi, tuttavia i dati osservati la smentiscono. In particolare si sono svolte delle acquisizioni analoghe alla precedente (stavolta della durata di 40 minuti) ma comprensiva anche dei dati relativi ai flussi delle pompe (la possibilità di acquisire i dati dei flussi è disponibile nel relativo programma di controllo).

Si riporta un grafico relativo al segnale in uscita dalla guida e un secondo che rappresenta l'andamento del flusso dell'olio che è stato immesso nel canale del chip durante la misura. Come si vede in figura 2.2 (b) in 1500 s è presente una variazione del segnale pari al 10% e la media delle misure attorno a 11V/V presenta fluttuazione casuali attorno al 5%, mentre nei successivi 1000 s si nota una variazione percentuale del segnale di $3/8$ V/V che corrisponde a circa il 40%. Nel grafico in figura 2.2 (c) si nota invece una variazione del segnale di $3.5/12$ pari al 30% fino a 1200s e del 30% per i restanti 600s, con fluttuazioni casuali del 5%. Dai grafici in figura 2.2 sembrerebbe che, dopo circa 25 minuti di acquisizione, in corrispondenza del brusco calo di segnale si verifichi una variazione del flusso dell'olio. Tuttavia si nota che anche dopo 6 minuti è presente una variazione del flusso, ma ciò non ha riscontro nel segnale. Per questo motivo si riconosce che l'instabilità dell'accoppiamento non è da attribuire alle variazioni del flusso immesso nel canale o se non altro questo contributo risulta trascurabile rispetto ad altri fenomeni che non sono emersi nel corso dell'esperienza.

2.3 Caratterizzazione del beam splitter

La procedura seguita per misurare la percentuale di intensità luminosa che viene riflessa dal beam splitter richiede una modifica del setup sperimentale. Si imposta come segnale di ingresso nell'amplificatore lock-in il fascio laser riflesso e si collega al modulo il fascio trasmesso come segnale di riferimento. Il segnale in trasmissione viene raccolto da un fotodiodo posizionato dietro il beam splitter. Come per le misure di stabilità si sono registrati i dati acquisiti per un tempo di circa un'ora. A seguire viene riportato il grafico che li rappresenta.

I dati raccolti mostrano un andamento decrescente, probabilmente dovuto ad una iniziale stabilizzazione degli strumenti. Si è selezionato allora un intervallo di tempo entro cui il segnale risulta stabile (tra 1500 e 4000 secondi) e se ne è estratto il valore medio con il relativo errore. I risultati ottenuti sono i seguenti:

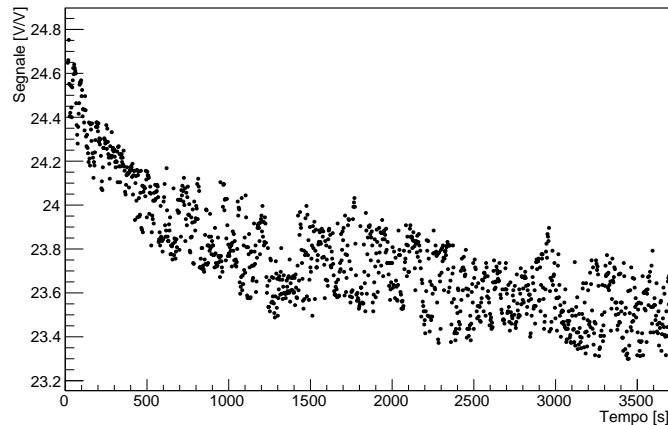


Figura 2.3: Segnale del fascio laser rifleso dal beam splitter.

Segnale rifleso percentuale [V/V]	Deviazione standard [V/V]
23.622 ± 0.005	0.2

3 Trasmittanza: approccio standard

Il protocollo definito per la realizzazione di queste misure di assorbimento consiste nelle seguenti fasi:

- realizzazione delle soluzioni a diversi valori di pH secondo le modalità descritte nella sezione 2.1;
- misura del pH di campioni di soluzioni per mezzo di un pHmetro;
- aggiunta dell'indicatore di pH ai campioni;
- realizzazione delle misure di assorbimento tramite lo spettrofotometro e acquisizione dati;
- analisi dei dati registrati mediante la rappresentazione grafica che mette in relazione la trasmittanza dei campioni analizzati con il rispettivo valore di pH.

Per le misure di trasmittanza con lo spettrofotometro i parametri impostati sono: la grandezza che si desidera misurare, l'acquisition time e l'intervallo di lunghezza d'onda entro cui indagare gli spettri di assorbimento. Si è deciso di misurare la trasmittanza in modo da poter fare un confronto tra i dati rivelati in questo modo e quelli acquisiti nelle misure con il chip. Inoltre si è lavorato entro una banda stretta di lunghezze d'onda, quella del visibile tra 350nm e 750nm perchè l'interesse è di osservare come

varia l'assorbimento della luce attorno alla lunghezza d'onda corrispondente al rosso, dato che si usa un indicatore che presentano un viraggio di assorbimento nel range del visibile.

Si sono preparati quindi i campioni da analizzare: circa 5mL di soluzione sono inseriti in una cuvetta in plastica (sezione con cammino ottico di 1cm), la quale viene posizionata nel porta campioni dello strumento. Con le specifiche procedure viene eseguita l'analisi del campione ed è possibile osservare subito i dati acquisiti in un grafico che mostra l'intensità trasmessa dalla soluzione in funzione della lunghezza d'onda a cui è stata eccitata. Per ogni misura si è considerata come intensità di riferimento quella trasmessa da acqua distillata senza indicatore, contenuta nella medesima cuvetta.

3.1 Studio della concentrazione di indicatore

L'operazione preliminare che si è svolta prima di mettere in pratica le fasi sopra citate è stato uno studio sistematico per stimare la quantità di indicatore che è opportuno aggiungere alle soluzioni per ottenere dei chiari risultati nelle misure. Come per tutti gli indicatori di pH è nota anche per il blu di bromotimolo la quantità che il produttore consiglia di aggiungere alla soluzione da testare per non interferire con il pH del campione, ovvero 1mL di indicatore su 25mL di soluzione. Tuttavia si è voluto verificare quanto la concentrazione di indicatore influisca sulla trasmittanza di una soluzione.

A tale scopo si è misurata la trasmittanza di un campione di 5ml di acqua distillata con alcune prove: nella prima non è stato aggiunto indicatore, nelle successive 5 ne sono stati aggiunti $20\mu\text{L}$ di volta in volta, mentre nelle ultime due prove si è proceduto con step di $100\mu\text{L}$. Il colore del campione è passato da trasparente a giallo tenue fino al giallo intenso. In figura 3.1 vengono riportate le misure di trasmittanza $T\%$ rispetto all'acqua. Nel grafico è evidente come lo strumento sia sensibile a piccole variazioni della concentrazione di indicatore. La misura di trasmittanza relativa all'acqua distillata si riconosce perchè ha un valore del 100% , mentre all'aumentare della quantità di indicatore, la percentuale di radiazione trasmessa diminuisce fino a che la luce non è completamente assorbita dalla soluzione che contiene $300\mu\text{L}$ di blu di bromotimolo. Il segnale emesso dai campioni contenenti l'indicatore presenta un minimo in corrispondenza della lunghezza d'onda $\lambda = 430\text{nm}$.

A fronte di questo studio si è concluso che la concentrazione ideale di indicatore da utilizzare nell'esperienza è pari al 1.6% v/v, il valore minimo per ottenere un segnale di trasmittanza tale da poter distinguere le varie soluzioni.

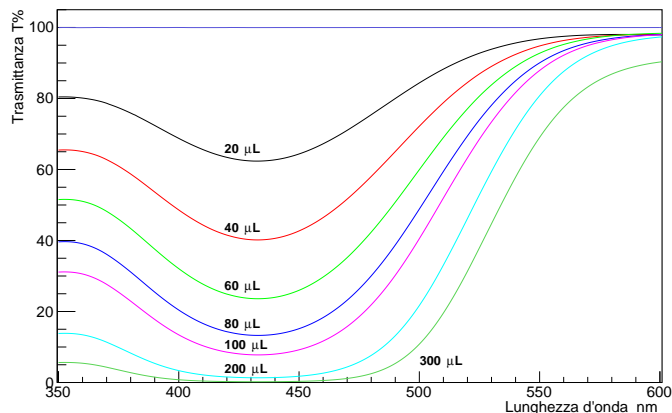


Figura 3.1: Spettri di assorbimento di una soluzione di acqua con diverse concentrazioni di blu di bromotimolo. La curva a valore costante 100 rappresenta la trasmittanza dell'acqua senza indicatore, sulle altre curve sono indicati i μL totali di indicatore aggiunti al campione.

3.2 Acquisizione e analisi dati: misure di assorbimento con spettrofotometro

Per prima cosa si sono caratterizzate le varie soluzioni misurandone il pH con un pH-metro (la sensibilità dello strumento corrisponde al digit: 0.01). Per ciascuna soluzione si sono eseguite quattro misurazioni e se ne è calcolato il valore medio con il relativo errore, indicati in tabella 1. Dopo aver aggiunto l'indicatore, si è proceduto all'analisi degli spettri con lo spettrofotometro in modo da verificare qualitativamente se, attorno alla lunghezza d'onda di 632.8nm , corrispondente al rosso, le curve di assorbimento si disponessero in modo coerente con i valori di pH misurati. Al crescere del valore di pH tali soluzioni presentano una gradazione di colore che si sposta sempre più verso il blu, dunque ci si aspetta che nella regione del rosso il valore della trasmittanza percentuale tenda a diminuire. Infatti una soluzione molto basica, dunque di colore blu intenso, assorbe completamente la radiazione emessa nella lunghezza d'onda del rosso mentre, una soluzione neutra, che si presenta di colore giallo, la trasmette con una certa percentuale che sarà massima per la soluzione a pH più basso. I risultati ottenuti sono riportati in figura 3.2 e rispecchiano le previsioni fatte.

Dal grafico degli spettri di assorbimento è riconoscibile il punto isobestico² in cui si intersecano gli spettri a circa 500nm . Si osserva inoltre che tutte le curve presentano un minimo locale in corrispondenza della lunghezza d'onda $\lambda = 617\text{nm}$ che corrisponde al colore arancio nello spettro del visibile, un risultato atteso dal momento che il viraggio di colore di tali soluzioni si trova attorno al verde.

²Il punto isobestico indica una precisa lunghezza d'onda a cui la trasmittanza di un campione rimane costante nonostante il campione subisca cambiamenti chimici o fisici. Nel presente lavoro è qualificabile come una regione di ampiezza 18nm .

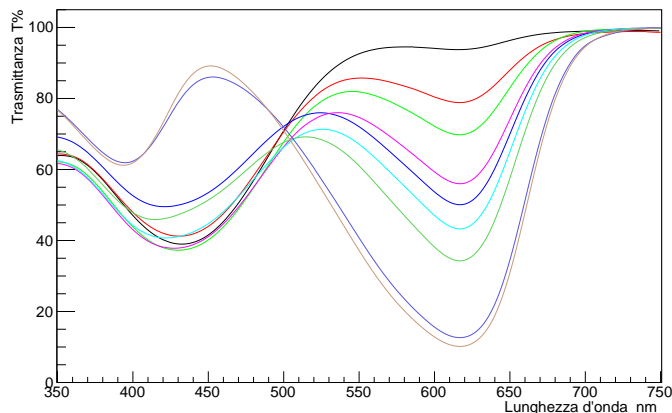


Figura 3.2: Spettri di assorbimento delle soluzioni con blu di bromotimolo.

Per svolgere l'analisi di questi dati e ricavare una stima di trasmittanza confrontabile con quella delle successive misure si è applicato il seguente procedimento: si è selezionata una curva nella regione centrale del grafico, in particolare quella che in figura 3.2 compare di colore azzurro. A partire da questa si sono ricavati i parametri necessari per poter calcolare l'integrale di tutte le curve mantenendo per ognuna la stessa baseline, ovvero la retta che interpola le code degli spettri (visibili nella parte destra del grafico).

Sono stati isolati i punti appartenenti all'intervallo di lunghezze d'onda tra 550 e 650nm e si è eseguito un fit gaussiano attorno al centroide della curva scelta ottenendo le stime di media e varianza. Per ogni curva si è quindi calcolato l'integrale, inteso come il valore che rappresenta l'area compresa tra la curva e la baseline e limitata entro una regione di larghezza pari a 1σ .

I valori così ottenuti sono stati disposti in un grafico in funzione del pH.

Al crescere del pH le soluzioni presentano una colorazione sempre più verso il blu, perciò la trasmittanza in corrispondenza della lunghezza d'onda relativa al rosso è progressivamente decrescente. Di conseguenza il valore dell'integrale calcolato risulta crescente, come si vede dal grafico in figura 3.3.

4 Misure di trasmittanza: approccio opto-microfluidico

Le operazioni principali che riassumono il procedimento con cui è stato svolto il lavoro di questa sezione sono le seguenti:

- preparazione del set di campioni delle stesse soluzioni che sono state preparate precedentemente, in quantità pari a circa 10ml per ciascuna soluzione;

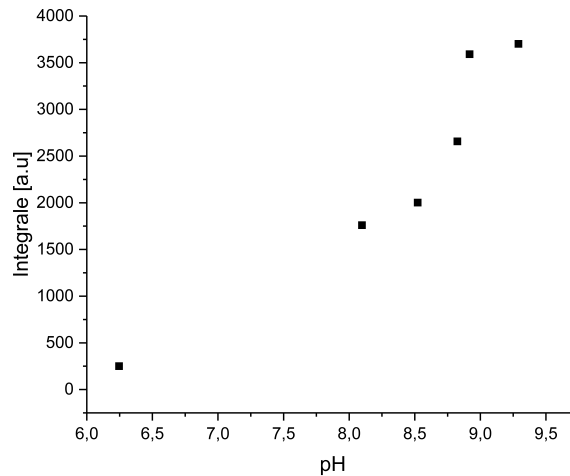


Figura 3.3: Grafico degli integrali in funzione del pH.

- realizzazione delle misure in flusso all'interno del canale microfluidico del chip e acquisizione dati con l'apposito software;
- analisi dei dati ottenuti con lo scopo di mostrare graficamente l'andamento della trasmittanza dei campioni in funzione del pH.

4.1 Tecnica di accoppiamento in guida

Le misure in flusso sono state realizzate con il setup near-field descritto precedentemente e con l'apparato microfluidico composto da tre pompe con sensori di flusso e pressione. L'apparato è schematizzato nel suo complesso in figura 4.1. La parte fondamentale che precede l'acquisizione dei dati consiste nell'accoppiare la guida con il fascio laser e con il canale microfluidico secondo la procedura che verrà descritta di seguito.

Il metodo applicato comprende varie fasi: dopo aver sistemato il chip sull'apposito supporto, lo si posiziona agendo sui micrometri, alla distanza focale della lente che fa convergere il fascio laser che equivale circa a 1mm . Quindi, muovendo i micrometri del microscopio si mette a fuoco l'interfaccia superiore niobato-vetro sul primo obiettivo dello stesso, ad una distanza di circa 1cm . I micrometri dell'apparato hanno una sensibilità dell'ordine di $1\mu\text{m}$ e per impostare la configurazione di accoppiamento si sono compiuti spostamenti con step dell'ordine dei decimi di mm . Successivamente, muovendo attentamente il chip con i micrometri del suo supporto, lo si posiziona nella configurazione in cui si riesce a distinguere sull'oculare del microscopio la guida d'onda eccitata dal laser che si presenta come un punto

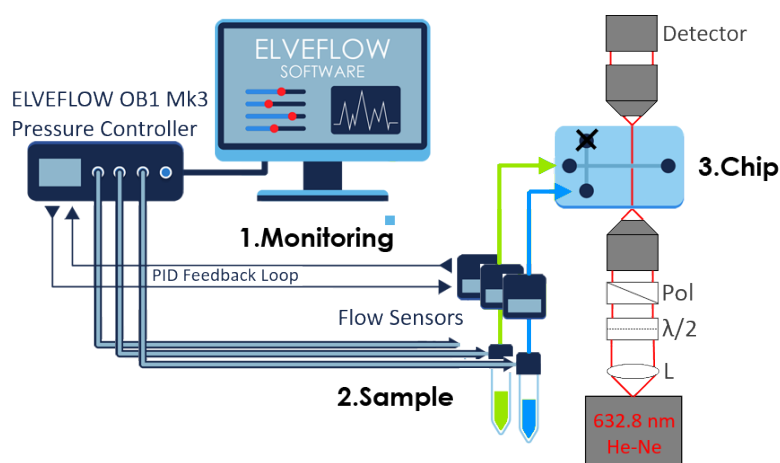


Figura 4.1: Schema del setup sperimentale per le misure in flusso. La freccia verde rappresenta l'olio (esadecano), la freccia blu rappresenta le soluzioni acquose che vengono immesse nel canale microfluidico del chip.

molto luminoso. A questo punto, si sposta il fuoco del microscopio sull'oculare posteriore che presenta una superficie filettata e, una volta identificato il segnale in uscita, vi si monta, avvitandolo, il fotodiodo. Il principio near field permette di acquisire l'immagine 2D della distribuzione spaziale dell'intensità del fascio luminoso crescente della guida all'aumentare della trasmittanza ottica. L'integrazione del segnale in uscita fornisce una quantità proporzionale all'intensità della radiazione rivelata.

4.2 Stadio microfluidico

Il meccanismo con cui i fluidi vengono immessi nel canale all'interno del chip necessita dell'utilizzo di tre pompe microfluidiche con sensori di controllo sia in flusso che in pressione. L'intervallo di pressione entro cui le pompe possono lavorare arriva fino a 8bar (per tre canali) e a 200mbar (il quarto canale), mentre il range di lavoro dei flussi arriva fino a $3.3\text{mL}/\text{min}$.

Generalmente per la realizzazione di un sistema di fluidi che scorrono in un canale di dimensioni così ridotte si utilizzano soluzioni immiscibili con caratteristiche diverse: una chiamata fase continua che al tatto risulta oleosa e la seconda chiamata fase dispersa che ha una consistenza acquosa. In questa esperienza la fase dispersa è rappresentata dalle soluzioni a diverso pH e quella continua da una soluzione di esadecano³ e SPAN[®] 80⁴ (con una concentrazione pari a 0.08% w/w), un surfattante utile ad aumentare la tensione interfacciale tra i due fluidi. In realtà l'uso di un prodotto con questa caratteristica è rilevante

³Esadecano: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$, CAS number: 544-76-3, $M_m = 226.44\text{g mol}^{-1}$.

⁴SPAN[®] 80: $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_6$, CAS number: 1338-43-8, $M_m = 428.62\text{g mol}^{-1}$.

solo quando si eseguono le misure in goccia. Tuttavia anche per le misure in flusso è stato aggiunto il surfattante all'olio per evitare che il voltaggio differisse in qualche modo dal caso delle misure in goccia.

Per realizzare le misure in flusso si sono alternate immissioni nel canale di olio e soluzione, così da assicurarsi di avere una normalizzazione dovuta agli effetti di disaccoppiamento. Dopo che si è fatto scorrere l'olio (quindi dopo alcuni minuti di registrazione dei dati) è necessario riallineare l'accoppiamento mettendo mano all'apparato. I fluidi vengono iniettati da due entrate distinte, la terza viene otturata assicurandosi che anche il terzo canale di entrata sia stato riempito di liquido. La procedura seguita, una volta che è stato individuato il segnale della guida di luce, consiste nel lasciar fluire nel canale la fase continua per alcuni minuti fino a che il flusso non è stabile ad un regime di $20\mu L/min$, quindi si registrano i dati acquisiti per un tempo di circa 3 minuti. In seguito si fa scorrere la prima soluzione e allo stesso modo, quando il flusso, allo stesso regime, diventa stabile si registrano i dati per un intervallo temporale analogo.

4.3 Metodo di acquisizione dei dati: circuito opto-microfluidico

Per visualizzare l'informazione all'uscita della guida utilizzando l'oscilloscopio è necessario convertire il segnale in corrente del fotodiode in un segnale in tensione. Quando la guida è ben centrata sul rivelatore il segnale in corrente ha intensità dell'ordine dei nA , troppo debole per essere distinto dal rumore di fondo dell'apparato. Per questi motivi si collega una transimpedenza in serie al fotodiode che ha lo scopo di amplificare il segnale con un guadagno di 10^7 oltre a convertirlo ad un segnale in tensione. Al fine di visualizzare il segnale come un'onda quadra, e quindi, per poterne stimare in modo approssimativo l'ampiezza, si utilizza l'optical chopper impostando una frequenza opportuna.

Basandosi sull'osservazione del segnale sul display dell'oscilloscopio si trova la posizione ottimale del campione agendo sui micrometri. Infatti, quando si identifica la configurazione tale per cui l'ampiezza del segnale è massima, generalmente 3 o 4V, significa che l'accoppiamento è stato raggiunto in modo ottimale e in effetti si può osservare sul microscopio che la guida è molto illuminata. Il fotodiode viene ora collegato all'amplificatore lock-in e il segnale in uscita, che ora è dell'ordine delle decine di Volt, è trasmesso al computer. I dati acquisiti sono visualizzati grazie al programma in un grafico funzione del tempo. Le misure così svolte vanno a studiare l'assorbimento della luce da parte di una soluzione colorata.

4.4 Analisi dati

In questo set di misure sono state utilizzate sei soluzioni. Come descritto in precedenza le misure sono state eseguite alternando all'immissione delle soluzioni nel canale, quella dell'olio così da poter

normalizzare il segnale relativo a ciascuna soluzione al segnale in tensione relativo all'olio che è fluido precedentemente nel microcanale e per normalizzare gli spostamenti dovuti ai micrometri. Durante l'acquisizione delle coppie soluzione-olio l'apparato strumentale non viene toccato.

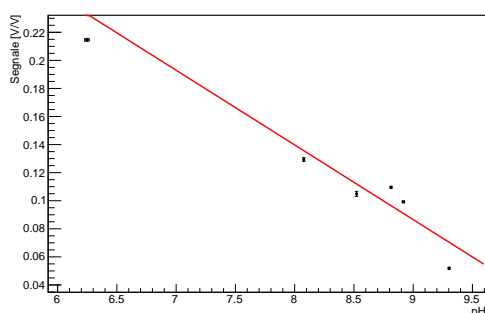
A partire dai file di dati raccolti si è selezionato da ognuno un intervallo di valori che avesse andamento costante e che contenesse circa 300 punti, quindi se ne sono estratte la media e la deviazione standard. I valori dei segnali così ottenuti sono stati normalizzati a quelli dell'olio corrispondente e si sono disposti in un grafico in funzione del pH che viene riportato in figura 4.2.

Dal momento che non si conosce a priori l'andamento che i dati dovrebbero mostrare si sono formulate due ipotesi atte a fornire un'interpretazione fisica.

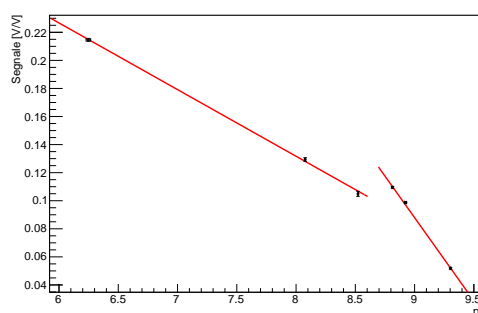
a) Linearità: la prima di queste è che la dipendenza della trasmittanza dal pH sia lineare. Si sono dunque interpolati i dati con un polinomio di primo grado del tipo $y = Ax + B$ e si è ottenuto il fit lineare rappresentato in figura 4.2. Dall'analisi dei residui si può affermare che questo modello è valido per descrivere i dati sperimentali. Si osserva che il coefficiente di correlazione è 0.998, tuttavia il χ^2 è elevato e ciò suggerisce la necessità di ritenere valido il modello solo per un basso livello di confidenza.

b) Andamento a ginocchio: si potrebbe pensare che in realtà i dati nel grafico in questione mostrino due andamenti lineari in sequenza, approssimabili con due rette con un diverso coefficiente angolare. Con questa seconda ipotesi si è costruito il grafico che compare in figura 4.2 (b) il quale mostra i due fit lineari.

In prima approssimazione i dati presentano un andamento lineare in cui si differenziano due regimi: i primi tre valori sono interpolati con una retta dalla pendenza più dolce rispetto a quella della retta che interpola i restanti tre. Tuttavia i dati raccolti non sono sufficienti per poter affermare di aver riscontrato una tendenza univoca.



(a) *Fit lineare unico.*



(b) *Fit a ginocchio.*

Figura 4.2: *Grafico dei segnali della luce trasmessa dalle soluzioni normalizzati all'olio in funzione del pH.*

Per confrontare i due modelli statistici si è valutato il livello di confidenza dei fit. Per quanto riguarda

Tabella 2: Parametri relativi ai fit lineari eseguiti per l'analisi dei flussi delle soluzioni. Il parametro indicato con "A" rappresenta il coefficiente angolare della retta, mentre quello indicato con "B" è l'intercetta.

	N	A [a.u.]	B [a.u.]	r_C	χ^2
Fit unico	6	-0.0532 ± 0.0006	0.565 ± 0.005	-0.998	1700
Fit "a ginocchio"	3	-0.0475 ± 0.0009	0.512 ± 0.007	-0.992	2.25
		-0.119 ± 0.002	1.155 ± 0.018	-0.991	2.91

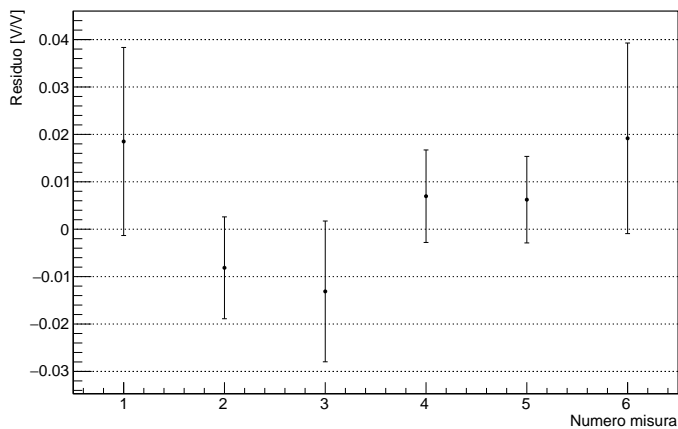


Figura 4.3: Grafico dei residui relativi al fit lineare unico.

il fit unico il valore del χ^2 elevato suggerisce che il livello di confidenza sia molto basso, il che significa che ripetendo le misure considerando valido tale modello lineare la probabilità di riottenere gli stessi risultati è irrisoria. In effetti è evidente dal grafico come gli errori associati alle quantità in ordinata non si sovrappongano alla retta interpolante. Il fit realizzato invece con due interpolazioni lineari successive, considerando i gradi di libertà e il χ^2 equivalente, presenta un livello di confidenza pari al 10%. Per questo motivo si ritiene che l'ipotesi che i dati seguano un profilo lineare e decrescente con due diverse pendenze rappresenti in modo migliore i dati sperimentali.

5 Misure in goccia

In questa parte del lavoro di tesi si è voluta perfezionare la tecnica di misura della trasmittanza delle soluzioni con l'utilizzo del chip microfluidico. La differenza nel metodo di misura consiste nell'immissione della soluzione da analizzare nel canale del chip sotto forma di una serie di gocce piuttosto che come flusso continuo. Così facendo si ha la possibilità di normalizzare il segnale di ciascuna goccia a quello dell'olio precedente con un rapporto 1:1 e quindi di mantenere coerenza tra le varie misurazioni riducendo l'errore dovuto a vibrazioni dell'apparato.

Il protocollo di misura adottato è il seguente:

- preparazione dei campioni di soluzione da analizzare in modo analogo alla parte relativa alle misure in flusso;
- esecuzione delle misure di assorbimento introducendo le soluzioni nel chip con un procedimento tale da iniettarle in forma di goccia e raccolta dati;
- elaborazione dei dati acquisiti con rappresentazione grafica conclusiva che riassume i risultati ottenuti.

5.1 Tecniche di realizzazione delle gocce

Uno degli scopi principali per la costruzione di un chip con le caratteristiche descritte è la generazione di gocce di fluido all'interno del microcanale. In applicazioni sofisticate le gocce possono agire da involucro mediante cui trasportare sostanze chimiche o biologiche, o in generale per condurre studi bio-fisici. La produzione di gocce realizzata per questo lavoro è basata su un meccanismo passivo in cui due fluidi immiscibili si incontrano nella giunzione del canale microfluidico del chip, generando così gocce. Sono

stati studiati e messi a punto svariati metodi per creare gocce e, sfruttando la geometria a croce del canale nel chip utilizzato, due di tali tecniche potevano essere applicate.

La prima, detta *flow-focusing*, consiste nel far fluire la fase continua in direzione perpendicolare alla fase dispersa utilizzando le tre entrate e l'uscita del canale. All'incrocio della giunzione la fase continua strozza quella dispersa e la goccia viene creata. Il vantaggio di questa tecnica è l'alta stabilità quando si producono gocce in un ampio range di frequenze. Tuttavia la frequenza di produzione delle gocce dipende da molti parametri legati alle proprietà dei fluidi e ciò crea difficoltà per le possibili applicazioni del chip.

La seconda invece è detta *cross-flowing*. In questo metodo una delle entrate laterali del canale a croce viene otturata, la fase dispersa viene immessa nel canale dalla restante entrata laterale e incrocia ad un angolo retto la fase continua che invece fluisce lungo il canale principale. Quando i due flussi si incontrano alla giunzione la fase dispersa invade il canale principale e viene trascinata dalla fase continua che subito ne provoca lo strozzamento del flusso e quindi la formazione di una goccia.

Entrambi questi metodi passivi di produzione di gocce richiedono il controllo di alcuni parametri caratteristici: il flusso della fase continua (Q_c) e della fase dispersa (Q_d); il rapporto dei flussi $\phi = Q_d/Q_c$ da cui dipende la velocità delle gocce e le pressioni (p_c e p_d) con cui le due fasi sono iniettate nel canale. Tramite i flussimetri delle pompe è possibile impostare le pressioni, misurate in *mbar*, quindi lo strumento misura i flussi generati e grazie a un sistema di feedback è possibile impostare il flusso desiderato in $\mu L/min$.

Il processo di formazione delle gocce si può vedere chiaramente al microscopio, un esempio è riportato in figura 5.1.

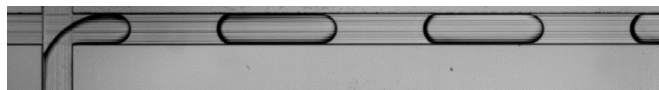


Figura 5.1: Canale microfluidico visto al microscopio in cui vengono prodotte gocce con il metodo del *cross-flowing*. Si riconoscono le gocce formate dalla fase dispersa (soluzione acquosa) immerse nella fase continua (esadecano).

5.2 Metodo di acquisizione dei dati

Anche per questa tipologia di misure è stato utilizzato il setup riassunto in figura 4.1. Il principio sfruttato consiste nel far fluire all'interno del microcanale del chip due fluidi immiscibili e il meccanismo con cui le gocce vengono generate è quello del *cross-flowing*. In particolare in questo lavoro sono state

usate come fase dispersa le soluzioni acquose e come fase continua una soluzione viscosa di esadecano e SPAN[®]80. L'uso del surfattante è indispensabile per la formazione delle gocce poichè riduce la tensione superficiale del fluido che comporta l'aumento della bagnabilità del canale con cui entra in contatto.

In questo set di misure sono stati impostati i regimi di $40\mu L/min$ per il flusso delle soluzioni e $20\mu L/min$ per quello dell'olio. Utilizzando questi parametri e questa configurazione ognuna delle gocce che si formano nel canale impiega in media $27ms$ per attraversare il diametro della guida d'onda. Il segnale elettrico rivelato dal fotodiodo, espresso in termini di differenza di potenziale (V_{drop}/V_{oil}), rappresenta l'intensità trasmessa dalla soluzione analizzata. Tale segnale viene trasmesso al computer e con un apposito programma (realizzato con Lab View) è possibile visualizzare al momento i dati acquisiti con una frequenza fino a $200KHz$ grazie alla FAST card. In un grafico della tensione in funzione del tempo è facilmente distinguibile il passaggio di una goccia illuminata dalla guida d'onda. Infatti, il segnale rivelato al passaggio della soluzione ha un valore evidentemente inferiore rispetto a quello relativo all'olio, questo grazie al differente indice di rifrazione dei due fluidi come spiegato al paragrafo 2.2. A titolo di esempio si riporta in figura 5.2 una frazione del segnale osservato in cui è ben visibile il passaggio di una goccia. Anche per questo set di dati è necessario attendere alcuni minuti prima che i flussi siano stabili, quindi si procede con la registrazione dei segnali.

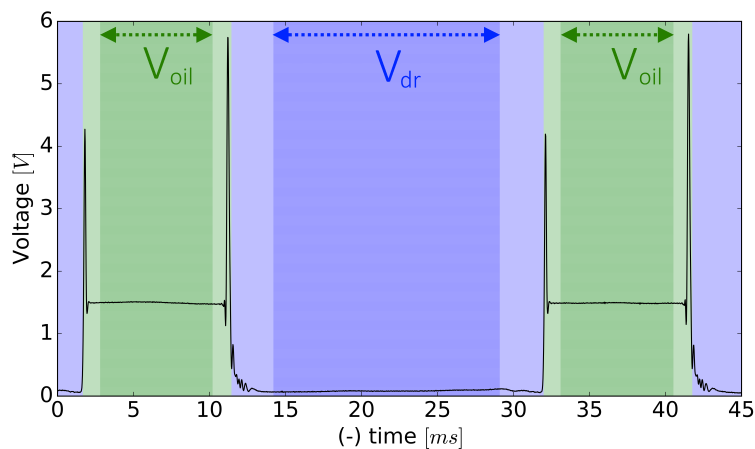


Figura 5.2: Segnale in tensione in uscita dalla guida di luce durante il passaggio di gocce d'acqua nel canale. Si distingue il segnale trasmesso dall'olio, in verde, di circa 2V e quello trasmesso dall'acqua, in azzurro, di poco superiore a 0V. I picchi che arrivano a 4 e 5.5V sono dovuti a effetti di riflessione della luce dai menischi delle gocce. Nella figura sono evidenziate con un colore più tenue gli intervalli di dati che sono stati esclusi dal calcolo del valore medio dei plateau. Sono evidenti in queste regioni i picchi secondari, di entità molto inferiore rispetto a quelli relativi ai due menischi.

5.3 Analisi dati

Per l'analisi di queste misure è stato utilizzato un software ad hoc: il programma creato è in grado di restituire in output, oltre alla lunghezza media delle gocce che si formano nel canale, il valore del segnale della luce laser in uscita dalla guida d'onda dopo che ha attraversato una goccia di soluzione a partire dal file creato al momento dell'acquisizione. Il principio studiato per ricavare quest'ultimo parametro è il seguente: come si vede in figura 5.2, il file in input è caratterizzato dall'alternanza del segnale relativo all'olio e del segnale relativo ad una goccia, distinguibile per il fatto che ha in generale intensità inferiore rispetto al plateau dell'olio. Il programma seleziona i dati riferiti ad una goccia (escludendo entro una certa soglia i dati relativi ai due menischi) e ne calcola il valore medio. Quest'ultimo viene poi normalizzato sul valor medio del segnale relativo all'olio che è fluito subito prima di tale goccia e alla lunghezza (calcolata come intervallo di tempo) della goccia stessa. In formule, partendo dalle coppie $(V_{dr,i},i)$ e $(V_{oil,i},i)$ dove V_{dr} e V_{oil} indicano i segnali in tensione in Volt corrispondenti alle gocce e all'olio e i è il tempo in secondi, i valori calcolati sono i seguenti:

$$Segnale = \frac{\sum_{t_{inizio}}^{t_{fine}} V_{dr,i}}{V_{oil,i}[t_{fine} - t_{inizio}]} \quad (6)$$

Con questa procedura di normalizzazione si rende minimo il contributo di errore dovuto a vibrazioni del sistema e a modifiche dell'intensità del segnale acquisito dovute ad artefatti di misura indotti da instabilità nel tempo. Infine il programma fornisce la media di tutti i segnali normalizzati, in numero pari al numero delle gocce analizzate.

I risultati così ottenuti per ognuna delle cinque soluzioni prese in esame vengono riportati in funzione del rispettivo pH in un grafico che ne mette in evidenza l'andamento.

Come si osserva in figura 5.3, la soluzione a pH 8.5 ha intensità del segnale compatibile con quello relativo alle soluzioni a pH 8.6, 8.9, 9.3, sintomo che con il metodo adottato non si è riusciti a discriminare i diversi pH delle soluzioni prese in analisi. A riprova di questo fatto si sono interpolati tali valori con una retta del tipo $y = Ax + B$ e, come si può vedere in tabella 3, risulta che la pendenza A è compatibile con lo zero. Inoltre non si riconosce un andamento dei dati particolare come nel caso delle misure degli spettri di assorbimento e delle misure in flusso. Tuttavia è evidente una variazione del segnale pari al 20%, probabilmente in corrispondenza del valore di viraggio dell'indicatore.

Tale risultato può essere dovuto a cause di carattere fisico e metodologico. Per esempio la bassa risoluzione potrebbe essere dovuta alla dimensione delle gocce: se vengono prodotte gocce troppo lunghe si verificano fenomeni di scattering e di rifrazione della luce che le attraversa, noti come "effetto lente",

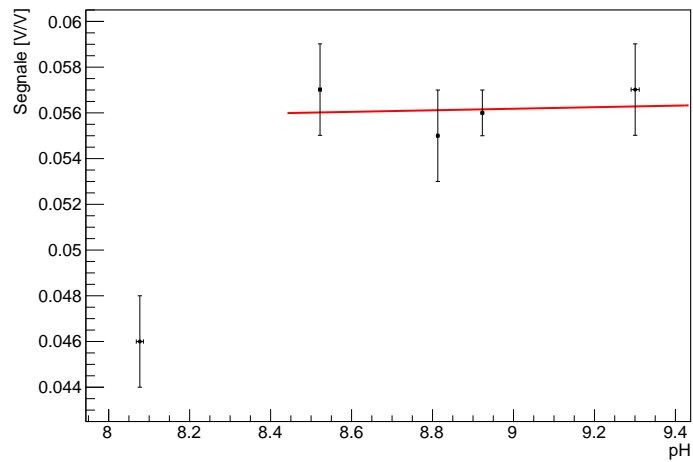


Figura 5.3: Grafico del segnale in uscita dalla guida d'onda dopo aver attraversato una goccia di soluzione in funzione del pH.

Tabella 3: Parametri del fit lineare relativi ai dati forniti dalle misure in goccia.

N	A	B	r_C	χ^2
4	$(33.8 \pm 3.6)10^{-3}$	$(5.3 \pm 3.2)10^{-2}$	0.9997	0.72

che alterano la trasmittanza della luce all'uscita dalla guida. Inoltre, se il valore dei flussi è troppo basso è probabile che la lunghezza delle gocce non sia costante nel corso di una misura.

Un'altro effetto che è stato osservato nel corso dell'esperienza è che l'indicatore di pH utilizzato (il blu di bromotimolo) è affetto da aging, ovvero, una volta che questo viene aggiunto alle soluzioni il loro colore vira nel tempo in maniera visibile già dopo 24h dalla preparazione. Dato che le misure sono state effettuate alcune ore dopo aver aggiunto l'indicatore alle soluzioni poichè non era ancora stato notato il fenomeno del deterioramento dell'indicatore, è probabile che conseguentemente al cambiamento di colore le misure di trasmittanza della radiazione laser siano state compromesse.

5.4 Misure con gocce piccole

Per verificare se il problema della scarsa risoluzione riscontrato nelle misure in goccia è dovuto alla lunghezza con cui esse sono prodotte, e quindi ai regimi di flusso impostati, si sono svolte delle misure in cui sono stati variati i valori dei flussi dell'olio. In questo caso si sono utilizzate quattro soluzioni la cui discriminazione cromatica fosse ben evidente: giallo, verde chiaro, verde scuro e blu. Essendo quest'ultimo uno studio sull'influenza del flusso d'olio immesso nel canale sulla risoluzione della trasmittanza ottica non è rilevante conoscere il pH delle soluzioni testate, è sufficiente il fatto che esse siano distinguibili dal colore.

Con le stesse quattro soluzioni si sono realizzati tre set di misure dove si sono impostati i seguenti regimi di flusso: $10\mu L/min$ per le soluzioni in tutte le prove; $60, 100$ e $120\mu L/min$ per l'olio. In questo modo i tempi impiegati dalle gocce per percorrere il diametro della guida sono in media rispettivamente $3.5, 1.8, 1.4ms$. Per queste prove è stata utilizzata la tecnica del flow-focusing, descritta al paragrafo 5.1, che permette di ottenere gocce di dimensione costante.

I dati sono stati acquisiti nello stesso modo delle misure precedenti e sono stati analizzati con un programma analogo. In questo caso si è osservato che il segnale delle gocce piccole non presenta un plateau, perciò si è usato un programma di analisi che calcola l'integrale del segnale relativo alle gocce di soluzione e li normalizza al segnale medio dell'olio adiacente e alla lunghezza della goccia. In formule, questo equivale al seguente calcolo:

$$Segnale = \frac{\int_{t_{inizio}}^{t_{fine}} V_{drop,i} dt}{V_{oil,i}[t_{fine} - t_{inizio}]} \quad (7)$$

Un esempio del segnale acquisito è riportato in figura 5.4 dove è rappresentata in azzurro l'area calcolata con l'integrale e in verde più carico la regione dove si è calcolata la media del segnale relativo

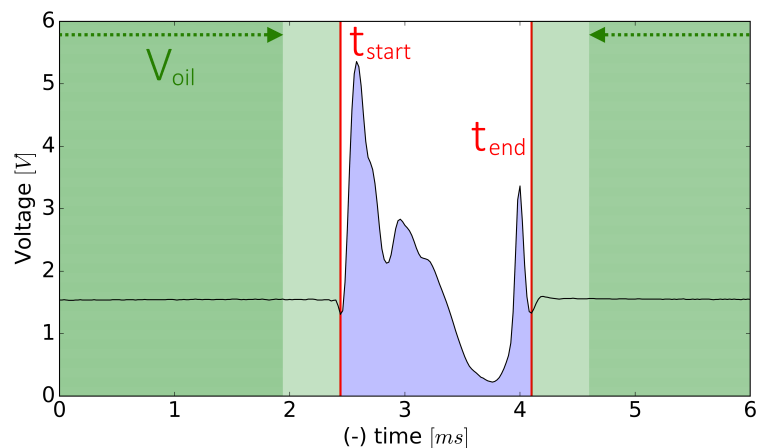


Figura 5.4: Segnale in uscita dalla guida d'onda al passaggio di una goccia piccola.

all'olio. Le diciture " t_{start} " e " t_{end} " indicano i tempi in cui la goccia entra ed esce dal campo visivo della guida d'onda.

La media dei valori degli integrali normalizzati sono quindi inseriti in un grafico in funzione del numero della soluzione che cresce al crescere del pH (la numero 1 corrisponde alla soluzione gialla, la 2 a quella verde chiaro, la 3 a quella verde scuro e la 4 alla blu). I tre set di misura a diversi regimi sono inseriti in un unico grafico in figura 5.5.

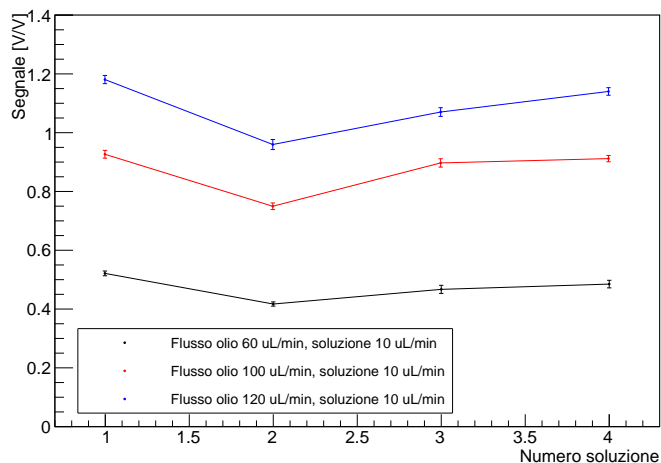


Figura 5.5: Grafico del segnale in uscita dalla guida d'onda al passaggio di una goccia piccola.

Dal grafico si vede che in tutte le tre prove esiste un andamento lineare della trasmittanza al variare del colore della soluzione.

I dati presentano un andamento compatibile nei tre set di misure acquisite, quindi dimostrano che la capacità dello strumento di distinguere soluzioni di colore diverso non dipende dalla rapidità delle gocce

o dalla loro dimensione, inoltre non si distinguono diverse soluzioni. Si è avanzata l'ulteriore ipotesi che la concentrazione dell'indicatore sia troppo bassa in rapporto al volume delle gocce. Prima di ulteriori analisi più approfondite si è deciso di ripetere le misure con un altro tipo di indicatore di pH.

5.5 Soluzioni con nile blue A

Il nile blue A ($C_{20}H_{20}ClN_3O$) è un colorante usato in biologia e in istologia per la sua proprietà di emettere fluorescenza se illuminato con luce ultravioletta. Le soluzioni realizzate per questo set di misure hanno un range di pH compreso tra 10 e 12 e, una volta colorate mostrano un viraggio di colore che va dal blu intenso per la soluzione neutra al rosa per quella più basica. A differenza delle prove precedenti si è scelto di attribuire alle varie soluzioni il valore di pH nominale, ovvero quello che è stato calcolato durante la loro realizzazione. Il motivo di tale scelta risiede nel fatto che, come si è riscontrato nel caso delle soluzioni usate in precedenza, lo strumento per la misurazione del pH non è affidabile e fornisce risultati tra loro molto discordanti, talvolta con compatibilità tra due misure pari a 5. Inoltre lo scopo di questo lavoro di tesi è sviluppare un'applicazione per il dispositivo opto-fluidico che riveli un viraggio nel segnale in base alla diversa trasmittanza. I valori dei pH delle soluzioni non sono per questo motivo determinanti.

Tabella 4: Valori calcolati delle soluzioni con nile blue, errore massimo ≈ 0.1 .

Numero soluzione	pH
1	10.0
2	10.7
3	10.8
4	10.9
5	11.0
6	11.2
7	11.4
8	11.6
9	12.0

Le misure in goccia con il chip microfluidico sono state realizzate con la tecnica del flow-focusing che garantisce più stabilità e i flussi delle due fasi continua e dispersa impostati sono rispettivamente di $60\mu L/min$ e $10\mu L/min$. Con le medesime modalità impiegate nello studio delle soluzioni precedenti si

sono acquisiti i dati con il software a disposizione e in seguito sono stati analizzati. I valori degli integrali normalizzati risultanti sono stati rappresentati in un grafico in funzione del rispettivo pH. Tali risultati, riportati in ordinata nel grafico con la dicitura "Parameter" sono adimensionali, poichè si tratta del rapporto tra misure di tensione relative al segnale trasmesso dalle soluzioni (V_{drop}) e misure di tensione corrispondenti al segnale trasmesso dall'olio (V_{oil}).

Se si aggiunge l'indicatore a soluzioni con pH che va oltre ai limiti dell'intervallo di viraggio, il colore di queste rimane costante nonostante si aumenti o diminuisca il pH oltre a tali limiti. Quindi ci si aspetta che la trasmittanza di soluzioni che hanno pH fino a 10 (che reagendo con l'indicatore diventano tutte di colore blu) sia costante; lo stesso accadrà per soluzioni con valore di pH maggiore di 12 (tutte di colore rosa).

Come accade spesso in fenomeni di interesse fisico, i dati sperimentali di una quantità che stanno in un intervallo di passaggio tra due regioni a valori diversi e costanti hanno un andamento che transisce dolcemente da un regime all'altro seguendo il profilo della funzione matematica che descrive tale andamento, ovvero la funzione degli errori definita nel seguente modo

$$erf(x) := \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt \quad (8)$$

Per questo motivo si prevede che i risultati dell'analisi delle misure di trasmittanza si possano interpolare con una curva di questo tipo che in forma parametrica si scrive come

$$y = A \cdot erf[B(x - x_0)] - y_0 \quad (9)$$

Nello svolgimento dell'analisi si sono realizzati due fit: il primo, rappresentato in rosso in figura 5.6, tenendo conto di tutti i dati e un secondo, indicato in blu, escludendo il valore corrispondente alla soluzione con pH 11.4.

I parametri della funzione interpolante ricavati dai due fit sono i seguenti

Tabella 5: Parametri delle curve di interpolazione dei dati sperimentali relativi alle gocce di soluzioni con Nile Blue A.

	N	A	B	x_0	y_0	χ^2
Fit rosso	9	20.3 ± 3.7	1.3 ± 0.4	10.8 ± 0.1	-105.5 ± 2.9	2.43
Fit blu	8	18.2 ± 1.1	2.9 ± 0.7	10.82 ± 0.03	-106.9 ± 1.1	1.18

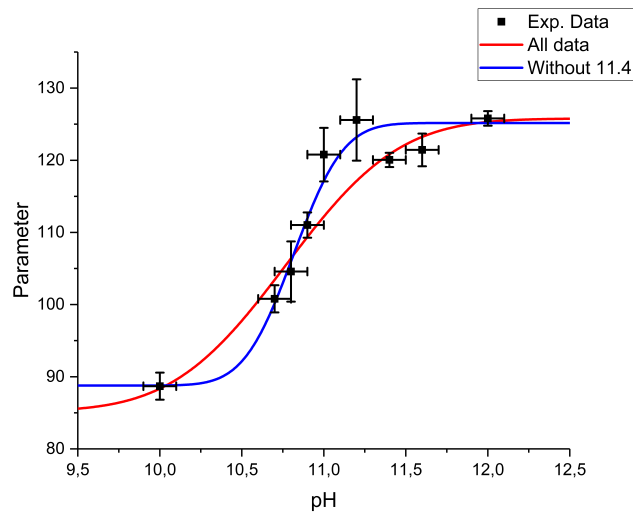


Figura 5.6: Grafico degli integrali normalizzati relativi alle gocce di soluzioni con nile blue in funzione del pH.

Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro era la caratterizzazione optofluidica di un dispositivo per la misura di viraggio chimico di pH su piccole quantità di fluido tramite misure di trasmittanza ottica effettuate con un dispositivo opto-microfluidico. Il dispositivo in questione è composto di un canale microfluidico inciso su un cristallo di niobato di litio e da guide di luce integrate sul substrato e disposte perpendicolarmente al canale che da un lato trasmettono la luce all'interno del canale e dall'altro la raccolgono conducendola alla fase di analisi.

Si è svolto uno studio del chip monitorando il segnale raccolto da un fotodiodo in uscita da una guida di luce per un esteso intervallo di tempo. Questo studio preliminare ha permesso di definire un intervallo ideale di acquisizione dei dati per le misure successive. In particolare si è evidenziato che dopo 2h il segnale acquisito presenta una diminuzione di intensità pari a circa il 60%. Si è avanzata l'ipotesi che il fenomeno fosse dovuto alla variabilità del flusso immesso nel canale microfluidico, ma ulteriori analisi hanno smentito questa teoria. Altre cause del fenomeno sono attribuibili al setup sperimentale, ad esempio alla stabilità dei micrometri dei vari supporti, perciò è opportuno indagare più a fondo, in studi successivi.

Per quanto riguarda la ricerca della tecnica per rivelare il viraggio del segnale di diverse soluzioni si è proceduto per passaggi successivi. Innanzitutto è stato realizzato un set di soluzioni campione per una analisi spettroscopica che ha permesso di verificare la sensibilità nella distinzione di soluzioni con una diversa costante di assorbimento e di quantificare la dose ottimale di indicatore da aggiungere alle

soluzioni. Quindi si è proceduto con le misure di trasmittanza sfruttando l'accoppiamento opto-fluidico del chip: prima eseguendo misure in flusso continuo e in seguito, sfruttando due liquidi, generando microgocce di soluzione. Dai risultati delle misure in flusso è emersa la possibilità di osservare un viraggio della quantità di radiazione trasmessa dalle soluzioni al variare del pH, maggiore è il pH del campione e minore è la percentuale di luce trasmessa, come hanno dimostrato gli spettri di assorbimento. Questo lavoro di tesi ha permesso di verificare che anche analisi condotte in gocce permettono di osservare il presentarsi del viraggio sebbene i volumi dei fluidi siano ridotti a pL . In particolare si nota una variazione del 20% tra il segnale relativo ad una soluzione a pH 8.1 e quello relativo alle soluzioni con pH maggiori. Il sistema è tuttavia da ottimizzare per aumentare la sensibilità e rivelare variazioni di pH dell'ordine di 10^{-1} .

L'approccio di misura in goccia è stato verificato variando anche il metodo di realizzazione delle gocce (flow-focusing invece di cross-flowing) e il regime dei flussi utilizzato. Tale analisi ha rilevato criticità nella qualità dell'indicatore utilizzato, il blu di bromotimolo, che ha dimostrato essere soggetto ad un effetto di aging dopo alcune ore dall'utilizzo e alla sua concentrazione nelle soluzioni che, essendo in forma di goccia, risulta essere troppo ridotta per ottenere una risoluzione nel segnale comparabile al caso delle misure in cui le soluzioni fluivano costantemente nel canale.

Alla luce di questo problema riscontrato si rendono necessari ulteriori studi più approfonditi sull'influenza della variabilità della concentrazione di indicatore nel caso delle misure in goccia e un'analisi quantitativa sull'effetto di deterioramento dell'indicatore che vada a stabilire in quale misura questo fenomeno è rilevante.

Visti tali elementi di criticità, nell'ultima parte del lavoro si è testata l'influenza del tipo di indicatore sulle misure ripetendo le prove in goccia utilizzandone un diverso tipo, il nile blue A. La tecnica impiegata per realizzare queste ultime misure in goccia differisce dalle prove precedenti per il metodo di generazione delle gocce, dato che si è notata maggiore stabilità producendo gocce in flow-focusing e i risultati ottenuti sono stati nettamente migliori. Infatti da queste misure è stato possibile riconoscere il viraggio di segnale e quindi la distinzione delle varie soluzioni. A conferma della legge di Lambert-Beer si riconosce la dipendenza lineare della trasmittanza rispetto alla concentrazione della specie assorbente, in questo caso il pigmento di colore fornito dall'indicatore di pH. Inoltre, a riprova di quanto è emerso dai risultati delle misure in goccia con il precedente indicatore, anche in questo caso è evidente la tendenza crescente della trasmittanza rispetto al pH.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che è possibile distinguere varie soluzioni che differiscono di decimi di pH per mezzo di misure di trasmittanza ottica utilizzando la piattaforma opto-fluidica integrata

in LiNbO_3 . Oltre a ciò la tecnica delle misure in goccia ha confermato la sua efficienza: la quantità di volume delle soluzioni da testare è notevolmente ridotta ed è possibile ottenere misure normalizzate 1:1 rispetto al segnale relativo ad un fluido di riferimento (che nel presente lavoro è l'esadecano) il che permette di minimizzare il contributo d'errore dovuto alla eventuale instabilità dell'apparato sperimentale.

Questo lavoro di tesi ha raggiunto l'obiettivo previsto, aprendo le porte ad analisi più dettagliate e sofisticate che puntano allo sviluppo di un vero e proprio micro-dispositivo per la misura del pH che ottimizza i consumi, la facilità d'uso e il trasporto dello strumento. Riguardo agli scopi del progetto di ricerca in cui si inserisce questo lavoro, è stata applicata e confermata la funzionalità dell'integrazione degli stadi ottico e microfluidico che potrà essere sfruttata nella realizzazione di strumenti di alta precisione nei numerosi ambiti di ricerca dove il niobato di litio ha già sconfinato.

A Funzionamento dello spettrofotometro

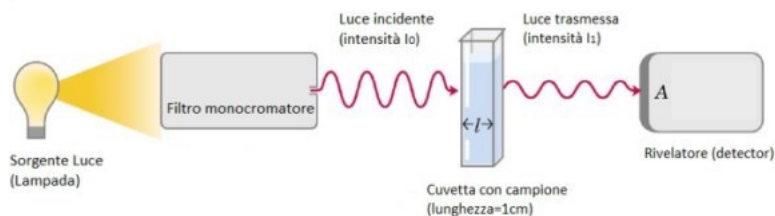


Figura A.1: Schema che riassume il funzionamento di uno spettrofotometro.

Lo spettrofotometro è uno strumento che misura l'intensità luminosa in funzione della lunghezza d'onda della radiazione della sorgente in un range che va dal vicino infrarosso al vicino ultravioletto. Questo dispositivo sfrutta la proprietà della luce di essere assorbita e riflessa a diverse frequenze dalle sostanze chimiche o biologiche. Lo spettrofotometro è costituito da diverse parti: una lampada alogena che funge da sorgente luminosa genera la luce che viene filtrata da un monocromatore (a grating) in grado di far passare la minima banda attorno ad una lunghezza d'onda, l'impostazione della lunghezza d'onda di utilizzo viene effettuata in modo digitale tramite il software che controlla lo strumento. La radiazione passa attraverso l'alloggiamento dello strumento in cui viene posto il campione, una cuvetta riempita con la soluzione da analizzare. Il raggio luminoso, passando attraverso il campione, sarà in parte assorbito, pertanto il raggio incidente sul campione e il raggio trasmesso avranno intensità luminose differenti. Il fascio di luce termina il suo percorso in un detector in grado di misurare la trasmittività $T\%$ della radiazione che vi arriva. Il funzionamento dello strumento è riassunto in figura A.1.

B Funzionamento dell'amplificatore lock-in

L'amplificatore lock-in fornisce in uscita un segnale in DC proporzionale al segnale AC in entrata che si vuole misurare. La particolarità dello strumento chiamato anche phase-sensitive detector, sta nella conversione di un segnale in AC ad uno in DC che avviene in modo tale da rettificare solo il segnale di interesse e sopprimere gli effetti del rumore di fondo da cui il segnale è affetto. Il rumore che viene trasmesso in output dallo strumento perciò non viene rettificato, ma appare come una fluttuazione del segnale in tensione. Questo significa che il segnale che si vuole studiare, può essere separato dal rumore all'output per mezzo di un filtro passa-basso. Applicando il filtro si ottiene un segnale in uscita dall'amplificatore lock-in non più disturbato.

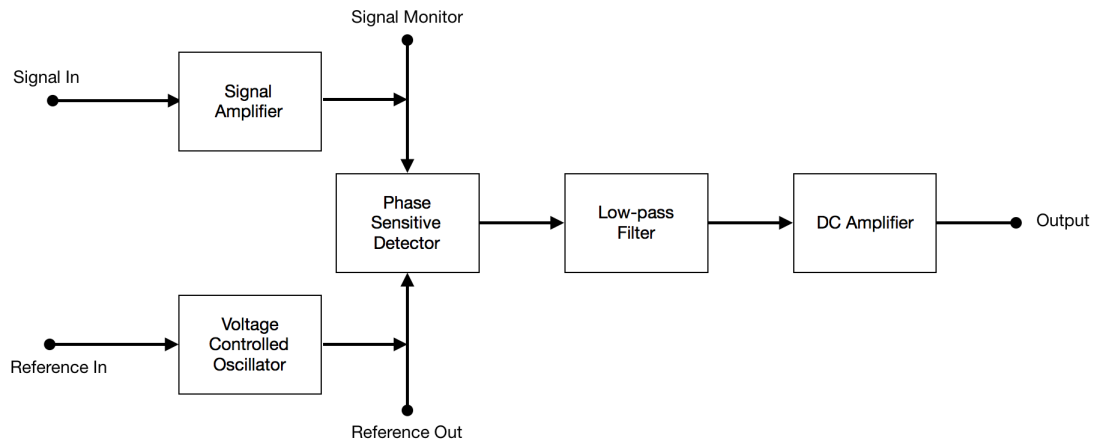


Figura B.1: Diagramma a blocchi che descrive il funzionamento di un amplificatore lock-in.

Per funzionare correttamente l'amplificatore deve essere programmato per riconoscere il segnale di interesse. Lo si fa erogando allo strumento un segnale in tensione, che funge da riferimento (in questo caso la frequenza del chopper), alla stessa frequenza del segnale e con una fase fissata in rapporto allo stesso. Questa impostazione si ottiene facilmente se si fa in modo che il segnale e il riferimento provengano dalla stessa sorgente. L'uso di un segnale di riferimento di questo tipo assicura che lo strumento tracci ogni cambiamento in frequenza del segnale studiato. Nel caso in questione con il modulo lock-in si è potuto utilizzare una configurazione di normalizzazione che fornisce come output il segnale normalizzato rispetto ad un ulteriore ingresso rappresentato dal fascio di minore intensità prodotto dal beam splitter.

Durante lo svolgimento delle misure è stato utilizzato come beam splitter un vetrino da laboratorio posizionato in modo opportuno. Lo scopo di tale accorgimento è quello di avere la percentuale più alta di fascio trasmesso in modo da eccitare il più possibile la guida d'onda e allo stesso tempo di avere un parametro di normalizzazione per il segnale in output all'amplificatore lock-in.

Riferimenti bibliografici

- [1] Giacomo Bettella, Gianluca Pozza, Sebastian Kroesen, Riccardo Zamboni, Enrico Baggio, Carlo Montevicchi, Annamaria Zaltron, Ludovic Gauthier-Manuel, Giampaolo Mistura, Claudio Furlan, et al. Lithium niobate micromachining for the fabrication of microfluidic droplet generators. *Micromachines*, 8(6):185, 2017.
- [2] Gordon F Christopher and Shelly L Anna. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(19):R319, 2007.
- [3] J Courbat, D Briand, J Damon-Lacoste, J Wöllenstein, and NF de Rooij. Evaluation of ph indicator-based colorimetric films for ammonia detection using optical waveguides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143(1):62–70, 2009.
- [4] George N Doku, Willem Verboom, David N Reinhoudt, and Albert Van Den Berg. On-microchip multiphase chemistry—a review of microreactor design principles and reagent contacting modes. *Tetrahedron*, 61(11):2733–2742, 2005.
- [5] Michael Esseling, Frank Holtmann, Mike Woerdemann, and Cornelia Denz. Two-dimensional dielectrophoretic particle trapping in a hybrid crystal/pdms-system. *Optics express*, 18(16):17404–17411, 2010.
- [6] Simonetta Grilli and Pietro Ferraro. Dielectrophoretic trapping of suspended particles by selective pyroelectric effect in lithium niobate crystals. *Applied Physics Letters*, 92(23):232902, 2008.
- [7] Alex Q Maclin, Mariya D Kim, Sergey A Dergunov, Eugene Pinkhassik, and Erno Lindner. Small-volume ph sensing with a capillary optode utilizing dye-loaded porous nanocapsules in a hydrogel matrix. *Electroanalysis*, 27(3):733–744, 2015.
- [8] Jonathan P McMullen and Klavs F Jensen. Integrated microreactors for reaction automation: new approaches to reaction development. *Annual review of analytical chemistry*, 3:19–42, 2010.
- [9] Demetri Psaltis, Stephen R Quake, and Changhuei Yang. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *nature*, 442(7101):381, 2006.
- [10] MK Tan, LY Yeo, and JR Friend. Rapid fluid flow and mixing induced in microchannels using surface acoustic waves. *EPL (Europhysics Letters)*, 87(4):47003, 2009.

- [11] Shia-Yen Teh, Robert Lin, Lung-Hsin Hung, and Abraham P Lee. Droplet microfluidics. *Lab on a Chip*, 8(2):198–220, 2008.
- [12] Paul Watts and Stephen J Haswell. The application of micro reactors for organic synthesis. *Chemical Society Reviews*, 34(3):235–246, 2005.
- [13] Mark WB Wilson, Akshay Rao, Jenny Clark, R Sai Santosh Kumar, Daniele Brida, Giulio Cerullo, and Richard H Friend. Ultrafast dynamics of exciton fission in polycrystalline pentacene. *Journal of the American Chemical Society*, 133(31):11830–11833, 2011.