

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Misura della concentrazione proteica in gocce tramite un
sensore optofluidico in niobato di litio

Relatore

Dr.ssa Annamaria Zaltron

Laureanda

Erika Socal

Correlatore

Prof.ssa Cinzia Sada

Dott. Leonardo Zanini

Anno Accademico 2021/2022

Indice

Introduzione	4
1 Il niobato di litio	5
1.1 Struttura cristallina	5
1.2 Proprietà fisiche del niobato di litio	6
1.2.1 Birifrangenza	6
1.2.2 Effetto elettro-ottico	6
1.2.3 Piezoelettricità e piroelettricità	7
1.2.4 Effetto fotovoltaico	7
1.2.5 Fotorifrattività	7
2 Dispositivo opto-fluidico	8
2.1 Il metodo Bradford	8
2.1.1 Albumina sierica bovina	9
2.2 Preparazione del campione di niobato di litio	9
3 Acquisizione dei dati e analisi	15
3.1 Setup optofluidico	15
3.2 Presa dati	17
4 Conclusioni e prospettive	24

Introduzione

L'opto-microfluidica è una di quei settori della fisica che più si presta ad applicazioni in campo chimico, biologico e biomedico, non soltanto per la rapidità con cui si possono ottenere risultati o per la precisione con cui questi vengono forniti e analizzati, ma anche per aspetti più pratici come per esempio il fatto di poter utilizzare quantità estremamente piccole di prodotti che si vogliono analizzare. La microfluidica permette di passare dall'utilizzo di millilitri e microlitri di soluzione biologica, all'impiego di solamente qualche nanolitro della stessa, o addirittura raggiungere un ordine di grandezza di 10^{-15} L ([3] e [7]).

Naturalmente un dispositivo adatto ad ospitare quantità così microscopiche di materia dev'essere altrettanto piccolo, per questo molte volte si parla di *lab-on-a-chip* per indicare quei dispositivi millimetrici in grado di svolgere tutta una serie di operazioni ed analisi che solitamente vengono realizzati nei laboratori di ricerca usando strumentazioni macroscopiche.

Quello appena citato è un esempio di dispositivo microfluidico per la generazione di microgocce, utilizzato in questo lavoro come supporto per l'analisi di un campione biologico costituito da una soluzione acquosa di una proteina chiamata *albumina sierica bovina* (BSA), miscelata con un apposito reagente (il *reagente Bradford*) per determinarne la concentrazione. Lo stadio microfluidico è costituito da un circuito a forma di T che permette di creare gocce di volume desiderato utilizzando liquidi immiscibili, dei quali la fase dispersa (le gocce) rappresenta la soluzione che si vuole caratterizzare dal punto di vista ottico. Questo dev'essere integrato con uno stadio ottico costituito da un fascio laser collimato della lunghezza d'onda opportuna, che segnala il passaggio di ogni singola goccia al sistema di acquisizione. Infatti la modulazione del segnale ottico dopo che il fascio ha interagito con i liquidi fornisce preziose informazioni sulle proprietà ottiche degli stessi, che a loro volta sono determinate dalle caratteristiche composizionali del liquido.

Purtroppo, i materiali più comunemente utilizzati per la realizzazione dei dispositivi *lab-on-a-chip*, come per esempio il vetro, non sono i migliori per ospitare l'integrazione di componenti ottiche [3]. Un materiale estremamente versatile e dalle spiccate proprietà fisiche è il *niobato di litio* ($LiNbO_3$) che qui è stato usato come substrato in cui si formano e analizzano le microgocce di soluzione proteica. Naturalmente il cristallo dovrà essere sottoposto a processi di lavorazione che lo renderanno idoneo ad ospitare tanto una parte fluidica costituita dalle fasi continua e dispersa, quanto una parte legata all'ottica che è appunto il fascio laser.

Come accennato sopra, il dispositivo opto-fluidico realizzato in niobato di litio è stato utilizzato per caratterizzare la concentrazione di proteine presenti in soluzione acquosa, sfruttando il metodo Bradford, che è comunemente usato nei laboratori biochimici. Lo svantaggio principale di tale metodo è rappresentato dalla necessità di utilizzare grandi volumi di campione biologico per l'analisi, dell'ordine di grandezza della decina o più di millilitri. Il dispositivo proposto in questo lavoro di tesi si prefigge di superare tale limite, tramite l'analisi di gocce contenenti pochi nanolitri di soluzione.

Il lavoro presentato in questa tesi è così strutturato:

- Il primo capitolo introduce il niobato di litio e descrive le sue proprietà fisiche principali, per le quali risulta un materiale apprezzato in molti ambiti,
- Nel secondo capitolo si analizzano gli aspetti più pratici del lavoro, come il funzionamento del metodo Bradford e la preparazione del dispositivo opto-fluidico
- Nel terzo si presentano i dati ottenuti in laboratorio
- L'ultimo capitolo è riservato alle considerazioni finali

Capitolo 1

Il niobato di litio

Il niobato di litio ($LiNbO_3$) è un materiale sintetico creato in laboratorio a partire dal sistema atomico $Li_2O - Nb_2O_5$ e si presenta come un solido cristallino trasparente. Viene classificato tra i materiali isolanti perché possiede un *energy gap* tra la banda di valenza e la banda di conduzione di circa 4 eV. Grazie alle sue proprietà viene ampiamente utilizzato in molti ambiti della fisica e non solo; in questo lavoro di tesi è stato impiegato in ambito ottico con l'obiettivo di creare delle guide di luce per l'analisi proteica di una soluzione in gocce.

Quanto segue è trattato in modo più preciso e completo nei riferimenti da [1] a [4].

1.1 Struttura cristallina

I cristalli di niobato di litio sono formati con una tecnica di accrescimento chiamata Czochralski e possono essere sviluppati con diverse concentrazioni dei suoi costituenti: il cristallo più comunemente usato non è quello a *concentrazione stechiometrica* con un rapporto $Li : Nb$ al 50% : 50%, ma viene impiegata la *concentrazione congruente* al 48.5% : 51.5%. La motivazione che giustifica questo fatto è da ricercarsi nelle migliori proprietà che la seconda ha nei confronti della prima, non solo dal punto di vista della composizione cristallografica (come si può immaginare, concentrazioni differenti dei costituenti comportano risposte differenti a sollecitazioni meccaniche e elettromagnetiche esterne), ma anche per altre proprietà intrinseche che vanno dall'uniformità della struttura cristallina alla transizione più netta tra fase solida e liquida ad alte temperature, come mostra il diagramma in figura 1.1:

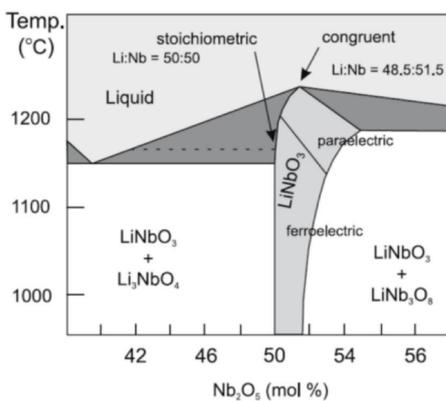


Figura 1.1: Diagramma di fase attorno la concentrazione congruente

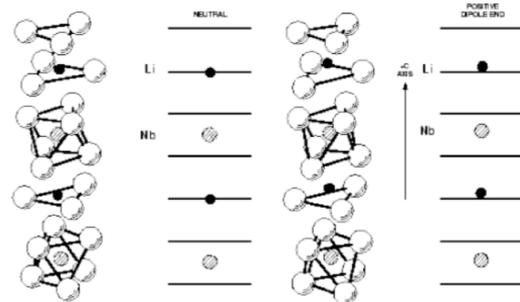


Figura 1.2: Arrangiamento degli atomi nella fase paraelettrica e ferroelettrica

La struttura cristallina del niobato di litio è costituita da una cella esagonale ad impacchettamento stretto di atomi di ossigeno i cui interstizi sono riempiti da atomi di litio e di niobio, sono però presenti anche delle vacanze atomiche che rendono questo materiale estremamente versatile; la successione $Li - Nb - vacanza$ fornisce la direzione dell'asse ottico z (se consideriamo una terna di assi cartesiani xyz), che è quello lungo cui il cristallo presenta una simmetria rotazionale. La posizione

di questi atomi dipende dalla temperatura e caratterizza la fase *ferroelettrica* e *paraelettrica* (figura 1.2) in cui si può presentare il cristallo. Al di sotto della temperatura di Curie (che per il niobato di litio in composizione congruente vale $T_C = 1142.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$) troviamo la fase ferroelettrica: gli atomi di litio e niobio sono leggermente spostati lungo l'asse z rispetto la posizione reticolare centrale prevista dalla simmetria, ogni cella elementare viene così ad avere un momento di dipolo lungo questo asse e complessivamente si crea una polarizzazione spontanea del cristallo. Viceversa sopra la temperatura di Curie gli atomi di niobio si collocano equidistanti tra due piani di ossigeno al centro dell'ottaedro, mentre gli atomi di litio giacciono su tali piani.

Come ogni cristallo, il niobato di litio può essere sottoposto a un processo di drogaggio con atomi di altre specie allo scopo di modificarne le caratteristiche: le vacanze atomiche che sono state precedentemente citate possono essere colmate da atomi droganti accettori o donori di elettroni, come per esempio il titanio utilizzato in questo caso, che alterano le proprietà del materiale, accentuandole o limitandole.

1.2 Proprietà fisiche del niobato di litio

Le proprietà ottiche che possiede questo cristallo sono discusse nel seguito.

1.2.1 Birifrangenza

La birifrangenza dei cristalli è causata dall'anisotropia del tensore di permittività elettrica, che se consideriamo la cella ortoesagonale si scrive come una matrice diagonale 3×3

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

A partire da questa matrice si possono calcolare gli indici di rifrazione ordinario, che coinvolge le direzioni x e y , e straordinario, lungo l'asse z :

$$n_o = \sqrt{\frac{\epsilon_{11}}{\epsilon_0}} \quad n_s = \sqrt{\frac{\epsilon_{33}}{\epsilon_0}}$$

Questi indici non sono costanti per ogni cristallo ma dipendono dalla sua composizione (drogaggio e difetti nella struttura) ma anche dalla lunghezza d'onda della luce che incide su di esso: $n_o = n_o(\lambda)$ $n_s = n_s(\lambda)$.

1.2.2 Effetto elettro-ottico

L'effetto elettro-ottico consiste nel cambiamento dell'indice di rifrazione di un cristallo quando sottoposto ad un campo elettrico esterno \vec{E} . Dal punto di vista matematico si può descrivere questo fenomeno come variazione delle componenti del tensore di permittività, in particolare scorporando i contributi con una espansione a diversi ordini di grandezza del campo elettrico: il primo termine che si incontra è lineare in \vec{E} ed è chiamato *effetto Pockels*, il secondo termine dell'espansione (*effetto Kerr*) è quadratico ed estremamente piccolo anche per campi elettrici intensi, quindi la maggior parte delle volte tende ad essere trascurato. Se il campo elettrico applicato è parallelo all'asse z le variazioni degli indici ordinario e straordinario si possono scrivere

$$\Delta n_o = -\frac{1}{2}n_o^3 r_{13} E_z \quad \Delta n_s = -\frac{1}{2}n_s^3 r_{33} E_z$$

se invece il campo è diretto trasversalmente (per esempio lungo la direzione y) si avrà che

$$\Delta n_o = -\frac{1}{2}n_o^3 r_{22} E_y \quad \Delta n_s = 0$$

in cui i coefficienti r_{ij} sono i coefficienti elettro-ottici che per il niobato di litio valgono: $r_{13} = 9,6 \text{ pm V}^{-1}$, $r_{22} = 6,8 \text{ pm V}^{-1}$ e $r_{33} = 30,9 \text{ pm V}^{-1}$. L'effetto elettro-ottico è degno di nota perché permette di modificare la polarizzazione del cristallo anche con una dipendenza dal tempo.

1.2.3 Piezoelettricità e piroelettricità

Questi due fenomeni modificano come il precedente la polarizzazione del niobato di litio, ma lo fanno con due agenti differenti.

Nel caso della piezoelettricità, la polarizzazione spontanea della fase ferroelettrica subisce variazioni a seguito dell'applicazione di una forza sulla superficie del cristallo. Anche in questo caso la formula che regola questo fenomeno è di tipo tensoriale e coinvolge il prodotto tra il tensore piezoelettrico e quello degli sforzi. Solitamente tutti i cristalli piezoelettrici presentano anche il comportamento inverso, cioè modificano la loro forma se sottoposti a un campo elettrico.

La piroelettricità, invece, consiste nella modifica della polarizzazione con la variazione della temperatura. Questo risulta evidente se si pensa a ciò che succede agli atomi di niobio e litio (le cui posizioni nel reticolo sono responsabili della polarizzazione del cristallo) nel passaggio dalla fase ferroelettrica alla paraelettrica.

1.2.4 Effetto fotovoltaico

Questo tipo di effetto rientra tra i fenomeni di interazione radiazione-materia, infatti consiste nella creazione di una determinata *fotocorrente* all'interno del cristallo quando viene sottoposto a illuminamento da parte di una fonte di luce. Il processo che ha luogo è quello di eccitamento di un *fotoelettrone* nell'atomo donore a seguito dell'urto con il fotone sufficientemente energetico e del suo successivo assorbimento; l'elettrone viene eccitato ed entra in banda di conduzione grazie all'aumento della sua energia. La direzione privilegiata dalla fotocorrente è quella parallela all'asse ottico z , tale fenomeno è pertanto asimmetrico e la fotocorrente che si instaura lungo l'asse z è circa 10 volte maggiore rispetto a quella presente lungo le direzioni ortogonali x e y .

1.2.5 Fotorifrattività

La fotorifrattività è una proprietà che possiedono alcuni cristalli che può essere considerata come l'unione tra l'effetto fotovoltaico e l'effetto Pockels di cui si è discusso prima, perché consiste nella variazione locale dell'indice di rifrazione mediante il semplice irraggiamento con un'onda luminosa. La fotocorrente creata come conseguenza dell'effetto fotovoltaico genera una delocalizzazione di carica che si ricombina con altre impurezze del reticolo creando, in modo reversibile, un accumulo di carica fissa semi-permanente ai bordi della zona illuminata o alle facce principali del cristallo. Tale separazione di carica dà luogo ad un campo elettrico interno al materiale, detto campo di carica spaziale, che tramite effetto elettrico-ottico modifica localmente l'indice di rifrazione del cristallo.

È evidente quindi che le impurezze che sono state inizialmente citate giocano un ruolo determinante nelle caratteristiche del niobato di litio, non solo quelle intrinseche ma anche i droganti estrinseci, che possono inibire o amplificare questo effetto a seconda della loro posizione nella cella del niobato e della loro capacità di fungere da atomi donori o accettori di elettroni. Ad esempio, uno dei principali droganti del niobato di litio usato per enfatizzare le proprietà fotorifrattive è il ferro, il quale si incorpora nel sito reticolare del litio e può presentare due diversi gradi di ossidazione, $2+$ o $3+$, i quali agiscono rispettivamente da accettori o donori di elettroni, contribuendo all'aumento della corrente fotoindotta.

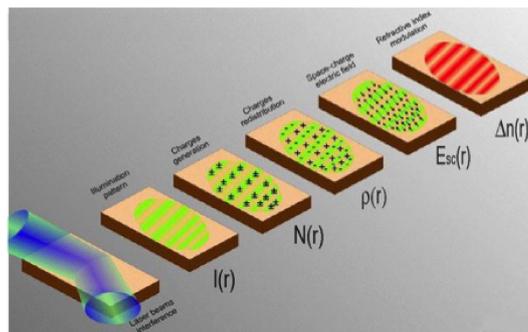


Figura 1.3: Schematizzazione dell'effetto fotorifrattivo

Capitolo 2

Dispositivo opto-fluidico

2.1 Il metodo Bradford

Il metodo Bradford è una tra le possibili tecniche che vengono utilizzate per determinare la concentrazione di una proteina presente in una soluzione di tipo acquoso. Deve il suo nome a Marion M. Bradford che nel 1976 utilizza il reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250* proprio a tale scopo.

Il principio di funzionamento di questo reagente è basato sul gradiente di colorazione indotto dal contatto con differenti concentrazioni di un certo tipo di aminoacidi presenti nella soluzione in cui è inserito il reagente: in assenza di proteine il colore tipico di questo prodotto è tendente al marrone e si sposta sempre più verso il blu man mano che la concentrazione di proteina aumenta. La figura di seguito mostra questo gradiente cromatico.

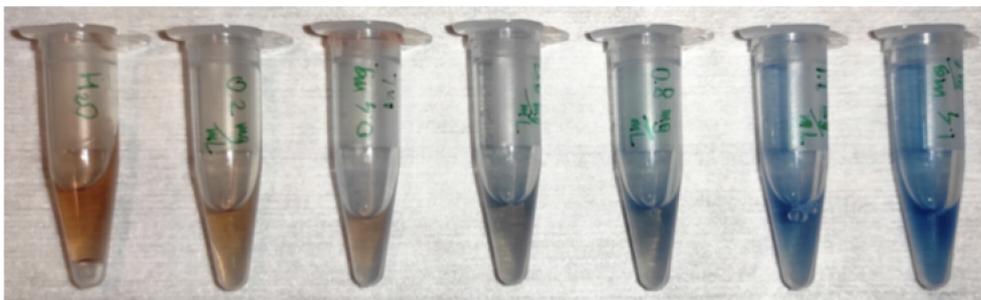


Figura 2.1: Esempio di soluzione di proteine e reagente Coomassie in ambiente acquoso; la concentrazione proteica cresce da sinistra a destra

Dal punto di vista ottico questo implica lo spostamento del picco di assorbimento della luce da parte della soluzione, che può essere quindi analizzato mediante l'integrazione dello stadio fluidico costituito dalla proteina in analisi con una parte associata all'ottica (per esempio un fascio laser di lunghezza d'onda compatibile con quella di assorbimento). Tale picco va da una lunghezza d'onda $\lambda = 465$ nm in caso di assorbanza minima a $\lambda = 595$ nm quando la proteina è molto concentrata ed ha assorbanza massima, questo spiega perché in questo lavoro di tesi è stato utilizzato un laser rosso con lunghezza d'onda piccata attorno al valore $\lambda_0 = 633$ nm con polarizzazione TM (cioè orizzontale parallela al banco ottico) [6]. Il grafico in figura 2.2 mostra proprio questo risultato, cioè l'andamento dell'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda a diverse concentrazioni di proteina (i dati sono stati acquisiti con uno spettrofotometro, uno strumento che valuta l'intensità della radiazione assorbita).

L'indagine con lo spettrofotometro non è l'unica a coniugare ottica e fluidica, infatti in questa sede è stato utilizzato un *chip* opto-microfluidico realizzato in niobato di litio che offre ottimi risultati con molti vantaggi. Dal procedimento di costruzione del campione è possibile dedurre l'ordine di grandezza delle quantità in gioco: le misure sono state acquisite con pochi nanolitri di soluzione proteica, inoltre la strategia di frazionare l'oggetto dello studio in microgocce disperse in una fase continua permette di lavorare ancora più efficacemente minimizzando lo scarto del materiale usato per lo studio, come si vedrà nei prossimi paragrafi.

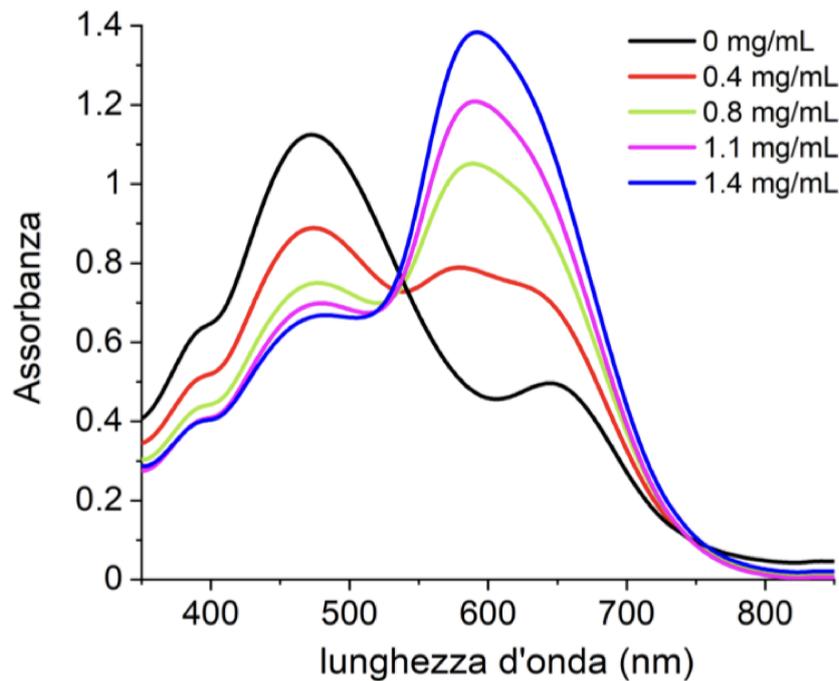


Figura 2.2: Andamento dell'assorbanza della soluzione in funzione della lunghezza d'onda a diverse concentrazioni di proteine

2.1.1 Albumina sierica bovina

La BSA (*bovine serum albumin*) è una proteina ricavata mediante particolari processi chimico-fisici a cui viene sottoposto il sangue vaccino. Essa ha piccole dimensioni (misura circa 12 nm) rispetto ad altri aggregati amminoacidici, è stabile e poco reattiva per cui è ampiamente usata e studiata in ambito biotecnologico anche per la facilità con cui può essere conservata [8]. Nel caso in esame è stata utilizzata come proteina a cui si deve legare il reagente Bradford.

Per preparare la soluzione utilizzata nel processo di misura si deve distinguere la *baseline* dalla soluzione proteica. Nel primo caso si ha una concentrazione di proteine nulla, si tratta cioè di reagente Bradford miscelato con acqua MilliQ ultrapura in rapporto rispettivamente 30:1, ed è utilizzata nell'analisi dei dati come livello di riferimento per normalizzare il segnale delle proteine alla luminosità della luce che le osserva, cioè per sottrarre eventuali irregolarità del sistema ottico dal computo complessivo. Nel secondo caso invece, all'acqua è aggiunta la BSA in concentrazione variabile e il rapporto con il Coomassie è sempre 1:30.

Come si nota da queste proporzioni il reagente è estremamente presente in queste soluzioni, il motivo risiede nel fatto che il cambio di colore a cui è sottoposto è dovuto al suo legame con particolari siti presenti sulla superficie esterna dell'albumina; una singola molecola di reagente Bradford può legarsi a più di una proteina che presenta più siti di legame con le molecole del reagente, per cui per esaurire tutte le combinazioni possibili e avere la certezza che tutte le proteine presenti nella soluzione andranno a legarsi si preferisce sovrabbondare con il reagente.

2.2 Preparazione del campione di niobato di litio

Il cristallo di niobato di litio congruente che deve essere usato come in questo caso in un esperimento di misura con un fascio laser deve essere sottoposto a dei processi che lo rendano idoneo a tale scopo, cioè dev'essere lavorato per permettere la perfetta integrazione tra la parte ottica e quella microfluidica prima di incominciare con il processo di misura. Quanto segue è tratto da [2] e da [4], dove si può trovare una spiegazione più ricca e dettagliata.



Figura 2.3: Schema di un *chip*

La figura soprastante è una schematizzazione del dispositivo optofluidico completo di tutte le sue parti, la cui costruzione verrà spiegata nel dettaglio nei prossimi paragrafi, utilizzato in questo tipo di esperimenti per una ottimale compensazione della parte ottica e di quella fluidica.

Si possono notare in giallo le guide di luce che sezionano la dimensione maggiore del campione in niobato di litio: la luce colpisce il loro ingresso, viene trasmessa lungo tutta la guida per poi uscire dal lato opposto ed essere rivelata. È anche evidenziata la *T-junction* che rappresenta il circuito fluidico: lungo il canale maggiore scorre l'esadecano che nel suo moto porta con se parte della soluzione proteica, presente in un solo ramo del canale corto, sottoforma di goccioline formate grazie al gioco di equilibrio tra la forza viscosa e la pressione della fase continua con la resistenza alla deformazione della fase dispersa [2].

Quando la luce attraversa una guida, incontra inevitabilmente lo stadio fluidico ed entra in contatto con esso. La presenza della goccia comporta la modifica dell'assorbimento dei fotoni da parte dei liquidi che può essere rivelata e monitorata raccogliendo la luce trasmessa. Naturalmente il grado di assorbimento varia con la composizione della fase dispersa, dunque è possibile ottenere un metodo per discriminare il grado di concentrazione della soluzione introdotta nel circuito.

Pulizia del campione

Innanzitutto il niobato di litio che si utilizza viene acquistato sottoforma di un disco del diametro di una decina di centimetri, viene quindi tagliato in pezzetti più piccoli con una sega circolare South Bay 540 con molta precisione lungo gli assi cristallografici, in modo da avere un dispositivo delle dimensioni adatte per essere inserito nel sistema di supporto del banco ottico.

Una volta creato il substrato il passo successivo è la sua pulizia, che avviene in una *clean-room* di classe ISO 7 mediante il processo di fotolitografia: si inserisce il campione in una camera a vuoto in cui è presente del plasma attivato da una scarica elettrica che attira verso di se i residui. Il campione risulta quindi perfettamente pulito e pronto per il processo di fabbricazione delle guide di luce.

Creazione delle guide di luce

L'obiettivo di questo passaggio è quello di creare delle scie in cui la luce possa essere otticamente confinata in un fascio che percorre trasversalmente il substrato di niobato di litio con una piccolissima dispersione al suo interno, in questo modo può essere sfruttata come rivelatore della presenza della goccia all'interno del canale microfluidico che successivamente si andrà a costruire. Il principio di funzionamento è la variazione dell'indice di rifrazione causata dalla presenza di un elemento drogante, in questo caso il titanio, che lascia invariate le proprietà fisiche globali del materiale pur agendo localmente modificando le proprietà ottiche della porzione di cristallo in cui avviene la sua diffusione. La fase di creazione delle guide d'onda incomincia con la deposizione sulla superficie pulita del cristallo di uno strato di *primer* (esametildisilazano, vedi figura 2.4), una sostanza che ha l'obiettivo di favorire l'adesione del *photoresist* (quello scelto è S1813 della serie Microposit S1800 G2). Il *photoresist* ha la

proprietà di essere sensibile ad alcuni agenti chimici quando è polimerizzato sotto lampada UV, ma resistente agli stessi quando invece non viene polimerizzato. Entrambe queste componenti vengono rese più uniformi inserendo il campione in uno *spin coater* che ruotando le ridistribuisce e ne permette il deposito sulla superficie del campione. La superficie viene coperta con una maschera di cromo su quarzo che presenta delle fessure di $3\mu\text{m}$ di larghezza, posizionata in modo tale che la direzione delle strisce sia parallela all'asse ottico, poi avviene il processo di irraggiamento UV posizionando il campione sotto una lampada altamente collimata. Complessivamente, una volta tolta la maschera, avremo delle zone polimerizzate (quelle che non sono state coperte) e delle zone non polimerizzate (quelle coperte perché la maschera ha bloccato l'irraggiamento UV). La parte irraggiata viene rimossa immergendo il campione in un bagno di un solvente basico (Microposit MF-319), lasciando quindi scoperta questa parte di niobato di litio che verrà successivamente ricoperta da uno strato di titanio. In questo modo è possibile drogare solamente una porzione ben nota e controllata del cristallo, che costituisce le guide che seguirà la luce nel momento in cui andiamo a montare il campione nell'apparato sperimentale.

Rimosso dunque il *photoresist* si ricopre la superficie del campione con uno strato di titanio spesso 40 nm mediante una tecnica chiamata *sputtering*, che avviene all'interno di una camera a vuoto in cui sono presenti atomi di argon e plasma. Il titanio posizionato sopra le strisce di *photoresist* non illuminato viene rimosso mediante un bagno con un solvente positivo a questa sostanza (SVC(TM)-14), che lascia intatte le zone in cui l'elemento tocca direttamente la superficie del cristallo; tale tecnica è chiamata *lift-off*.

La diffusione del titanio all'interno del niobato di litio avviene in un forno ad alta temperatura (F-VS 100-500/13, Gero) in cui il gradiente termico sia in riscaldamento che in raffreddamento è di $300^\circ\text{C}/\text{h}$, questo per evitare che il cristallo possa subire degli *shock* che potrebbero romperlo o deteriorarlo. Alla fine di questo processo, detto *annealing*, il titanio sarà completamente diffuso e la sua concentrazione nel volume del substrato, se l'osservazione avviene perpendicolarmente alla superficie, è molto ben approssimabile ad una semigaussiana come si nota dalla figura 2.5.

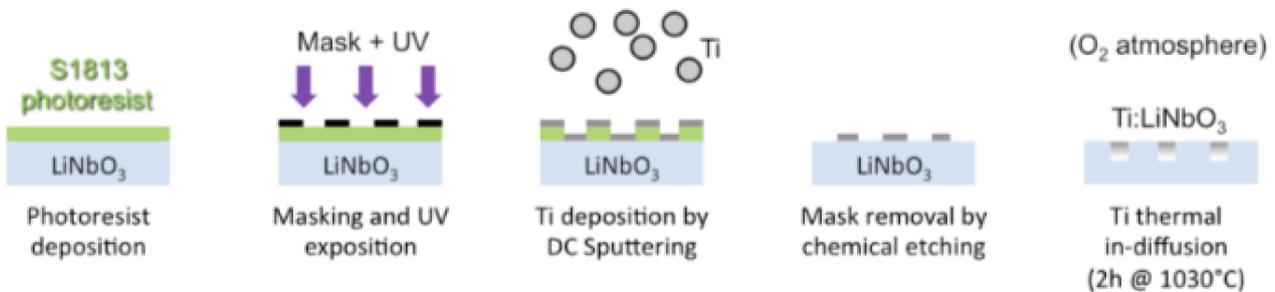


Figura 2.4: Sintesi della creazione delle guide di luce

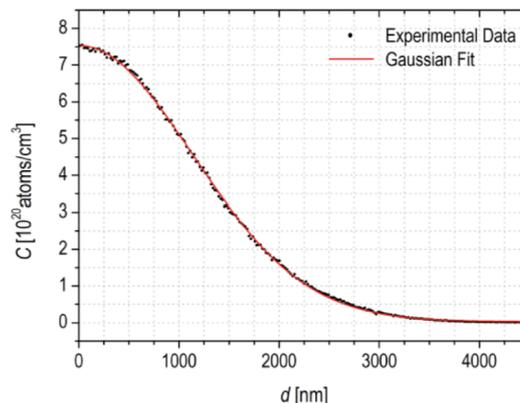


Figura 2.5: Andamento della concentrazione di titanio all'interno del niobato di litio

Lapping e polishing

Un aspetto estremamente importante per la riuscita dell'esperimento è la collimazione ottimale della luce in ingresso alla guida; a tale scopo si usa quindi un fascio laser a bassissima dispersione, ma occorre agire anche sul campione. Il *lapping* e il *polishing* sono due processi che permettono di migliorare la rugosità delle superfici laterali del cristallo, in questo modo si vanno ad eliminare tutte quelle imperfezioni che non abbiano un ordine di grandezza confrontabile con la lunghezza d'onda della luce in ingresso. In entrambi i casi si procede frizionando la parete con un disco rotante irrorato con un liquido contenente alumina, queste particelle abrasive hanno dimensioni differenti nei due processi perché il risultato finale sia ottimale: nel caso del *lapping* l'ordine di grandezza dell'alumina è del micrometro e di conseguenza viene effettuato precedentemente al *polishing* che invece agisce in modo più raffinato con particelle nanometriche. Il risultato finale è una superficie estremamente liscia e trasparente.

Creazione dei canali microfluidici

I due canali microfluidici sono disposti a croce latina sul substrato di niobato di litio, in modo tale da creare quattro bracci dove fluiranno la fase continua e la fase dispersa dei liquidi usati nell'esperimento, questa configurazione viene non a caso chiamata *T-junction* come riportato in figura 2.3. Sono realizzati successivamente alle guide di luce presso l'Université de Franche-Comté di Besançon, in Francia. La loro creazione avviene grazie a una sega di precisione circolare DISCO DAD 321 dello spessore di circa $200 \mu\text{m}$ (che sarà quindi anche la dimensione trasversale dei canali) rivestita di particelle diamantate che offrono il doppio servizio di taglio e lucidatura della superficie laterale del canale, con lo stesso obiettivo del *lapping* e del *polishing* nella prospettiva di un'integrazione con lo stadio ottico. Il canale maggiore è perpendicolare alle guide di luce ed è quello in cui fluiranno e verranno osservate le microgocce di proteine, il canale minore è stato intagliato parallelamente alle guide e permette alla soluzione proteica di inserirsi nella fase continua.

Per verificare l'effettiva larghezza del canale sono state effettuate delle misure con un profilometro: cinque acquisizioni per il canale lungo e quattro per il canale corto in posizioni differenti, di cui riportiamo i risultati in tabella:

canale corto	210 μm	209 μm	209 μm	209 μm		valor medio	errore
canale lungo	209 μm	209.3 μm	0.3 μm				
						209 μm	0.05 μm

Tabella 2.1: Larghezza stimata dei canali

Chiusura del campione su vetro

A questo punto si procede preparando il coperchio del chip. Le dimensioni corrette per questo elemento sono raggiunte tagliando il vetro con la stessa sega circolare utilizzata per il substrato di LiNbO_3 (la South Bay 540); in generale il coperchio dev'essere leggermente più piccolo rispetto al campione per facilitare la stesura della colla quando saranno sovrapposti nella fase successiva. Una volta pronto il pezzettino di vetro vengono praticati dei fori in prossimità delle uscite dei canali microfluidici del niobato di litio mediante una sabbiatrice; questi permettono alla fase continua e alla fase dispersa di fluire all'interno del *chip* per poter essere rivelate.

Sia il substrato in niobato di litio sia il coperchio in vetro devono essere puliti perfettamente prima di essere incollati definitivamente, quindi vengono immersi in un bagno di acetone e isopropanolo per eliminare ogni traccia di impurità, in caso di necessità si effettua anche qualche minuto di sonicatura per migliorare la resa di questo passaggio.

Successivamente si passa alla chiusura del *chip*, che avviene mediante incollaggio dei due elementi (vedi figura 2.3). Con l'utilizzo di una morsa si mantengono saldamente in posizione il vetro e il niobato di litio, in modo tale che i fori praticati sul primo siano il più possibile in corrispondenza delle uscite dei canali del secondo, quindi si distribuisce con l'ago di una siringa una piccolissima quantità di colla sul

perimetro laterale di contatto, in questo caso è stata utilizzata la Norland Optical Adhesive (NOA) 107, e si attende per qualche ora che diffonda fino a raggiungere il perimetro dei canali microfluidici dove si ferma a causa della tensione superficiale, cioè alla differenza di ordine di grandezza tra lo spazio di separazione vetro-niobato di litio e le dimensioni dei canali. Il tempo di attesa per la diffusione della colla varia a seconda della sua viscosità: si possono utilizzare colle più fluide riducendo le tempistiche oppure più dense arrivando anche a richiedere 24 ore di attesa.

Trascorso questo tempo si osserva il campione perché potrebbe risultare necessario un intervento di pulizia delle superfici laterali e del canale interno nel caso in cui la colla sia stata distribuita in eccesso, questo per tornare alla condizione ideale in cui le superfici di ingresso e di uscita della luce siano perfettamente pulite, trasparenti e piane, quindi si interviene esternamente con un bacchetto imbevuto di acetone e internamente si inietta lo stesso solvente fatto fluire con dell'aria compressa. Dopo aver verificato al microscopio la correttezza di questi passaggi, si procede con la polimerizzazione sotto lampada UV, che solidifica la colla e crea un unico oggetto in cui il dispositivo optofluidico sottostante e il coperchio di vetro soprastante sono perfettamente legati tra loro.

Realizzazione degli ingressi

Per fare in modo che i fluidi entrino all'interno del campione si devono realizzare gli ingressi che naturalmente verranno posizionati in prossimità dei fori praticati sul vetro di chiusura. Questi sono dei piccoli tubicini di silicone, lunghi circa 2 cm, che devono essere tagliati con una lama il più possibile perpendicolarmente al loro asse, in questo modo è assicurata l'adesione del tubicino al vetro per effetto ventosa e si massimizza l'efficacia dell'incollaggio. Dopo aver messo in posizione i tubicini, verificando di aver centrato il foro sul vetro, si prepara la soluzione di PDMS (polidimetilsilossano) e la si distribuisce con un ago di siringa attorno al contatto tra vetro e tubicini, dopo di che si attende la diffusione. Per solidificare il PDMS si inserisce il *chip* in un forno alla temperatura di 80°C per 2 ore.

Funzionalizzazione

Questo è uno *step* necessario se si vuole avere una produzione ottimale delle gocce. La superficie dei canali non trattati non è idrofoba e il risultato del flussaggio della soluzione proteica non è una goccia ma un getto continuo e irregolare come mostrato in figura 2.6. Di conseguenza, per aumentare l'angolo di contatto della componente proteica polare si procede flussando all'interno dei canali fluidici per 15 minuti una soluzione di octadeciltriclorosilano (chiamato semplicemente OTS) in toluene. Il silicio presente nella testa polare dell'OTS si lega agli atomi di ossigeno della struttura cristallina del niobato di litio ma anche al vetro soprastante, di conseguenza la coda apolare resta libera e determina l'idrofobicità del canale.

La figura sottostante mostra la differenza tra il caso non funzionalizzato e quello funzionalizzato.



Figura 2.6: Comportamento della soluzione acquosa in caso di canale non funzionalizzato (sopra) e funzionalizzato (sotto)

L'obiettivo della funzionalizzazione non è solo quello di ottimizzare la produzione di gocce, ma ha anche un importante risvolto secondario. Se le pareti non sono idrofobe si verifica che parte della soluzione biologica entra in contatto con esse e può essere deteriorata; al contrario con questo tipo di

trattamento è garantita la presenza di un sottile strato di fase continua a protezione del contenuto della goccia dall'interazione con il *chip*.

Alla fine di tutte queste fasi di preparazione il campione è pronto per la presa dati e si presenta come in figura

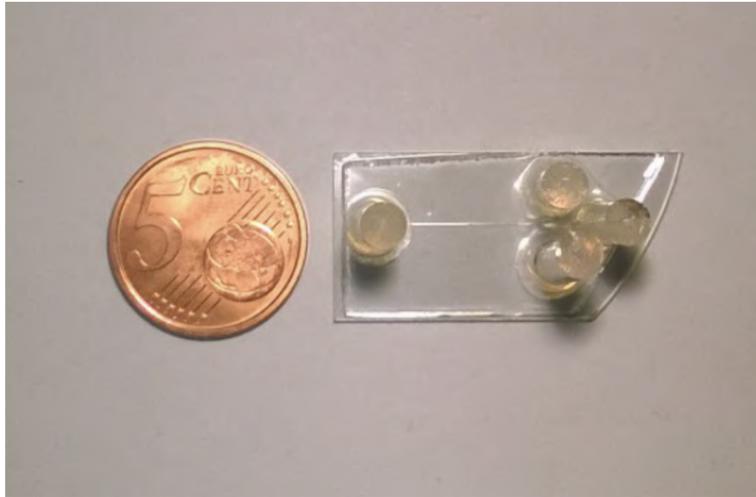


Figura 2.7: Dispositivo in niobato di litio ultimato [1]

Capitolo 3

Acquisizione dei dati e analisi

3.1 Setup optofluidico

L'apparato sperimentale usato in questo lavoro di tesi per il corretto funzionamento del dispositivo optofluidico è costituito da due parti: una parte ottica, per le misure di trasmissione della luce dopo che essa ha interagito con le gocce, e una parte fluidica, che permette la formazione delle gocce all'interno del dispositivo.

Il sistema di rivelazione del passaggio delle microgocce di proteine si basa su un circuito ottico che fa uso di un fascio laser (Uniphase 1107P di 4 mV di potenza) di lunghezza d'onda $\lambda = 633$ nm, collimato e polarizzato orizzontalmente. Lo schema nella seguente figura mostra come si presenta il banco ottico in una visione dall'alto

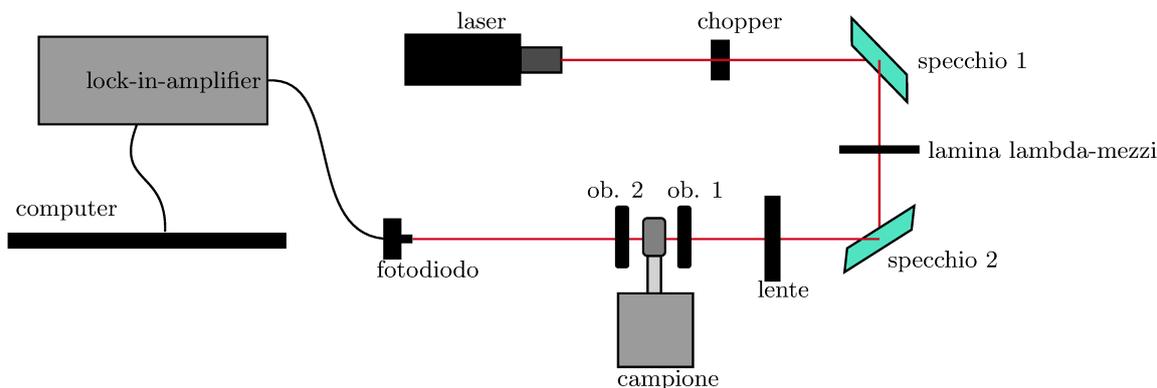


Figura 3.1: Schema di acquisizione

Il primo ostacolo che il fascio incontra è un *chopper* ottico Scitec Instruments Ltd 300C: un oggetto di forma circolare dotato di fenditure che ruotando permette di modulare il fascio laser consentendo il passaggio di alcuni fotoni selezionati impostando i valori della frequenza di rotazione. Il *chopper* ha l'obiettivo di tagliare fuori dalla rivelazione i fotoni che possono provenire da fonti luminose non desiderate (come per esempio la luce di una lampadina), garantendo una maggior stabilità del segnale finale misurato. Successivamente il fascio passa attraverso un sistema di specchi e lenti che rispettivamente deflettono il fascio e riducono la sua naturale divergenza, inoltre un polarizzatore a lambda-mezzi garantisce la polarizzazione TM del fascio di luce che viene accoppiato con la guida ottica presente nel dispositivo optofluidico.

A questo punto il fascio laser entra nel primo obiettivo del sistema di rivelazione, attraversa il campione di niobato di litio seguendo la guida di luce drogata in titanio ed esce dal campione andando a raccogliersi nel secondo obiettivo, che lo indirizza verso il sistema di lettura costituito da un fotodiodo. Quindi il segnale viene elaborato da un amplificatore Lock-in Stanford Research Systems SR830 DSP per poi passare al controllo del computer, che permette una verifica grafica dei dati in acquisizione, ma anche di regolare alcuni parametri come l'intervallo di acquisizione e il salvataggio dei dati. Immediatamente sotto il *chip* è anche presente una fotocamera collegata ad un computer portatile

che permette di osservare con un'elevata risoluzione il passaggio delle gocce di fluido attraverso il canale, di scattare istantanee e di filmare il processo fisico che avviene. Si tratta di un *imaging* a contrasto, infatti è necessaria una fonte luminosa (una lampadina opportunamente schermata) per poter osservare correttamente e nettamente i canali microfluidici.

Accoppiamento delle guide

Uno dei passi più importanti per la riuscita dell'esperimento è l'accoppiamento del fascio con le guide di luce presenti nel campione di niobato di litio. Questa operazione si esegue nel momento in cui il campione è già montato e pronto per la presa dati e consiste nell'allineamento del fascio laser con l'entrata della guida di luce, per far in modo che la maggior parte dei fotoni del fascio entrino nella guida in titanio e vengano quindi confinati e guidati fino all'uscita della guida stessa.

Poiché il fascio di luce ha una dimensione in uscita dal laser che è di circa 1 mm, se lo si allineasse direttamente con la guida di luce si perderebbe la maggior parte dell'intensità luminosa a disposizione. Per ovviare a tale problema conviene ridurre il diametro del fascio laser fino a quando le sue dimensioni non sono circa uguali a quelle della guida in titanio (circa $3 \mu m$). Il successivo allineamento (anche detto accoppiamento) di guida e fascio laser risulta difficoltosa per le ridotte dimensioni dei due oggetti, ma se ne trae notevole beneficio in termini di guadagno dell'intensità luminosa guidata all'interno del *chip* optofluidico. Sapendo come si comporta la luce quando passa attraverso una lente (figura 3.2), muovendo il campione con i micrometri ci si deve portare nella condizione in cui l'ingresso al campione si trova esattamente nel minimo raggio del fascio, in questo modo tutta la luce potrà entrare e partecipare alla presa dati.

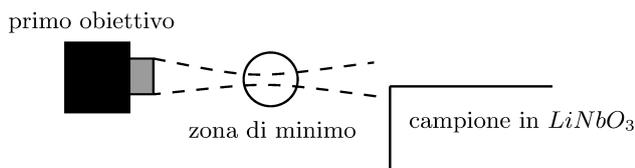


Figura 3.2: Schema di funzionamento dell'accoppiamento; in questo caso il campione dovrà essere spostato verso l'alto e verso sinistra

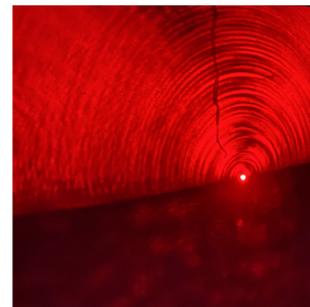


Figura 3.3: Proiezione su uno schermo del fascio che attraversa una guida con accoppiamento ottimale

Dopo aver ottimizzato l'ingresso del fascio laser nella guida di luce, si procede con l'uscita andando a spostare opportunamente il secondo obiettivo (non più il campione) con il relativo micrometro. Il principio fisico che sottostà questa seconda ottimizzazione è lo stesso del primo caso e si può vedere in figura 3.2.

Naturalmente la posizione del *chip* sul supporto del banco ottico dev'essere tale da mantenere le guide parallele al fascio laser, per cui questa viene regolata con dei micrometri modificano l'altezza, l'inclinazione rispetto il piano del banco ottico e rispetto la verticale.

Flussaggio della soluzione e processo di formazione delle gocce

Una volta che il *chip* è pronto e montato correttamente si può procedere con i preparativi per iniettare la soluzione proteica. Per incominciare a produrre gocce all'interno del campione si utilizzano due pompe come modulatori di pressione e di flusso (Elveflow OBI Mk3 Pressure Controller), infatti variando questi due parametri per l'esadecano (la fase continua oleosa) e per la soluzione proteica (fase dispersa polare) è possibile controllare sia la velocità che le dimensioni delle microgocce [2].

Si legano i tubicini di ingresso precedentemente incollati sul coperchio in vetro alle cannule che li collegano alle provette contenenti le due sostanze, si collegano anche gli ingressi delle provette con l'output delle pompe, poi si monta il tubicino di scarico per raccogliere la mistura di esadecano e soluzione proteica che ha attraversato tutto il canale microfluidico. Una volta impostati i parametri

si azionano le pompe e i fluidi incominciano a scorrere.

Il processo di formazione delle gocce adottato in questo caso è di tipo *passivo*, cioè si sfrutta l'immiscibilità dei liquidi che si incontrano in una *T-junction* e formano gocce le cui dimensioni dipenderanno da parametri intrinseci dei fluidi come tensione superficiale, viscosità, densità ma anche da parametri impostati manualmente come il flusso della parte dispersa e quello della parte continua. Quello che si verifica nei pressi della *T-junction* lo possiamo vedere nella figura in basso di 2.6: la pressione esercitata dai flussimetri sulla fase dispersa genera un menisco via via più sporgente, l'interfaccia di questa porzione viene distorta dal movimento della fase continua. Il distacco finale della goccia avviene ad una determinata lunghezza e si verifica nel momento in cui la pressione esercitata dalla fase continua riesce a sopraffare la viscosità della fase dispersa nel collo presente al limite della giunzione. Variando la velocità del processo è possibile avere produzione di gocce in regime di *dripping* (goccioline piccole, asimmetriche, la cui forma non dipende dalla geometria e che non ostruiscono il canale) oppure in *squeezing* (gocce grandi, con menischi più simmetrici legati alla geometria e quindi controllabili). Naturalmente per questo lavoro di tesi è stato scelto il secondo andamento, per il quale è possibile sfruttare una legge (verificata sperimentalmente) che lega le caratteristiche dei fluidi alla lunghezza della goccia:

$$\frac{L}{l_c} = 1 + \alpha \frac{\Phi_d}{\Phi_c} \quad (3.1)$$

in cui L è la lunghezza della goccia, l_c la larghezza del canale, Φ_d e Φ_c i flussi rispettivamente della fase dispersa e continua mentre α è un parametro di *fitting* che racchiude in sé le caratteristiche della fase dispersa come la temperatura, la viscosità e la tensione superficiale [5].

Il risultato finale è la presenza di gocce idealmente della stessa lunghezza ed equispaziate. Solo in questo modo è possibile scorporare all'interno del segnale il contributo dipendente dalle caratteristiche geometriche del sistema da quello relativo al contenuto della goccia, che è quello che vogliamo estrarre.

3.2 Presa dati

Il processo che porta all'acquisizione del segnale da parte del fotodiodo è schematizzato in figura 3.4. Come si può vedere è stato raffigurato un *chip* completo di substrato in niobato di litio e di coperchio in vetro, in cui è presente la guida di luce in colore rosso, già accoppiata con il fascio laser, e la fase dispersa in azzurro immersa nella fase continua, in cui la freccia indica la direzione del flusso.

È importante notare come non tutto il volume della goccia sia intercettato dalla guida, la quale non spazza nemmeno tutta la sua lunghezza; invece viene rivelata solamente la parte di fase dispersa che rientra nella profondità della guida, cioè i $3 \mu m$ superiori rispetto un totale di $100 \mu m$ di profondità del canale microfluidico. Gli estremi che sono messi in evidenza corrispondono all'inizio e alla fine del segnale intercettato dal laser e rappresentano ciò che successivamente si deve elaborare. Se si osserva la figura 3.5 sottostante, questi estremi corrispondono a quelli che sono stati chiamati t_i e t_f , che sono rispettivamente tempi di inizio e fine del segnale della goccia.

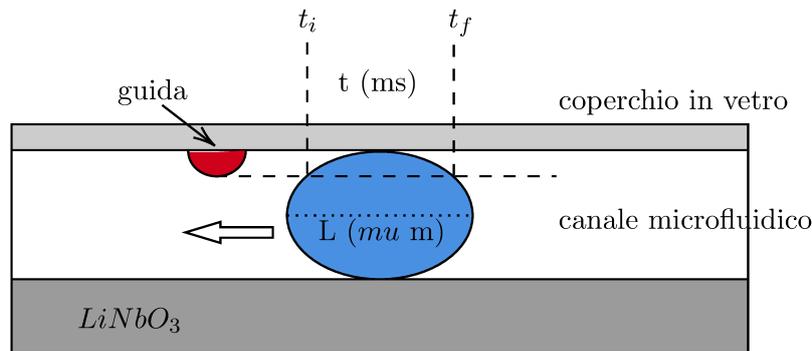


Figura 3.4: Visione laterale del funzionamento del *chip*; t (ms) corrisponde alla porzione di goccia che interagisce con la guida di luce e genera il segnale rivelato dai sensori

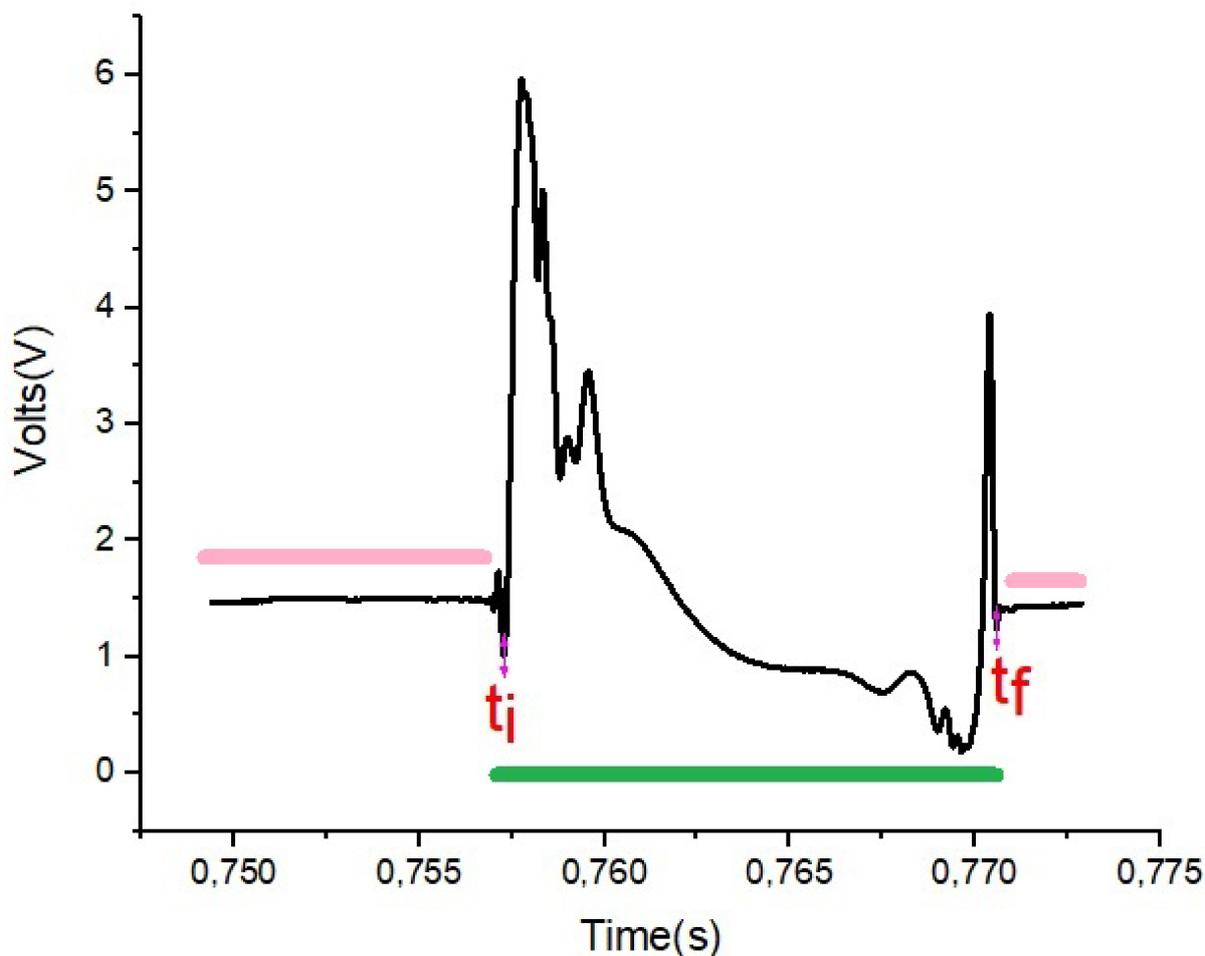


Figura 3.5: Segnale ottenuto dal chip optofluidico e generato da una goccia di soluzione *baseline*

Ai fini di una corretta analisi dei dati che porti a isolare il solo contributo dovuto alle proteine, è necessario acquisire anche l'intensità luminosa relativa alle goccioline di *baseline*, che andrà poi sottratta a quella relativa alla soluzione proteica. La soluzione *baseline* è costituita dallo stesso mix di acqua e reagente Bradford usato per la soluzione proteica, ma a differenza di quest'ultima contiene una concentrazione nulla di proteine.

I dati acquisiti in laboratorio sono stati divisi in termini di concentrazione della proteina: il primo campione aveva una concentrazione di $0.28 \frac{mg}{mL}$ mentre il secondo di $1.4 \frac{mg}{mL}$. Nel primo caso è stata effettuata una sola acquisizione al minuto 0 sia per la *baseline* che per la soluzione, i dati del secondo campione invece sono stati raccolti ogni quattro minuti per un totale di 11 campionamenti (dal minuto 0 al minuto 40) tanto per la *baseline* quanto per le proteine. Ogni *file* è il risultato della presa dati per circa 10 secondi e contiene il segnale di 150 gocce.

Per ognuno di questi *run* ho selezionato singolarmente le prime 20 gocce per rappresentarle in un grafico tramite il *software* di analisi dati *Origin*. Nella figura 3.5 è riportato un esempio di come si presenta il segnale relativo a una goccia di *baseline*, la figura 3.6 mostra visivamente la differenza tra il segnale di una goccia di *baseline* e quello di una goccia di soluzione proteica in concentrazione $1.4 \frac{mg}{mL}$, infine il grafico 3.7 riporta in un unico sistema cartesiano il segnale di due gocce nelle due diverse concentrazioni di soluzione proteica qui considerate.

In particolare nell'immagine 3.5 ho messo in evidenza le varie parti che lo costituiscono: in rosa si può individuare il segnale relativo all'esadecano (ossia la fase continua) che precede e segue la goccia, caratterizzato da un assorbimento pressoché costante, mentre il colore verde corrisponde al segnale della goccia incluso tra gli istanti che sono stati chiamati t_i e t_f corrispondenti ai minimi locali del segnale registrato.

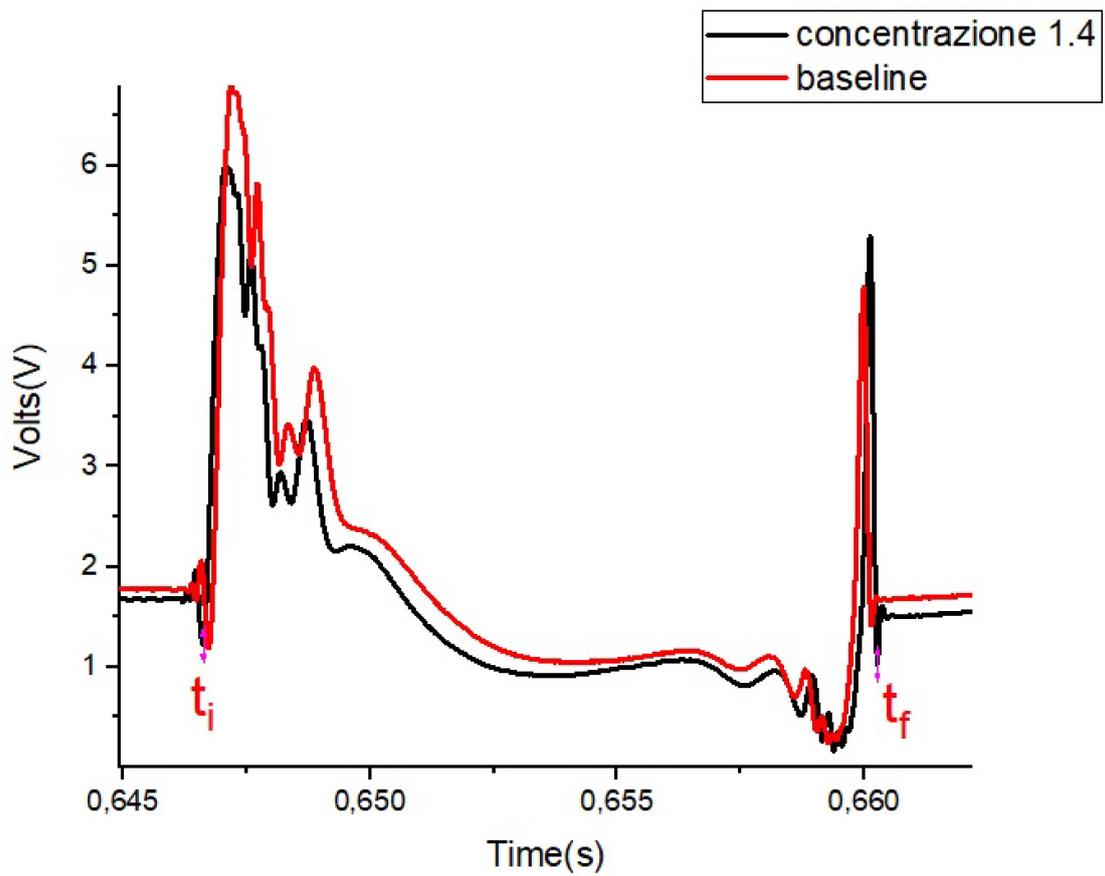


Figura 3.6: segnale registrato dal chip optofluidico e ottenuto da una goccia di soluzione a concentrazione 1.4 $\frac{mg}{mL}$ (nero) e corrispondente baseline (rosso)

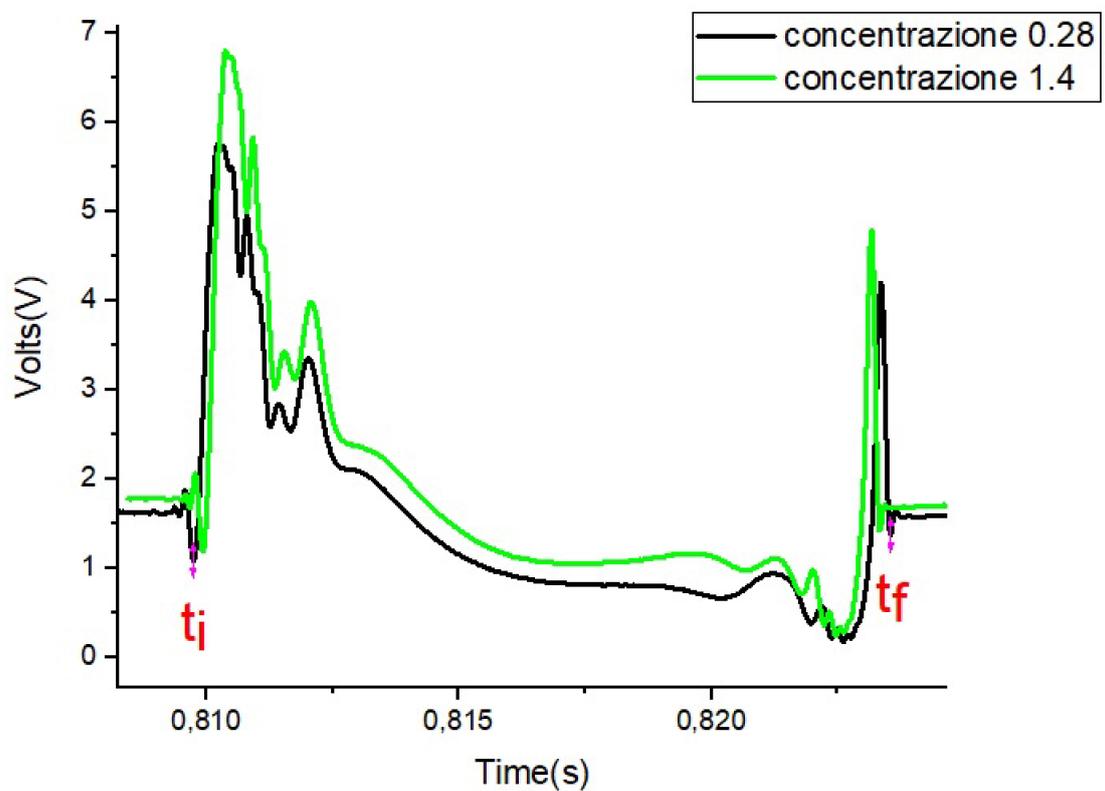


Figura 3.7: Segnale registrato dal chip optofluidico e ottenuto da una goccia di soluzione a concentrazione 1.4 $\frac{mg}{mL}$ (verde) e 0.28 $\frac{mg}{mL}$ (nero)

Per ricavare il segnale relativo alla fase continua ho selezionato un *range* approssimativo precedente alla goccia e ne ho ricavato la media (I_{olio}) con il relativo errore dato dalla deviazione standard; invece per l'intensità relativa alla goccia ho calcolato l'integrale del segnale compreso tra i minimi sopra citati (I_p). Successivamente ho calcolato il rapporto $R = \frac{I_p}{I_{olio}}$ per poter compensare eventuali differenze di accoppiamento della luce sia durante uno stesso *run* di misura che tra misure differenti, come si può notare dalle figure 3.6 e 3.7. Infatti un diverso accoppiamento della luce si traduce in una diversa intensità del segnale ottico registrato, perciò si prende come riferimento la fase continua per aggirare tali differenze. Un esempio di questo tipo di lavoro è riportato in tabella 3.1, in cui ho riportato i dati acquisiti per la sola misura al minuto 0 nella concentrazione $1.4 \frac{mg}{mL}$.

numero della goccia	l_{olio}	$\sigma_{I_{olio}}$	I_p	R	σ_R
1	1.59	0.04	0.0219	0.0137	0.0003
2	1.55	0.03	0.0223	0.0143	0.0003
3	1.53	0.02	0.0228	0.0149	0.0002
4	1.62	0.03	0.0222	0.0137	0.0003
5	1.58	0.05	0.0224	0.0142	0.0004
6	1.55	0.02	0.0229	0.0148	0.0002
7	1.60	0.04	0.0223	0.0139	0.0003
8	1.59	0.03	0.0221	0.0139	0.0003
9	1.60	0.03	0.0227	0.0142	0.0003
10	1.60	0.04	0.0226	0.0141	0.0004
11	1.61	0.04	0.0227	0.0138	0.0003
12	1.59	0.03	0.0229	0.0144	0.0003
13	1.63	0.04	0.0231	0.0142	0.0003
14	1.62	0.04	0.0224	0.0138	0.0003
15	1.60	0.04	0.0229	0.0143	0.0004
16	1.61	0.04	0.0232	0.0144	0.0004
17	1.61	0.04	0.0225	0.0140	0.0003
18	1.61	0.03	0.0226	0.0140	0.0003
19	1.62	0.04	0.0231	0.0142	0.0004
20	1.62	0.04	0.0225	0.0140	0.0003

media degli R errore
0.0142 0,0003

Tabella 3.1: Esempio di acquisizione dei dati

Nella tabella 3.1 l'errore al valore di R è stato calcolato solamente a partire dall'errore fornito per I_{olio} . Questo è giustificato dal fatto che i dati forniti dal fotodiode non avevano un errore associato, dunque per l'operazione di media matematica applicata ai dati relativi all'assorbimento dalla fase continua è stato semplice calcolare un possibile risultato che potesse essere trattato come errore (lo scarto quadratico medio per l'appunto), mentre per l'integrale questo non è plausibile perché si tratta di una semplice somma a cui non può essere applicata alcuna propagazione.

La scelta di utilizzare lo scarto quadratico medio come errore associato alla media dei rapporti delle 20 gocce ha un fondamento di tipo sperimentale. È noto che in generale alla media si possono attribuire due tipologie concettualmente differenti di errori. Il primo è figlio della propagazione degli errori se si pensa alla media come funzione numerica: chiamando i dati a disposizione x_i e σ_i gli errori associati (con $i = 1, \dots, N$) si ha che

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_N}{N} \quad \longrightarrow \quad \sigma_{\bar{x}} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N \sigma_i^2}}{N}$$

Il secondo invece è estratto da un campione di dati a priori privi di errore e si calcola a partire dalla

deviazione standard:

$$\sigma_{\bar{x}2} = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad \text{con} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad \text{scarto quadratico medio}$$

La scelta di utilizzare solo la deviazione standard è frutto di considerazioni riguardanti gli ordini di grandezza ottenuti con la definizione rigorosa: gli errori sono inizialmente risultati troppo piccoli per poter essere accettati senza ripercussioni sulla compatibilità dei dati, questo significa che c'è stata una sovrastima della sensibilità dello strumento che dev'essere corretta, per esempio modificando proprio la definizione di errore.

Complessivamente quindi avevo a disposizione un valore per la *baseline* e uno per il segnale in concentrazione $0.28 \frac{mg}{mL}$, e 11 valori per *baseline* e segnale in concentrazione $1.4 \frac{mg}{mL}$. Le immagini 3.8 e 3.9 forniscono una rappresentazione visiva di queste ultime misure, nonché del loro rapporto.

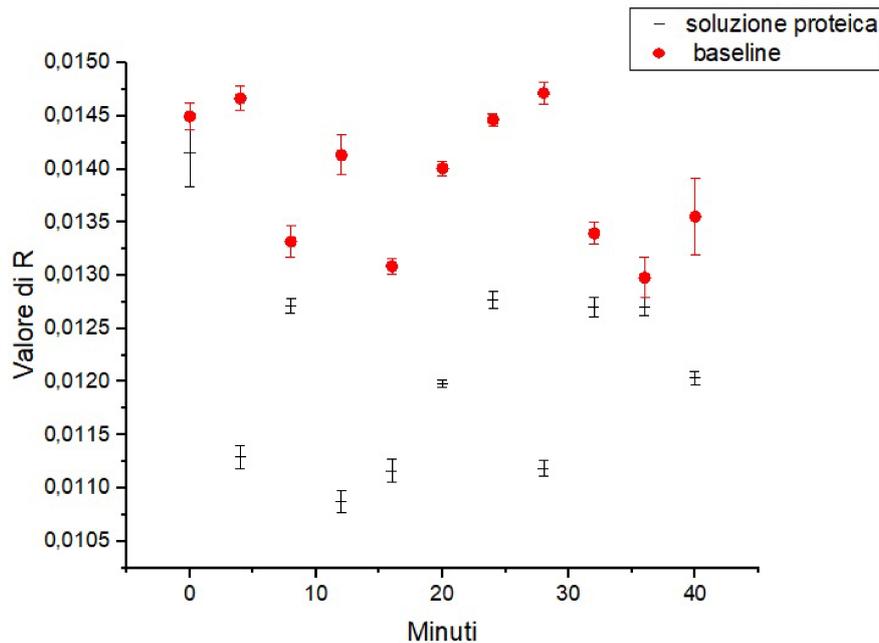


Figura 3.8: Valori del parametro R per la soluzione proteica a concentrazione massima (in nero) e corrispondente *baseline* (in rosso)

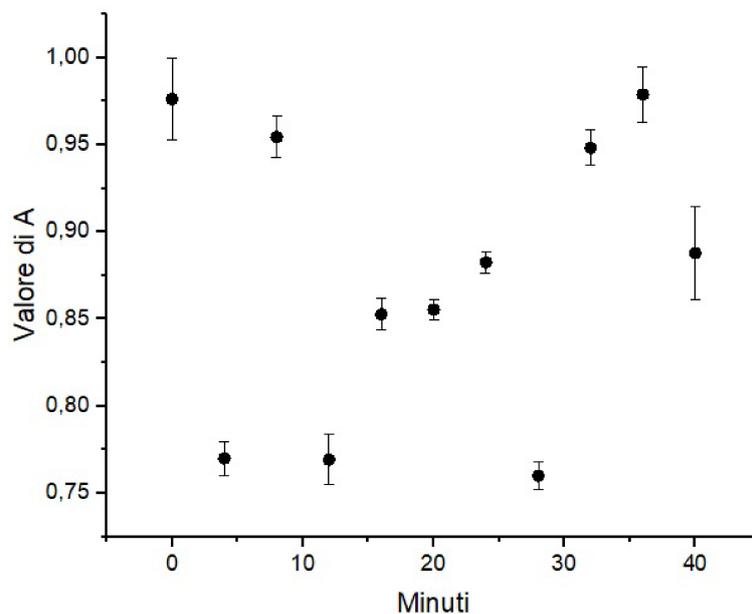


Figura 3.9: Valori del rapporto A tra proteina e *baseline*

Come si evince dal grafico, i valori presentano una compatibilità abbastanza buona tra di loro, e ciò giustifica l'operazione di media che è stata fatta per riportarsi ad un unico valore di assorbanza. Le variazioni osservate sia nei valori di I_p che di I_b sono con buona probabilità imputabili a piccole fluttuazioni temporali nei flussi delle pompe usate per immettere nel circuito le fasi continua e dispersa, che si traducono in una variazione nella lunghezza della goccia e, pertanto, nel valore dell'integrale del segnale calcolato. I risultati comunque dimostrano che tali fluttuazioni sono piccole e poco significative ai fini del calcolo della trasmittività ottica della soluzione analizzata. Questo andamento ci permette anche di verificare se effettivamente il *chip* sia in grado di effettuare misure ripetibili per almeno 40 minuti mantenendo un'ottima stabilità delle misure.

Per la concentrazione massima di proteine ho calcolato la media delle 11 acquisizioni per *baseline* e soluzione in modo da ricondurmi ad un solo valore rappresentativo del segnale fornito dal fotodiodo. Successivamente ho calcolato il rapporto tra le medie dei segnali e le medie delle *baseline* $A = \frac{I_p}{I_b}$ (come riportato in figura 3.9) allo scopo di isolare il contributo di assorbimento della sola proteina, in questo modo è possibile eliminare i contributi dovuti all'assorbimento da parte di altre eventuali molecole presenti nella soluzione.

Dal punto di vista matematico, l'intensità della luce uscente dalla guida (e quindi rivelata dal fotodiodo) ha un andamento esponenziale che dipende da diversi parametri e che è descritta dalla formula di Lambert-Beer: se definiamo come I_f l'intensità luminosa uscente e I_i quella entrante nel dispositivo optofluidico, si ha che

$$I_f = \gamma I_i e^{-\alpha \cdot d} \quad \text{con} \quad \alpha = \alpha_p + \alpha_a \quad (3.2)$$

in cui γ è un parametro che rispecchia la quantità rispetto il totale della luce entrante del *chip* ($\gamma \in [0, 1]$, vale 1 se entra tutta nella guida mentre vale 0 se non entra affatto) e d è la larghezza del canale microfluidico. Merita maggior attenzione α , coefficiente che tiene conto dell'assorbimento da parte delle proteine e degli altri composti presenti nella soluzione acquosa: questo può essere scorporato in una parte relativa all'assorbimento da imputarsi esclusivamente alle proteine e una parte associata all'assorbimento di altre particelle o molecole disperse. Quello che abbiamo definito come I_f può essere riferito tanto alla *baseline* (che ricordiamo essere priva di BSA) quanto alla soluzione proteica, dunque per queste due possiamo scrivere un'apposita equazione:

$$I_p = \gamma_p I_i e^{-(\alpha_p + \alpha_a) \cdot d} \quad I_b = \gamma_b I_i e^{-\alpha_a \cdot d} \quad (3.3)$$

Il coefficiente γ per le due soluzioni, che in 3.3 abbiamo mantenuto distinto, in realtà risulta essere lo stesso ($\gamma_p = \gamma_b$) grazie al rapporto che è stato precedentemente effettuato tra segnale della fase dispersa e segnale della fase continua ($\frac{I_p}{I_{olio}}$): se infatti γ rappresenta il grado di accoppiamento della guida di luce con il fascio laser, il rapporto in questione permette di trascurare nell'analisi eventuali variazioni di intensità dovute a disaccoppiamenti delle guide durante le misure o non perfetti accoppiamenti della guida all'inizio dell'acquisizione, rendendo quindi confrontabili tra loro i risultati ottenuti a diversi tempi di acquisizione.

A questo punto si intuisce che facendo il rapporto tra il segnale della proteina e il segnale della *baseline* quello che otteniamo è un contributo esclusivamente imputabile alla presenza della BSA in soluzione:

$$A = \frac{I_p}{I_b} = e^{-\alpha_p \cdot d} \quad (3.4)$$

Il risultato di questa prima analisi è riportato in tabella 3.2; l'errore associato alle medie è la deviazione standard della distribuzione mentre per il rapporto si rimanda alla propagazione degli errori che per questo caso si scrive come:

$$\sigma_A = \sqrt{\frac{1}{I_b^2} \sigma_{I_p}^2 + \frac{I_p^2}{I_b^4} \sigma_{I_b}^2} \quad (3.5)$$

Questi rapporti possono essere messi a confronto con il valore unitario dato dal rapporto della *baseline* con se stessa, il risultato è mostrato nel grafico 3.10, mentre in tabella 3.3 sono riportati i valori del parametro A acquisiti mediante spettrofotometro.

concentrazione	$I_b \pm \sigma_{I_b}$	$I_p \pm \sigma_{I_p}$	A
1.4	0.01389 ± 0.00005	0.01214 ± 0.00004	0.874 ± 0.004
0.28	0.0146 ± 0.0001	0.013309 ± 0.000004	0.910 ± 0.009

Tabella 3.2: Tabella dei rapporti ottenuti con una prima analisi

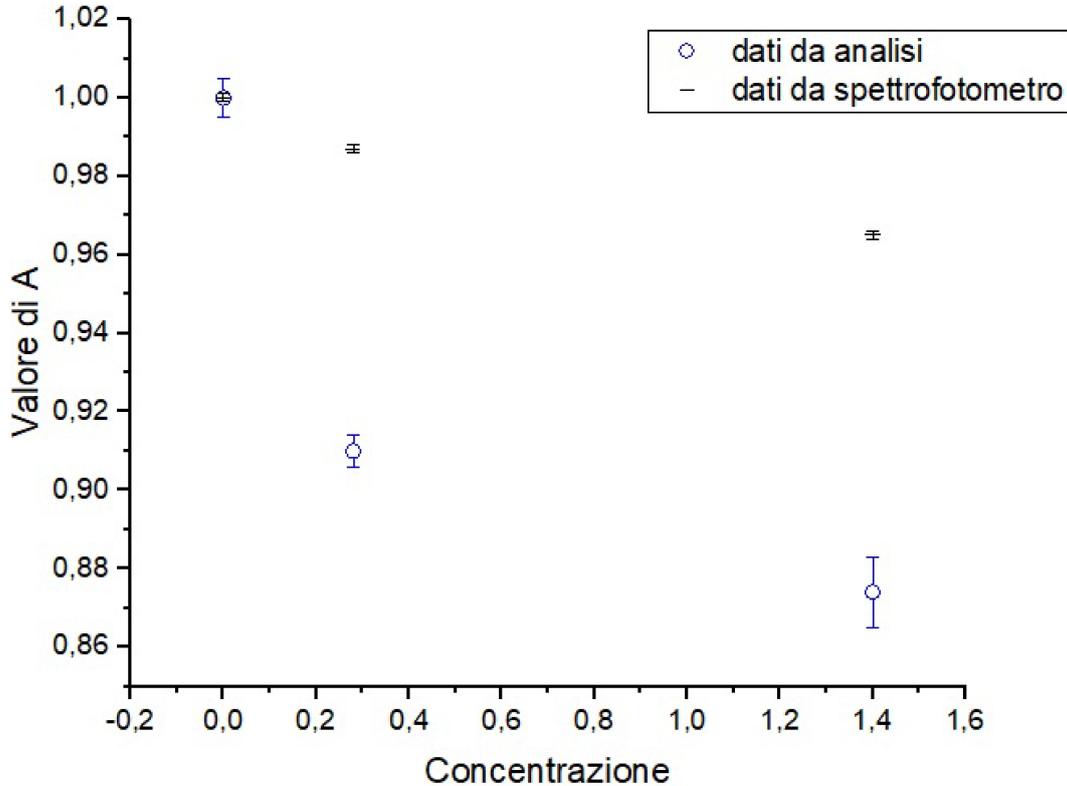


Figura 3.10: Variazione del parametro A al variare della concentrazione di proteina

concentrazione	$A \pm \sigma_A$
$0 \frac{mg}{mL}$	1.000 ± 0.001
$0.28 \frac{mg}{mL}$	0.987 ± 0.001
$1.4 \frac{mg}{mL}$	0.965 ± 0.001

Tabella 3.3: Valore del rapporto acquisito con spettrofotometro

Come previsto dalla legge di *Lambert-Beer*, all'aumentare della concentrazione proteica, ossia all'aumentare delle molecole che assorbono la luce, si ha un calo nell'intensità della luce trasmessa dal *chip* opto-fluidico individuata dal parametro A . In particolare, nell'intervallo di concentrazione proteica analizzato (tra $0 \frac{mg}{mL}$ e $1.4 \frac{mg}{mL}$) la variazione di intensità luminosa trasmessa è pari a circa il 12%, con una precisione nei parametri di trasmittività osservata dell'1%, che si traduce in un errore del solo 3% nella determinazione della concentrazione proteica stimata con il dispositivo opto-fluidico.

Inoltre, possiamo confrontare i risultati ottenuti con il dispositivo proposto in questa tesi con quelli derivati da un'analisi ottica fatta sulle stesse concentrazioni proteiche, ma usando uno spettrofotometro da laboratorio: in figura 3.10 sono riportati i dati derivati dalle due diverse analisi, da cui si deduce che il nostro sistema è molto più sensibile alle variazioni di contenuto proteico in soluzione acquosa, mostrando una maggiore variazione nell'intensità trasmessa rispetto al caso dello spettrofotometro.

A ciò, si aggiunge il chiaro vantaggio che ne deriva dall'uso del *chip* optofluidico rispetto allo spettrofotometro, dato dal fatto che nel primo caso pochi nanolitri di soluzione sono sufficienti ad ottenere una stima della concentrazione proteica, mentre nel secondo caso l'analisi richiede l'uso di millilitri di soluzione, con conseguente maggior spreco di materiale biologico.

Capitolo 4

Conclusioni e prospettive

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo principale la stima della concentrazione della proteina albumina sierica bovina (BSA) dispersa in una soluzione acquosa contenente il reagente Bradford tramite l'uso di un dispositivo optofluidico interamente realizzato in niobato di litio. Il niobato di litio ($LiNbO_3$) è materiale cristallino le cui proprietà si prestano molto bene a integrazioni di una parte che riguarda l'ottica con una parte fluidica. Queste proprietà possono essere modificate localmente mediante drogaggio con atomi donori o accettori di elettroni. In questo caso particolare è stato possibile, in fase di preparazione, drogare il materiale con atomi di titanio, che modificano localmente l'indice di rifrazione del substrato. Il processo che porta dal cristallo al *chip* completo è costituito di molti passaggi che devono essere portati a termine con un'elevata precisione. Infatti, trattandosi di tecnologie *lab-on-a-chip*, tutte le grandezze che caratterizzano il sistema non sono macroscopiche, ma hanno un piccolo ordine di grandezza e richiedono quindi interventi accurati e meticolosi, che allungano il tempo di completamento del dispositivo. La preparazione del substrato di niobato di litio incomincia con una pulizia accurata e profonda del pezzetto di cristallo precedentemente tagliato, prosegue con la creazione delle guide di luce mediante diffusione termica dell'atomo drogante scelto (il titanio), poi in fase di *lapping* e *polishing* si perfezionano gli ingressi del fascio laser nelle guide di luce, infine si conclude con la creazione dei canali microfluidici in configurazione *T-junction*, incidendo la superficie con una sega circolare di precisione. Per poter completare il *chip* si chiude il substrato con un coperchio in vetro, sul quale sono stati praticati dei fori in corrispondenza degli estremi dei canali microfluidici, e si incollano i due elementi polimerizzando un particolare collante molto usato in ambito ottico. Il processo di preparazione si conclude con la realizzazione degli ingressi e la funzionalizzazione.

All'interno del canale microfluidico principale scorrono la fase continua, costituita da esadecano, e la fase dispersa, che si presenta sottoforma di goccioline. La possibilità di frazionare la soluzione biologica in microgocce di pochi nanolitri permette di avere grandi vantaggi rispetto altri metodi di esame che portano allo stesso risultato, infatti lo spreco di soluzione in questo caso è ridotto al minimo, inoltre la presenza della fase continua offre anche il servizio di protezione del contenuto della gocciolina dalle interazioni con il canale microfluidico che la ospita. Le dimensioni delle gocce possono essere gestite impostando opportunamente i parametri di flusso del *set-up* sperimentale. Tramite un laser e un fotodiodo è possibile valutare l'assorbanza dell'intera soluzione proteica in gocce e successivamente, con l'analisi dei dati, si può giungere alla sola assorbanza associata alla BSA.

Le misure di assorbimento ottico sono quindi state realizzate interamente all'interno del chip optofluidico usando due diverse concentrazioni di soluzioni proteica, pari a $0.28 \frac{mg}{mL}$ e $1.4 \frac{mg}{mL}$. In particolare, si è osservata una diminuzione del segnale luminoso trasmesso dal dispositivo optofluidico all'aumentare della concentrazione proteica, in accordo con quanto previsto dalla legge di Lambert-Beer. I valori di trasmittanza variano da 1 a $0.087 \pm 0,004$ nell'intervallo di concentrazione proteica studiato e tale variazione risulta maggiore di quella ottenuta con lo spettrofotometro, tipico strumento di laboratorio impiegato per l'analisi dell'assorbimento ottico dei materiali, che però nel caso dei liquidi richiede volumi dei campioni pari a qualche millilitro. Il dispositivo caratterizzato in questa tesi risulta quindi più sensibile a variazioni nel contenuto di proteina presente in una soluzione proteica, e al contempo permette di sprecare meno materiale biologico, necessitando di pochi nanolitri di campione per la realizzazione delle misure.

Bibliografia

- [1] R. Zamboni; Study of light driven phenomena for optofluidic applications in Lab-on-a-chip platforms in lithium niobate, PhD thesis, PhD School of Physics, University of Padova, 2019.
- [2] L. Zanini; Dispositivo opto-microfluidico in Niobato di Litio per la caratterizzazione di gocce con nanoparticelle d'Oro, tesi di laurea magistrale, 2018.
- [3] A. Giangiacomi; Sensore opto-microfluidico integrato in Niobato di Litio per determinare la concentrazione di proteina, tesi di laurea triennale, 2021.
- [4] G. Bettella; Integrated Opto-Microfluidic Lab-on-a-Chip in Lithium Niobate for Droplet Generation and Sensing, PhD thesis, PhD School of Physics, University of Padova, 2016.
- [5] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A. Stonec, G. M. Whitesides; Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction — scaling and mechanism of break-up, 2006.
- [6] E. Turato; Opto-microfluidic device in Lithium Niobate to investigate the proteins synthesis. Master's thesis, Department of Physics, University of Padova, 2021.
- [7] Shia-Yen Teh, Robert Lin, Lung-Hsin Hung, and Abraham P Lee; Droplet microfluidics. 2008
- [8] https://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin, 2022