

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Studio della dinamica del viraggio di PH chimico mediante  
una piattaforma opto-microfluidica

Relatore

Prof.ssa Cinzia Sada

Correlatore

Dr. Riccardo Zamboni

Laureando

Elena Izzo

Anno Accademico 2018/2019



# Introduzione

Il progetto di ricerca, in cui si inserisce questo lavoro di tesi, consiste nella realizzazione di una piattaforma opto-microfluidica totalmente integrata in niobato di litio in grado di svolgere varie funzioni di sensing per applicazioni biologiche, mediche e di analisi chimico-fisica. In particolare, il progetto intende sviluppare un nuovo metodo di investigazione del comportamento di singole reazioni chimiche la cui velocità o efficacia è mediata da processi foto-indotti e studiare quindi gli effetti di fotoattivazione in modo dinamico e selettivo. Questo scopo può essere raggiunto coniugando le potenzialità della trasmissione confinata di segnali ottici, proprie dell'ottica integrata e della fotonica in genere, con le proprietà della microfluidica, che consiste nel trasporto e nella manipolazione di fluidi a volumi estremamente ridotti (dell'ordine di pL-nL) mediante l'utilizzo di canali della dimensione micrometrica. In particolare, in microfluidica è possibile, mescolando fasi fluide immiscibili, creare gocce microscopiche in ciascuna delle quali è possibile attivare una data reazione chimica. In questo modo le gocce fungono da microsistemi di riferimento o, più specificatamente, da microreattori e possono essere veicolate, ove necessario, mediante canali di scorrimento microfluidici (sia aperti che chiusi) per la successiva analisi.

All'interno di questo ambito, gioca un ruolo determinante la misura accurata del pH di una soluzione. Ad oggi i sistemi più comuni per la misura del pH e del punto di viraggio sono sistemi macroscopici la cui precisione e accuratezza sono fortemente dipendenti dalle condizioni di lavoro.

Il progetto di ricerca mira a fornire uno strumento alternativo in grado di sfruttare la precisione e l'accuratezza proprie dell'analisi microfluidica per stimare il pH di una soluzione con un dispositivo che sfrutta la proprietà ottica di un indicatore aggiunto nelle soluzioni a cambiare colore al punto di viraggio.

Ad oggi vi sono già delle tecniche ottiche impiegate per rispondere a questa esigenza e sono già accoppiate ai circuiti microfluidici: esse si avvalgono di microscopi ottici o sistema di rivelazione ad immagine e prevedono perciò l'accoppiamento di camere ad alta risoluzione e relativa interfaccia, il tutto piuttosto macchinoso e voluminoso rispetto il circuito microfluidico. La possibilità di ottenere una piattaforma onnicomprensiva sia dello stadio microfluidico sia di quello ottico e provvedere all'analisi del viraggio pH con un dispositivo anche portatile è estremamente innovativo e potenzialmente molto versatile ma non ancora disponibile.

Per raggiungere questo secondo obiettivo è necessario illuminare in modo specifico e mirato il microreattore e analizzarne la risposta a tale illuminazione in modo molto altrettanto selettivo con strumenti integrati nella stessa piattaforma in cui è realizzato il circuito microfluidico. La strada per poter conseguire tale obiettivo è sfruttare l'ottica integrata e il trasporto di luce confinato in guide di luce. Ad oggi sono state già dimostrate applicazioni che impiegano le fibre ottiche, ma esse sono sempre un elemento esterno non integrabile monoliticamente con il circuito microfluidico. Una piattaforma opto-microfluidica è generalmente costituita da una serie di stadi interconnessi in modo ottimale per il trasporto della luce presso la regione in cui il fluido è raccolto e trasportato e la relativa rivelazione dell'interazione luce-fluido. Il numero di stadi implementabili è variabili e può portare alla realizzazione di circuiti opto-microfluidici particolarmente complessi e multifunzionali.

In particolare, l'obiettivo di questo lavoro di tesi consiste nella stima del pH di soluzioni chimiche mediante una piattaforma opto-microfluidica integrata in  $\text{LiNbO}_3$ . Per farlo è stato necessario eseguire misure di trasmittanza di una radiazione laser incanalata nelle apposite guide presenti nel dispositivo. Un'ulteriore particolarità di questo lavoro consiste nell'eseguire misure in maniera dinamica, cioè variando il pH della soluzione immessa nel circuito microfluidico in maniera continua. A tal fine è stato necessario realizzare uno strumento in grado di miscelare due soluzioni a pH differenti in proporzioni diverse.

Il lavoro svolto per questo lavoro di tesi è stato suddiviso in tre capitoli:

- Il primo capitolo presenta una breve parte introduttiva riguardo il pH, il metodo per misurarlo e l'utilità di un indicatore nel presente progetto di tesi per stimare il pH mediante misure di trasmittanza. Inoltre, sono presenti le analisi svolte per determinare la concentrazione ottimale di indicatore da aggiungere alle soluzioni di cui si vuole conoscere il pH e delle misure eseguite mediante metodologia standard per verificare la possibilità di distinguere il pH di una soluzione mediante misure di trasmittanza.
- Il secondo capitolo presenta una breve descrizione del Niobato di Litio e delle sue proprietà e viene presentato il chip opto-microfluidico e la sua configurazione.
- Il terzo capitolo è incentrato sulle misure acquisite utilizzando la piattaforma opto-microfluidica e le analisi eseguite per studiare la dinamica del viraggio di pH.

# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>iii</b>
<b>1 Il pH e la sua misura</b>	<b>3</b>
1.1 Il pH . . . . .	3
1.2 Analisi spettrofotometriche standard del pH . . . . .	4
1.2.1 Errori associati a misure di trasmittanza e di pH . . . . .	4
1.2.2 Analisi concentrazione blu di bromotimolo . . . . .	5
1.2.3 Analisi soluzioni a diverso pH . . . . .	8
<b>2 Piattaforma opto-microfluidica in Niobato di Litio: caratteristiche principali e procedimento di misura</b>	<b>11</b>
2.1 Il Niobato di Litio . . . . .	11
2.1.1 La struttura cristallina . . . . .	11
2.1.2 Proprietà . . . . .	12
2.1.3 Piattaforma opto-microfluidica . . . . .	12
2.2 Sistema di iniezione delle soluzioni . . . . .	12
2.2.1 Configurazione dello strumento . . . . .	12
2.2.2 Acquisizione e analisi dati . . . . .	13
<b>3 Prestazioni della piattaforma opto-microfluidica per l'analisi del pH</b>	<b>19</b>
3.1 Apparato sperimentale . . . . .	19
3.2 Protocollo di misura . . . . .	20
3.2.1 Misura di stabilità . . . . .	21
3.3 Misure per osservare il viraggio di pH . . . . .	22
3.3.1 Acquisizione dati . . . . .	22
3.3.2 Analisi dati . . . . .	23
<b>Conclusioni</b>	<b>29</b>



# Capitolo 1

## Il pH e la sua misura

### 1.1 Il pH

Il pH è una scala di misura di acidità o basicità di una soluzione acquosa. Esso è basato sulla concentrazione degli ioni idrossonio ( $H_3O^+$ ) presenti in soluzione ed è calcolato nel seguente modo:

$$pH = -\log_{10}[H_3O^+]$$

dove  $[H_3O^+]$  rappresenta la concentrazione espressa in moli/L. Il suo valore è funzione di numerose variabili come la composizione ionica dell'acqua, il tipo di equilibri acido-base che si instaurano in soluzione e la temperatura, per citare le più rilevanti.

Lo strumento ad oggi impiegato per misurare il pH di una soluzione è il pH-metro. In particolare, viene spesso utilizzato un pH-metro basato sull'impiego di due elettrodi. La misura si basa sulla differenza di potenziale ai capi di una catena galvanica (pila elettrochimica), costituita da un elettrodo sensibile all'attività degli ioni idrogeno e da uno di riferimento. Generalmente, viene utilizzato un elettrodo a vetro combinato con un opportuno elettrodo di riferimento.

Tale apparecchiatura presenta due principali problemi: il primo legato all'utilizzo di un volume significativo di soluzione di cui misurare il pH (dell'ordine di mL) in quanto è necessario immergere i due elettrodi nel fluido di cui si vuole conoscere il pH; il secondo legato ai tempi di stabilizzazione della lettura nel passaggio da due soluzioni a pH fortemente differenti. Nel presente lavoro di tesi, questa seconda problematica è stata analizzata e si è riscontrato che passando da soluzioni con valori di pH differenti di almeno un'unità il tempo di stabilizzazione della lettura dello strumento variava in un intervallo compreso tra 10 e 30 minuti.

Nel presente lavoro di tesi, si è cercato, inoltre, di realizzare un nuovo sistema di misura di pH in grado di fornire una risposta affidabile sfruttando una piattaforma opto-microfluidica riducendo, in questo modo, i volumi di soluzione in gioco (dell'ordine di pL-nL) e con una prontezza maggiore degli attuali sistemi in uso, in modo da ovviare il problema sopra citato relativo al tempo di stabilizzazione di lettura. In particolare, nel sistema proposto in questo lavoro di tesi, la stima del valore di pH si basa sulla risposta, in termini di trasmittanza, di una radiazione laser incidente, trasportata mediante guide di luce integrate nello stesso substrato dove è contenuta la soluzione. La risposta di tale sistema, come verrà meglio descritto in seguito, permette un'analisi immediata e indipendente dalle precedenti misure in modo da ridurre i tempi di stabilizzazione di lettura.

Per permettere lo studio in trasmittanza delle soluzioni a diverso pH è indispensabile l'utilizzo di un indicatore di colore, ovvero una sostanza che assume colori facilmente distinguibile se aggiunta in soluzioni acide piuttosto che basiche. Questo tipo di sostanze è alla base, ad esempio, del funzionamento della cartina tornasole. In particolare, in questo lavoro di tesi,

è stato utilizzato come indicatore di colore il blu di bromotimolo<sup>1</sup>: un composto organico dalle deboli proprietà acide. Tale scelta è stata dettata dal fatto che il blu di bromotimolo presenta un ampio intervallo di viraggio in termini di pH: esso si presenta di colore giallo in soluzione acide, vira diventando verde in soluzioni con pH tra 6 e 7.6 ed infine si presenta blu in soluzioni basiche. Per poter sfruttare al meglio questa ampia scala di viraggio del blu di bromotimolo è stato deciso di utilizzare soluzioni di HCl<sup>2</sup> e NaOH<sup>3</sup> in quanto, essendo, rispettivamente, un acido e una base forte, permettevano di preparare facilmente soluzioni con un pH compreso in un range tra 2 e 12.

Inoltre, l'aggiunta di un indicatore di colore, quale il blu di bromotimolo, permette di eseguire procedure di titolazioni. Tali procedure consistono nel stabilire il pH incognito di una soluzione e, generalmente, ciò viene fatto mediante l'aggiunta progressiva di un'altra soluzione, chiamata titolante, a pH noto. Nota la quantità di titolante aggiunta per raggiungere il punto di viraggio, cioè il punto in cui l'indicatore cambia colore, è possibile stabilire il pH della soluzione in esame. In questo lavoro di tesi si è cercato di risalire al pH incognito di una soluzione utilizzando la curva di viraggio di pH, ottenuta mediante studi di trasmittanza che permettono di stabilire il colore assunto dalla soluzione, a seguito dell'aggiunta di blu di bromotimolo, e conseguentemente il pH del fluido in esame.

Per verificare il corretto funzionamento della piattaforma opto-microfluidica e delineare i limiti di sensibilità e gli intervalli di applicabilità, è stato effettuato prima uno studio di concentrazione ottimale d'indicatore da aggiungere alle soluzioni. Successivamente, si è condotto un processo di titolazione seguendo una metodologia standard. Di fatto, si sono eseguite misure di trasmittanza, mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro, su soluzioni a pH differenti in modo da poter visualizzare l'andamento della trasmittanza al variare del pH.

## 1.2 Analisi spettrofotometriche standard del pH

In questa sezione sono presentate le analisi svolte, sulla coppia acido-base scelta, seguendo il metodo standard. Sono state eseguite misure di trasmittanza di diversi liquidi eccitando il campione nell'intervallo spettrale compreso tra 400nm e 700nm. In primo luogo si è analizzata la variazione di trasmittanza di una stessa soluzione modificandone la concentrazione di blu di bromotimolo. In secondo luogo, a parità di concentrazione di indicatore, si è analizzata la variazione della trasmittanza in base al pH della soluzione in esame.

### 1.2.1 Errori associati a misure di trasmittanza e di pH

Gli strumenti utilizzati per le misure spettrofotometriche standard del pH, eseguite in questa sezione, sono stati il pH-metro ad elettrodo e lo spettrofotometro. Per stimare l'errore associato alle misure effettuate con tali strumenti si sono seguite due diverse metodologie, di seguito presentate.

Per stimare l'errore associato alla lettura di pH si sono preparate 3 soluzioni a diverso pH (una soluzione basica, una acida e una neutra) e si sono eseguite 3 misure ripetute per ciascuna di esse. Per ogni soluzione si è calcolato l'errore associato alla media come semi-dispersione massima. Dei 3 errori così ottenuti si è deciso di estendere il maggiore, pari a 0.05, a tutte le successive misure di pH in modo da non incorrere in sottostima dell'errore.

Per stimare l'errore associato alla misura di trasmissione di un campione eccitato ad una lunghezza d'onda pari a 633nm si è preparata una soluzione a cui è stato aggiunto blu di

---

<sup>1</sup>CAS Number 76-59-5, peso molecolare  $624.38\text{gmol}^{-1}$ , formula empirica  $C_{27}H_{28}Br_{205}S$

<sup>2</sup>CAS Number 7647-01-0

<sup>3</sup>CAS Number: 1310-73-2

bromotimolo. Sono state eseguite 10 misure ripetute di trasmittanza della medesima funzione e si è calcolata la media dei risultati ottenuti e l'errore ad essa associato come deviazione standard. È stata calcolato l'errore relativo percentuale e tale valore, pari a 0.03%, è stato esteso a tutte le misure di trasmittanza effettuate nel seguito eccitando il campione ad una lunghezza d'onda pari a 633nm mediante spettrofotometro.

### 1.2.2 Analisi concentrazione blu di bromotimolo

Si sono preparate due soluzioni: una a pH di circa 3.8 diluendo HCl in acqua, l'altra a pH di circa 10.5 diluendo NaOH in acqua. Si è preparata una soluzione di blu di bromotimolo a concentrazione 1 mM e la si è utilizzata per variare la concentrazione di blu di bromotimolo nelle due soluzioni: acida e basica. Si è inizialmente riempita la cuvetta (parallelepipedo in quarzo a base quadrata di lato interno pari a 1cm) con 3 mL di soluzione di HCl e si sono eseguite 12 misure aggiungendo ad ogni step 30  $\mu$ L di soluzione di blu di bromotimolo. Le stesse operazioni sono state eseguite per la soluzione di NaOH.

#### Misure di trasmittanza di riferimento

Le soluzioni preparate con diversa concentrazione di blu di bromotimolo sono state analizzate mediante uno spettrofotometro, eccitandole nell'intervallo spettrale compreso tra i 400 nm e i 700 nm e misurando il rapporto tra l'intensità della luce trasmessa e l'intensità della luce incidente, cioè la trasmittanza.

I campioni presentavano una progressiva intensificazione del colore a seguito dell'aggiunta del blu di bromotimolo: la soluzione acida passava da trasparente a un giallo tenue fino ad un giallo intenso; quella basica da trasparente, a un blu tenue fino a un blu intenso. Tali evidenze sono visibili nei grafici 1.1 e 1.2 in cui sono state rappresentate le curve delle varie soluzioni ponendo in relazione trasmittanza e lunghezza d'onda a cui è stato eccitato il campione. La trasmittanza nel caso delle soluzioni acide si mantiene prossima a 1 nella parte destra del grafico (zona del rosso) mentre diminuisce progressivamente all'aumentare della concentrazione di blu di bromotimolo nella zona sinistra del grafico. Nel caso delle soluzioni basiche, invece, il valore di trasmittanza diminuisce, all'aumentare della concentrazione di blu di bromotimolo, in tutto lo spettro analizzato. In termini di ordine di grandezza, variando la concentrazione di un ordine di grandezza la trasmittanza diminuisce di circa 4 volte (questo si verifica nella zona del rosso per sostanze basiche, di colore blu, e nella zona del blu per sostanze acide, di colore giallo).

Questa caratterizzazione ha permesso di individuare le caratteristiche principali nello spettro di trasmittanza al variare della lunghezza d'onda e della concentrazione di indicatore. Tale misure sono state utilizzate come riferimento per caratterizzare la quantità di concentrazione d'indicatore necessaria per poter effettuare misure analoghe mediante la piattaforma opto-microfluidica. In particolare, ci si è concentrati su un valore di lunghezza d'onda prossimo a 632.8 nm, in quanto corrispondente alla lunghezza d'onda di lavoro del laser che è stato utilizzato per l'analisi opto-microfluidica. Lo scopo della successiva analisi era verificare la concentrazione minima di blu di bromotimolo da aggiungere alle soluzioni in modo da poter osservare il viraggio nell'apparato opto-microfluidico. Quest'analisi è stata necessaria per valutare gli effetti di due aspetti: il primo riguarda le dimensioni ridotte del canale microfluidico che possono comportare, a parità di soluzione e di concentrazione di indicatore, un aumento del valore della trasmittanza rispetto a quella attesa macroscopicamente, in quanto intervengono altri fattori quali l'interferenza e la diffrazione. Questo comporta l'utilizzo di una quantità maggiore di indicatore, rispetto al caso macroscopico, per poter distinguere il viraggio delle soluzioni. Il secondo consiste in un fattore chimico e richiede l'utilizzo di indicatori in concentrazioni ridotte in modo da non modificarne le proprietà.

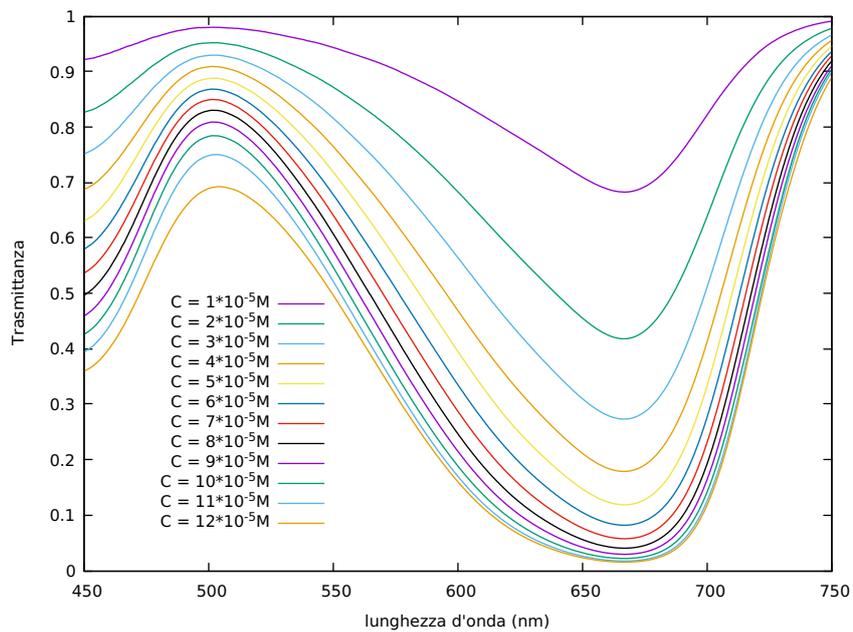


Figura 1.1: Curve della soluzione di NaOH al variare della concentrazione di blu di bromotimolo

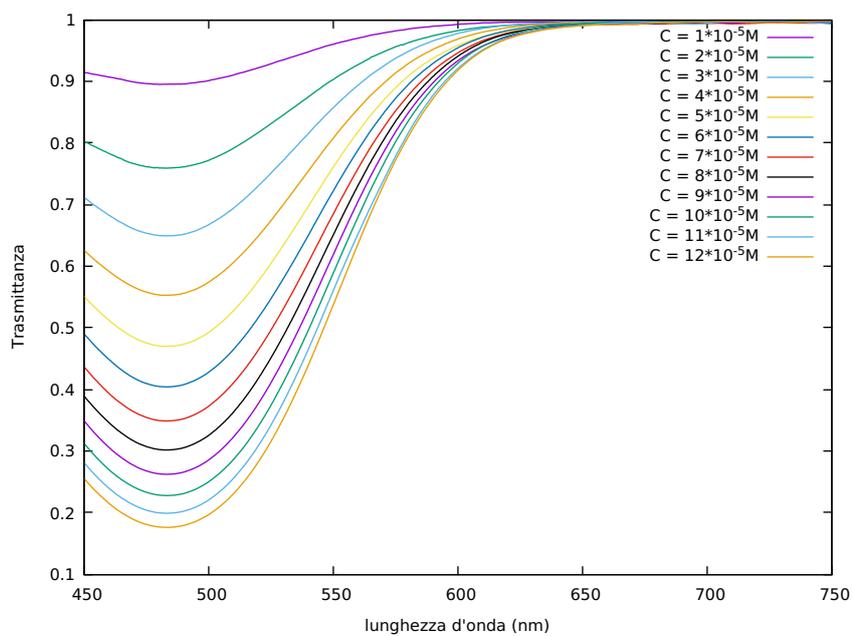


Figura 1.2: Curve della soluzione di HCl al variare della concentrazione di blu di bromotimolo

Tabella 1.1: Trasmittanza a 633nm delle soluzioni di NaOH al variare della concentrazione di blu di bromotimolo

C (M)	T soluzione NaOH
$\approx 1 \cdot 10^{-5}$	$0.7570 \pm 0.0002$
$\approx 2 \cdot 10^{-5}$	$0.5269 \pm 0.0001$
$\approx 3 \cdot 10^{-5}$	$0.3844 \pm 0.0001$
$\approx 4 \cdot 10^{-5}$	$0.28144 \pm 0.00007$
$\approx 5 \cdot 10^{-5}$	$0.21027 \pm 0.00005$
$\approx 6 \cdot 10^{-5}$	$0.15943 \pm 0.00004$
$\approx 7 \cdot 10^{-5}$	$0.12333 \pm 0.00003$
$\approx 8 \cdot 10^{-5}$	$0.09558 \pm 0.00002$
$\approx 9 \cdot 10^{-5}$	$0.07583 \pm 0.00002$
$\approx 10 \cdot 10^{-5}$	$0.06071 \pm 0.00002$
$\approx 11 \cdot 10^{-5}$	$0.05111 \pm 0.00001$
$\approx 12 \cdot 10^{-5}$	$0.04663 \pm 0.00001$

In tabella 1.1 sono mostrati i valori di trasmittanza ottenuti per le soluzioni basiche, ad una lunghezza d'onda di 633 nm, con relativo valore di concentrazione di blu di bromotimolo. La scelta di esporre esclusivamente i risultati ottenuti per le soluzioni basiche è dovuta al fatto che, lavorando ad una lunghezza d'onda nella regione del rosso, le variazioni in termini di trasmittanza per soluzioni di colore blu, dunque basiche, sono molto più apprezzabili rispetto a soluzioni di colore giallo, dunque acide.

Si sono posti in grafico il valore di trasmittanza delle soluzioni basiche in funzione della concentrazione di blu di bromotimolo (figura 1.3).

I punti così ottenuti sono posti in relazione dalla legge di Lambert-Beer:

$$T = e^{-\epsilon_{\lambda} l M} \quad (1.1)$$

dove T è la trasmittanza, M rappresenta la molarità di blu di bromotimolo nelle soluzioni,  $\epsilon_{\lambda}$  è il coefficiente di assorbimento molare (parametro costante per una data sostanza ad una determinata lunghezza d'onda) e  $l$  è lo spessore di soluzione attraversata (pari a 1cm). Tale legge risulta valida esclusivamente per soluzioni a basse concentrazioni, come nel caso qui presentato.

### Stima della concentrazione di blu di bromotimolo

Per stimare i parametri caratteristici della legge di Lambert-Beer, sopra citati, si è proceduto ad eseguire un fit con una funzione esponenziale così definita:

$$f(x) = a e^{-bx}$$

Si è ottenuto un valore per il parametro  $a = 1.03 \pm 0.02$ . Eseguendo una misura di compatibilità tra di esso e l'aspettativa teorica uguale a 1, si è ottenuta una compatibilità ottima. Di conseguenza si è deciso di rieseguire un fit mantenendo pari a 1 il valore del parametro  $a$ . Così facendo si è ottenuto un valore per il parametro  $b = (32063 \pm 409) M^{-1}$ .

In base ai risultati ottenuti dal fit è possibile stimare il valore di trasmittanza all'interno di un chip microfluidico, a seguito dell'attraversamento della medesima soluzione basica sopra analizzata, ottenuto mediante l'utilizzo di un laser a  $\lambda = 633$  nm con un spessore di soluzione attraversata pari a  $L = 200 \mu m$ . La trasmittanza nel chip opto-microfluidico segue, anch'essa, la legge di Lambert-Beer (equazione 1.1), dove il parametro  $\epsilon_{\lambda} l$  atteso, definito nel seguito

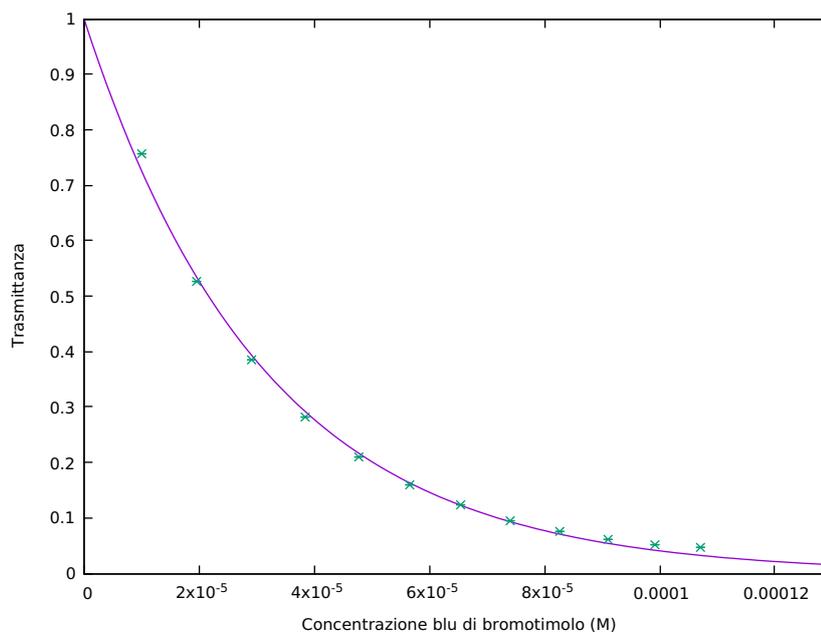


Figura 1.3: Grafico che mostra l'andamento della trasmittanza delle soluzioni di NaOH al variare della concentrazione di blu di bromotimolo

$b^*$ , può essere stimato a partire dal parametro  $b$ , ottenuto dal fit precedente, dallo spessore della soluzione attraversata nel caso microfluidico ( $L=200 \mu m$ ) e nel caso macroscopico precedentemente esposto ( $l = 1cm$ ). La formula utilizzata per stimare il valore del parametro  $b^*$  è stata la seguente:

$$b^* = \frac{bL}{l}$$

Noto  $b^*$ , sono stati calcolati i valori di trasmittanza attesi dall'uso della piattaforma opto-microfluidica, se estrapolati dai risultati ottenuti seguendo un approccio standard, per gli stessi valori di concentrazione di blu di bromotimolo utilizzati nel caso macroscopico ed utilizzando l'equazione 1.1, ponendo  $L = 200\mu m$  e . I risultati ottenuti sono esposti in tabella 1.2.

Avendo verificato che, per una concentrazione di blu di bromotimolo pari a circa  $12 \cdot 10^{-5}M$ , il comportamento dell'indicatore non si modifica; e ritenendo che una trasmittanza per il blu pari a circa 0.94 sia sufficiente ad osservare il viraggio all'interno del chip opto-microfluidico; si è deciso di utilizzare, per effettuare le analisi presentate successivamente, soluzioni con una concentrazione di blu di bromotimolo pari a  $12 \cdot 10^{-5}M$ .

### 1.2.3 Analisi soluzioni a diverso pH

Una volta nota la concentrazione di indicatore necessaria si è proceduto ad eseguire una titolazione mediante lo spettrofotometro.

Si sono preparate una serie di soluzioni diluendo HCl e NaOH in acqua in modo da settare un range di valori di pH compresi tra 2 e 11. Ad ogni soluzione è stato aggiunto blu di bromotimolo in quantità tali da ottenere una concentrazione pari a circa  $12 \cdot 10^{-5}M$ .

In maniera analoga a quanto fatto precedentemente, le misure di trasmittanza sulle soluzioni a diverso pH sono state eseguite eccitando il campione nell'intervallo spettrale compreso tra 400 nm e 700 nm.

In figura 1.4 sono riportate alcune delle curve ottenute con relativo valore di pH. Il viraggio legato al colore dell'indicatore è facilmente distinguibile in quanto le curve, nella zona destra del grafico, passano da un valore di trasmittanza prossimo a 1 (caso di soluzioni acide di colore

Tabella 1.2: Trasmittanza a  $\lambda = 633\text{nm}$  al variare della concentrazione di blu di bromotimolo per una lunghezza di soluzione attraversata pari a circa  $200\mu\text{m}$

C (M)	T soluzione NaOH
$\approx 1 \cdot 10^{-5}$	$0.994 \pm 0.003$
$\approx 2 \cdot 10^{-5}$	$0.988 \pm 0.004$
$\approx 3 \cdot 10^{-5}$	$0.981 \pm 0.005$
$\approx 4 \cdot 10^{-5}$	$0.976 \pm 0.005$
$\approx 5 \cdot 10^{-5}$	$0.970 \pm 0.004$
$\approx 6 \cdot 10^{-5}$	$0.964 \pm 0.004$
$\approx 7 \cdot 10^{-5}$	$0.959 \pm 0.003$
$\approx 8 \cdot 10^{-5}$	$0.954 \pm 0.003$
$\approx 9 \cdot 10^{-5}$	$0.948 \pm 0.002$
$\approx 10 \cdot 10^{-5}$	$0.943 \pm 0.002$
$\approx 11 \cdot 10^{-5}$	$0.938 \pm 0.002$
$\approx 12 \cdot 10^{-5}$	$0.934 \pm 0.001$

Tabella 1.3: Valori di trasmittanza ottenuti a  $\lambda = 633\text{nm}$  per soluzioni a diverso pH

pH	Trasmittanza	pH	Trasmittanza
$2,67 \pm 0,5$	$0,9935 \pm 0,0003$	$7,02 \pm 0,5$	$0,29808 \pm 0,00008$
$2,77 \pm 0,5$	$0,9683 \pm 0,0002$	$7,10 \pm 0,5$	$0,19006 \pm 0,00005$
$3,03 \pm 0,5$	$0,9509 \pm 0,0002$	$6,99 \pm 0,5$	$0,07951 \pm 0,00002$
$3,13 \pm 0,5$	$0,9475 \pm 0,0002$	$7,09 \pm 0,5$	$0,04181 \pm 0,00001$
$3,24 \pm 0,5$	$0,9630 \pm 0,0002$	$7,07 \pm 0,5$	$0,04012 \pm 0,00001$
$3,40 \pm 0,5$	$0,9568 \pm 0,0002$	$7,12 \pm 0,5$	$0,026961 \pm 0,000007$
$3,54 \pm 0,5$	$0,9570 \pm 0,0002$	$7,14 \pm 0,5$	$0,005757 \pm 0,000001$
$3,88 \pm 0,5$	$0,9583 \pm 0,0002$	$7,49 \pm 0,5$	$0,0010522 \pm 0,0000003$
$6,54 \pm 0,5$	$0,8775 \pm 0,0002$	$9,67 \pm 0,5$	$0,0018718 \pm 0,0000005$
$6,77 \pm 0,5$	$0,8581 \pm 0,0002$	$10,28 \pm 0,5$	$0,0013946 \pm 0,0000004$
$7,05 \pm 0,5$	$0,09001 \pm 0,00002$	$10,26 \pm 0,5$	$0,0013976 \pm 0,0000004$
$6,87 \pm 0,5$	$0,4099 \pm 0,0001$	$10,46 \pm 0,5$	$0,0004699 \pm 0,0000001$

giallo) a un valore prossimo a 0 (caso di soluzioni basiche di colore blu) e gli step intermedi sono costituiti da soluzioni con un colore che passa dal verde chiaro, al verde scuro fino ad un verde tendente al blu.

L'analisi sopra esposta ha permesso lo studio del comportamento del sistema alla lunghezza d'onda pari a  $633\text{nm}$ , prossima a quella utilizzata, successivamente, nella piattaforma opto-microfluidica. I valori della trasmittanza ottenuti a  $\lambda = 633\text{nm}$ , in funzione del pH della soluzione analizzata, sono presentati in tabella 1.3.

Il viraggio del pH, cioè l'intervallo in cui avviene il cambio di colore di una soluzione a cui è stato aggiunto un indicatore, viene generalmente stimato mediante titolazione: ovvero un meccanismo per il quale è possibile risalire al pH di una soluzione mediante l'aggiunta progressiva di una soluzione a pH noto. Nel presente lavoro di tesi, si è ipotizzato che tale transizione cromatica, legata al pH della soluzione, possa avvenire in modo continuo e non discreto. Per verificare tale ipotesi le misure di trasmittanza, a  $\lambda = 633\text{nm}$ , ottenute al variare del pH sono state interpolate mediante una funzione di tipo sigmoideo:

$$f(x) = \frac{L}{1 + e^{-k(x-x_0)}}$$

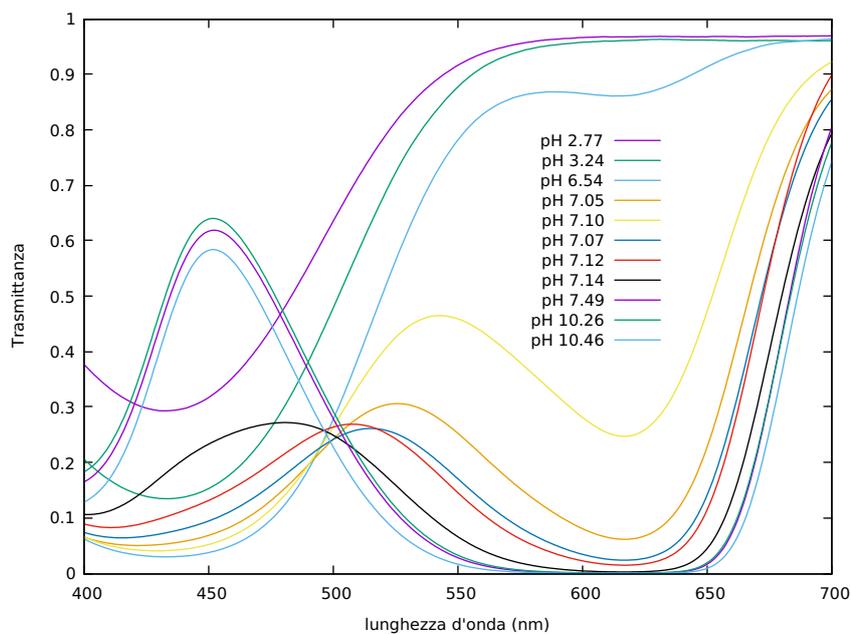


Figura 1.4: Grafico che mostra l'andamento della trasmittanza al variare del pH della soluzione analizzata

dove i parametri  $L$ ,  $k$  e  $x_0$  sono stati ottenuti dal fit e sono presentati in tabella 1.4, mentre i dati su cui si è eseguito il fit con relativa funzione sigmoidea, che simula il loro andamento, sono presentati in figura 1.5.

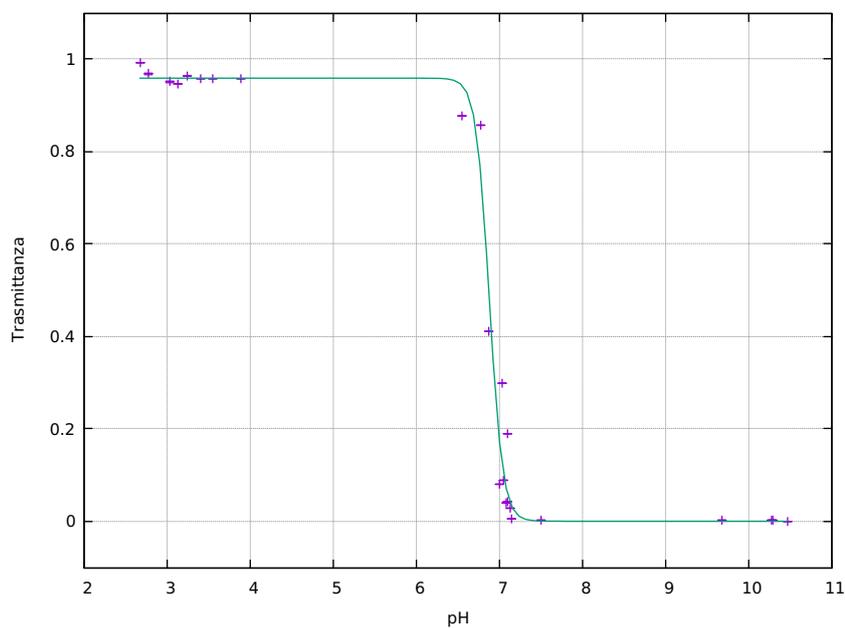


Figura 1.5: dati relativi alla trasmittanza in funzione del pH delle soluzioni, con funzione sigmoidea d'interpolazione

Tabella 1.4: Parametri ottenuti dal fit dei dati esposti in figura 1.5 mediante funzione sigmoidea

$L$	$k$	$x_0$	$\chi^2_{ridotto}$
$0.96 \pm 0.02$	$-13 \pm 2$	$6.8 \pm 0.02$	$0.004$

## Capitolo 2

# Piattaforma opto-microfluidica in Niobato di Litio: caratteristiche principali e procedimento di misura

In questo capitolo vengono presentati il Niobato di Litio e le sue proprietà che lo rendono ideale per la realizzazione di chip opto-microfluidici, come quello alla base di questo lavoro di tesi. Inoltre, sempre in questo capitolo, viene presentato lo strumento realizzato ed utilizzato per miscelare le due soluzioni a pH differenti, una basica e l'altra acida, che ha permesso di introdurre soluzioni a diverso pH all'interno del chip, in modo da poter osservare il viraggio di pH in modo continuo. In particolare, sono presentate le analisi effettuate per verificare il corretto funzionamento dello strumento per il mescolamento delle soluzioni.

### 2.1 Il Niobato di Litio

Il Niobato di Litio ( $\text{LiNbO}_3$ ) è un materiale sintetico, solido, trasparente e insolubile in acqua e in solventi organici. Manifesta un comportamento ferroelettrico a temperature inferiori di quella di Curie ( $T_C \approx 1210^\circ\text{C}$ ), mentre a temperature superiori ha un comportamento paraelettrico. Le sue numerosissime proprietà, tra cui quelle ottiche, elastiche, fotoelastiche, piezoelettriche e fotorifrattive, lo rendono un ottimo materiale per le applicazioni microfluidiche.

In questo lavoro di tesi, il Niobato di Litio è stato il materiale utilizzato per il chip opto-microfluidico costituente l'elemento fondamentale dell'apparato strumentale.

Di seguito sono presentate in maniera sintetica le caratteristiche della struttura cristallina del Niobato di Litio e le sue proprietà. Inoltre, è illustrata la configurazione del chip opto-microfluidico. [3]

#### 2.1.1 La struttura cristallina

La struttura cristallina del niobato di litio, nella fase ferroelettrica, appartiene al gruppo romboedrico spaziale  $R3c$  e al gruppo puntuale  $3m$ . Questo perché presenta una triplice simmetria di rotazione rispetto all'asse cristallografico  $c$  e una simmetria di riflessione speculare rispetto a tre piani formanti tra loro angoli di  $60^\circ$  e passanti per l'asse  $c$ . La cella unitaria può essere descritta in due forme differenti: mediante una cella esagonale o una romboidale. Tuttavia, per descrivere le sue proprietà viene utilizzato un sistema di tipo cartesiano in cui l'asse  $z$  è scelto per essere parallelo all'asse cristallografico  $c$ , l'asse  $x$  è scelto in modo tale da coincidere con l'asse  $a_H$ , mentre l'asse  $y$  è scelto seguendo la regola della mano destra. Questa

configurazione comporta che l'asse  $y$  sia parallelo ad uno dei piani relativi alla simmetria di riflessione speculare. [3] [4]

### 2.1.2 Proprietà

Il niobato di litio presenta numerose proprietà. Esso è un materiale piroelettrico e piezoelettrico, cioè mostra uno spostamento di cariche elettriche se sottoposto a un gradiente di temperatura e di pressione, rispettivamente. Presenta proprietà di tipo elettro-ottiche lineari in quanto il suo indice di rifrazione si modifica in relazione ad un campo elettrico ad esso applicato. Il niobato di litio è dotato di elevate proprietà elettroottiche e ottiche lineari, si presenta come anisotropo, uniassico e trasparente nell'intervallo spettrale compreso tra  $0.35\mu m$  e  $5\mu m$ . Il materiale in questione presenta birifrangenza negativa, infatti è dotato di due indici di rifrazione il cui valore dipende dalla temperatura e dalla presenza di droganti. Infine, il niobato presenta effetto fotorifrattivo, che consiste in una variazione dell'indice di rifrazione del materiale se sottoposto ad un'illuminazione non omogenea con luce visibile, ed è fortemente resistente ad all'azione di reagenti chimici. Quest'ultima proprietà lo rende un candidato perfetto per la realizzazione di un chip opto-microfluidico con scopo lo studio del viraggio di pH di soluzioni, cioè l'obiettivo di questo lavoro di tesi. [3] [4]

### 2.1.3 Piattaforma opto-microfluidica

La piattaforma opto-microfluidica utilizzata per effettuare le analisi, in questo lavoro di tesi, è interamente realizzata in Niobato di Litio. Il chip, di dimensioni  $23 \times 18 mm$ , si basa sul principio di realizzare nello stesso substrato sia il circuito microfluidico che quello ottico integrato. Il primo consiste in un canale realizzato scavando direttamente sul materiale con il quale è realizzato il chip, in questo caso il Niobato di Litio, e permette la transizione del fluido da analizzare. Il secondo è costituito da guide di luce realizzate sul substrato mediante modifica locale dell'indice di rifrazione. In particolare, le guide di luce vengono realizzate drogando localmente il substrato con titanio mediante un processo di diffusione termica all'interno del materiale. Esse sono posizionate perpendicolarmente al canale in cui scorre il fluido e separate da questo in due segmenti di uguale lunghezza. La presenza di tali guide di luce è fondamentale per le nostre analisi, in quanto permettono di illuminare il fluido che scorre nel circuito microfluidico e di raccogliere la luce trasmessa attraverso la soluzione e determinare il rapporto tra intensità trasmessa e incidente il fluido, in modo da conoscere la trasmittanza. Il valore di trasmittanza ci permette di determinare il colore dell'indicatore sciolto nella soluzione e, conseguentemente, il pH di quest'ultima. [2]

## 2.2 Sistema di iniezione delle soluzioni

Per perlustrare il più dettagliatamente possibile un range di pH, il fluido immesso nel circuito microfluidico (precedentemente trattato) è costituito da due soluzioni, una fortemente basica e l'altra fortemente acida, mescolate in percentuali differenti. Pertanto, risulta fondamentale la realizzazione di uno strumento in grado di mescolare le due soluzioni e di fornire una soluzione in uscita da introdurre nel circuito microfluidico. In questa sezione viene presentato l'apparato sperimentale realizzato e le analisi svolte su di esso.

### 2.2.1 Configurazione dello strumento

L'apparato sperimentale consiste di un volume con due canali microfluidici d'ingresso ed uno di uscita. Questo volume verrà definito di mescolamento in quanto il suo scopo è quello di

mescolare i due flussi d'ingresso e fornire un flusso d'uscita. I canali d'ingresso sono collegati ciascuno ad una siringa in vetro. Le due siringhe, riempite ciascuna con un fluido, sono posizionate su un apposita pompa a siringa<sup>1</sup> in grado di azionarle in contemporanea e di regolare il flusso d'ingresso nei due canali. Infine il canale d'uscita viene collegato ad un flussimetro<sup>2</sup>. In questa parte il flusso utilizzato è stato per entrambe le siringhe l'acqua (H<sub>2</sub>O).

## 2.2.2 Acquisizione e analisi dati

Nel presente lavoro di tesi è stato necessario qualificare la performance di ogni elemento costitutivo dell'apparato sperimentale finale che include sia la piattaforma opto-microfluidica che il sistema d'iniezione delle soluzioni. La prima parte dell'analisi consisteva nel verificare se l'utilizzo di siringhe a diverso diametro comportasse risultati differenti nel valore del flusso d'uscita. A tale scopo, si sono presi sei set di misure impostando diversi flussi d'ingresso, pari a: 5, 10, 20, 30, 50 e 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , e ciascun set è stato ripetuto due volte: una volta utilizzando una coppia di siringhe con diametro pari a 14.567mm, l'altra con una coppia di siringhe di diametro pari a 10.301mm. Per ogni set di misura è stato misurato il flusso d'uscita acquisendo dati per 60 secondi ad una frequenza di acquisizione pari a 20Hz. Disponendo in grafico i risultati, in un grafico del flusso uscente (espresso in  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) in funzione del tempo, si distinguono alcune caratteristiche comuni: i dati risultano essere abbastanza dispersi e caratterizzati da due tipi di oscillazioni: una ad alta frequenza che costituisce il rumore di fondo dovuto al funzionamento del flussimetro, la seconda a bassa frequenza e che possiamo identificare come una modulazione dovuta al principio meccanico che regola i flussi in ingresso. Quest'ultima ipotesi è stata rafforzata dal fatto che diminuendo il flusso d'ingresso il periodo associato all'oscillazione ( $T_M$ ) aumenta, arrivando a rendere la modulazione non osservabile ad un flusso d'ingresso pari a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ . Inoltre, a parità di flusso d'ingresso, il periodo  $T_M$  diminuisce passando dalle siringhe a diametro maggiore a quelle a diametro minore. Tutte queste evidenze sono in accordo con il fatto che la modulazione è posta in relazione con la velocità di movimento del pistone che regola i flussi in entrata nel volume di mescolamento. In figura 2.1 sono mostrate le due oscillazioni sopra esposte con i periodi ad esse associati ( $T_M$  è legato alla modulazione,  $T_R$  al rumore).

Per cercare di ridurre l'errore legato all'oscillazione di modulazione, da ogni set di dati si sono estrapolati sottogruppi di misure acquisite in un intervallo di tempo di valore pari ad un multiplo intero del periodo  $T_M$  relativo al set specifico. Di ogni sottogruppo si è stimata la media dei valori e l'errore ad essa associato è stato ottenuto come deviazione standard. In tabella 2.1 sono riportati i risultati relativi al flusso in uscita in funzione del flusso in entrata e del diametro della coppia di siringhe utilizzato.

Risulta interessante notare che non vi è una differenza apprezzabile tra i risultati associati al diametro della coppia di siringhe pari a 14.567mm, rispetto a quello pari a 10.301mm. Dunque, dato che la scelta del diametro della siringa non influenza il risultato, è stato scelto di utilizzare in tutte le successive misure la siringa a diametro maggiore. Questa scelta è stata dettata dal fatto che il volume maggiore della siringa permette di contenere una maggiore quantità di fluido e, di conseguenza, di eseguire un maggior numero di analisi senza dover riempire nuovamente la siringa rischiando, a seguito di tale procedura, di inserire bolle d'aria nel circuito.

Contemporaneamente alla verifica di interscambiabilità tra le siringhe, si è controllato che il flusso d'uscita fosse dato dalla somma dei due flussi in entrata. Avendo impostato due flussi

---

<sup>1</sup>PHD 2000 (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA), accuracy 0.2%

<sup>2</sup>OB1 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: 3.3mL/min, accuratezza: 0.2%, ripetibilità: 0.05%, tempo risposta: 35ms.

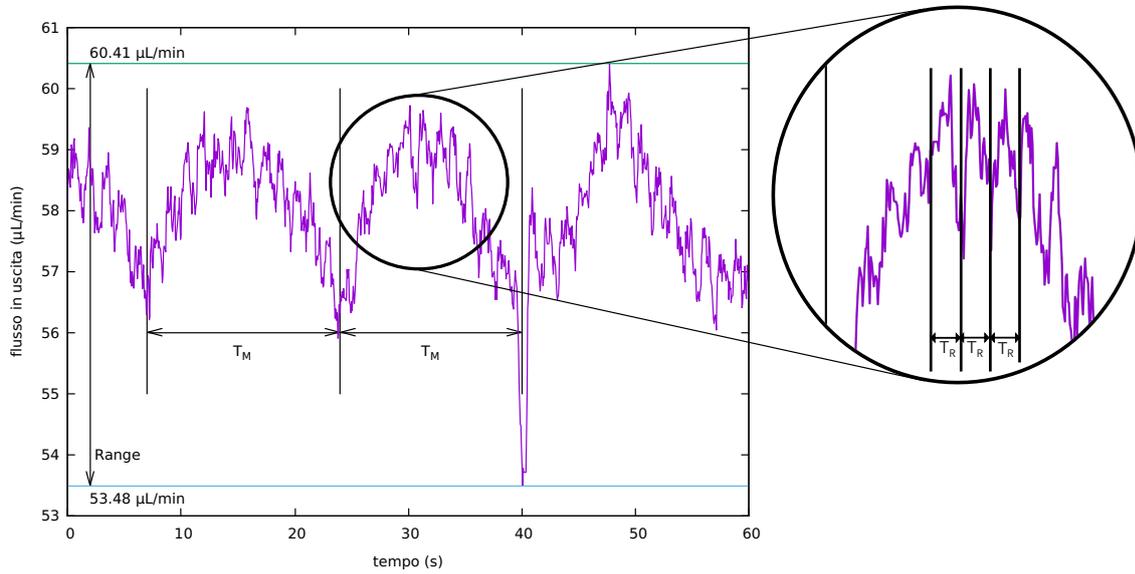


Figura 2.1: Grafico esplicativo riguardo le due oscillazioni: di modulazione e di rumore.

Tabella 2.1: Flusso in uscita

flusso ingresso	siringa grande	siringa piccola
$Q_{in} = 5\mu L/min$	$9.8 \pm 0.3$	$9.5 \pm 0.3$
$Q_{in} = 10\mu L/min$	$19.2 \pm 0.4$	$19.3 \pm 0.6$
$Q_{in} = 20\mu L/min$	$38.8 \pm 0.7$	$39.1 \pm 0.7$
$Q_{in} = 30\mu L/min$	$58.2 \pm 0.8$	$59.2 \pm 0.6$
$Q_{in} = 50\mu L/min$	$98 \pm 1$	$99 \pm 1$
$Q_{in} = 100\mu L/min$	$196 \pm 1$	$198.3 \pm 0.9$

Tabella 2.2: Somma dei flussi in entrata

flusso ingresso	siringa grande	$\lambda$ con $Q_{out}$	siringa piccola	$\lambda$ con $Q_{out}$
$Q_{in} = 5\mu L/min$	$8.6 \pm 0.4$	pessima	$9.1 \pm 0.4$	ottima
$Q_{in} = 10\mu L/min$	$18.8 \pm 0.6$	ottima	$18.6 \pm 0.6$	ottima
$Q_{in} = 20\mu L/min$	$38.8 \pm 0.7$	ottima	$39.2 \pm 0.8$	ottima
$Q_{in} = 30\mu L/min$	$58.6 \pm 1$	ottima	$59 \pm 1$	ottima
$Q_{in} = 50\mu L/min$	$98 \pm 2$	ottima	$100 \pm 1$	ottima
$Q_{in} = 100\mu L/min$	$196 \pm 2$	ottima	$200 \pm 2$	ottima

Tabella 2.3: Confronto tra diversi flussi

	siringa grande			siringa piccola		
$Q_{in}$ ( $\mu L/min$ )	5	30	100	5	30	100
$Q_{out}$ ( $\mu L/min$ )	9.8	58.2	196	9.5	59.2	198.3
$\sigma_{Q_{out}}$ ( $\mu L/min$ )	0.3	0.8	1	0.3	0.6	0.9
Range%	21%	12%	3%	21%	5%	3%
$T_M$ (s)	> 60	$\approx 16$	$\approx 5$	>60	$\approx 9$	$\approx 2.5$

d'ingresso uguali tra loro, ci si aspettava che il flusso in uscita fosse pari al doppio. I risultati esposti in tabella 2.1 mostrano già un buon accordo con l'aspettativa teorica, tuttavia si è deciso di raffinare l'analisi misurando uno dei due flussi d'ingresso con il medesimo flussimetro utilizzato per la misura del flusso d'uscita. In questo modo si è potuto stimare l'affinità tra i valori nominali impostati sulla pompa meccanica e gli effettivi valori d'ingresso nel circuito. I dati ottenuti sono stati misurati e analizzati nella stessa maniera vista precedentemente, cioè: i dati sono stati acquisiti per 60 secondi con una frequenza di 20Hz, la stima del flusso è stata ottenuta come media dei dati acquisiti in un intervallo di tempo multiplo intero del  $T_M$  (relativo al set di misure) e l'errore è stato ricavato come deviazione standard dei medesimi dati. I valori ottenuti sono stati moltiplicati per 2 (con errore ottenuto per propagazione) in modo da avere un confronto più diretto con i valori del flusso d'uscita stimati precedentemente. In tabella 2.2 sono presentati i risultati in funzione del diametro della siringa utilizzato e del flusso in ingresso impostato (inteso come relativo ad un'unica entrata).

Si nota come l'accordo tra il valore nominale e il valore effettivamente misurato aumenti all'aumentare del flusso. Questo è in pieno accordo con le caratteristiche di funzionamento della pompa meccanica e del flussimetro. Per verificare l'aspettativa teorica si è calcolata la compatibilità tra la somma dei flussi in ingresso esposti in tabella 2.2 e i flussi in uscita in tabella 2.1. I risultati sono presentati in tabella 2.2. Si nota per quasi tutti i set di misura un'ottima compatibilità tra aspettativa teorica e risultato sperimentale. L'unico risultato pessimo ottenuto può essere trascurato in quanto dovuto, probabilmente, a fluttuazioni esterne che hanno influenzato la misura.

Infine, si è confrontato in maniera più dettagliata il comportamento del flusso in uscita nel caso di  $Q_{in}$  pari a 10, 30 e 100  $\mu L/min$ . Nei grafici 2.2, 2.3, 2.4 sono esposti gli andamenti dei dati acquisiti nelle tre situazioni e il range delle misure. I risultati numerici sono esposti in tabella 2.3.

In tabella 2.3 si può notare, come già anticipato in precedenza, il fatto che il valore di  $T_M$  diminuisca all'aumentare del flusso in ingresso; inoltre, tale valore, a parità di flusso, diminuisce passando dalla siringa a diametro maggiore a quella a diametro minore. Sempre in tabella 2.3 sono presentati i valori del range percentuale. Tali valori ci permettono di constatare che, all'aumentare del flusso, le fluttuazioni legate al sistema incidono in maniera poco significativa sui dati. Le fluttuazioni più rilevanti sono dovute a fattori esterni, come si può notare in figura 2.3, che vanno ad incidere significativamente sul range delle misure. Di conseguenza,

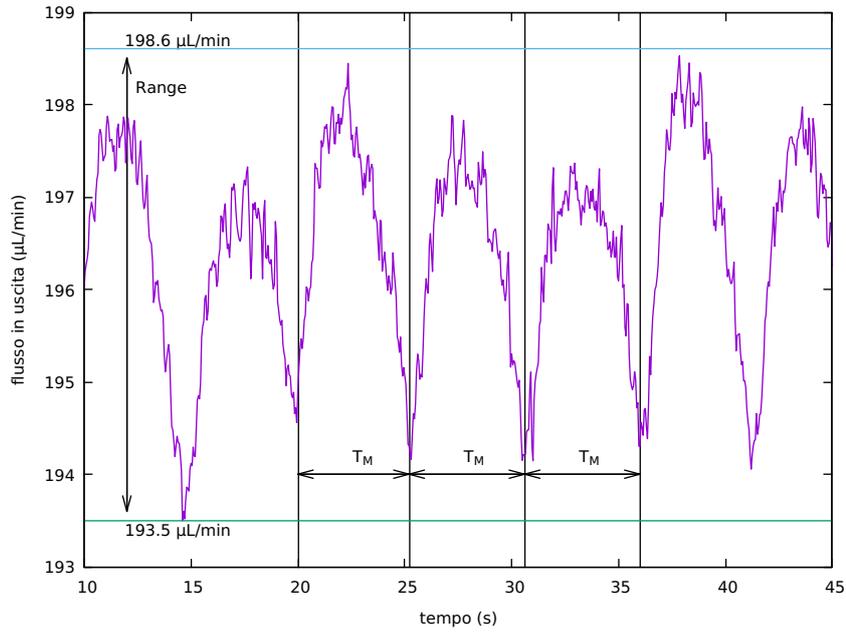


Figura 2.2: Andamento del flusso in uscita con l'utilizzo delle siringhe a diametro maggiore impostando i due flussi d'ingresso a  $100\mu L/min$

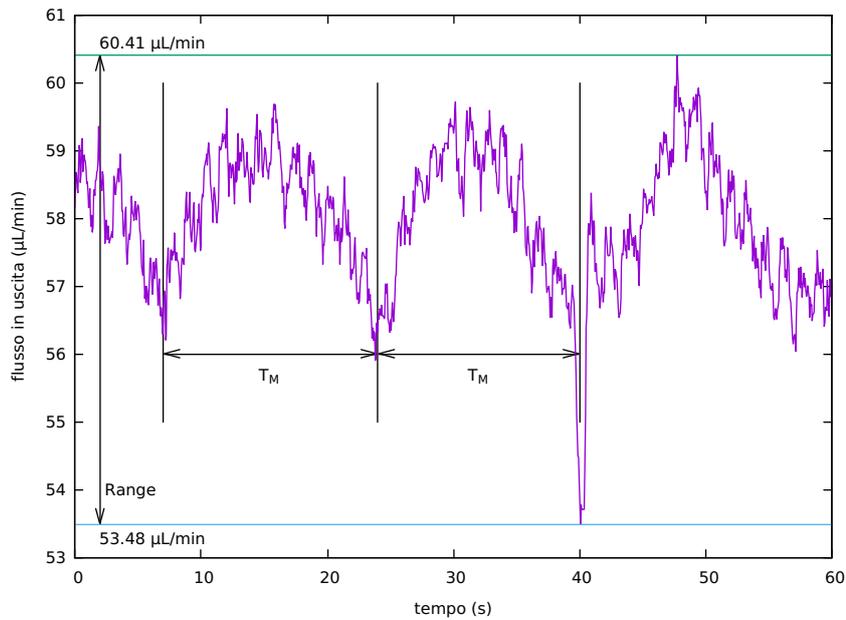


Figura 2.3: Andamento del flusso in uscita con l'utilizzo delle siringhe a diametro maggiore impostando i due flussi d'ingresso a  $30\mu L/min$

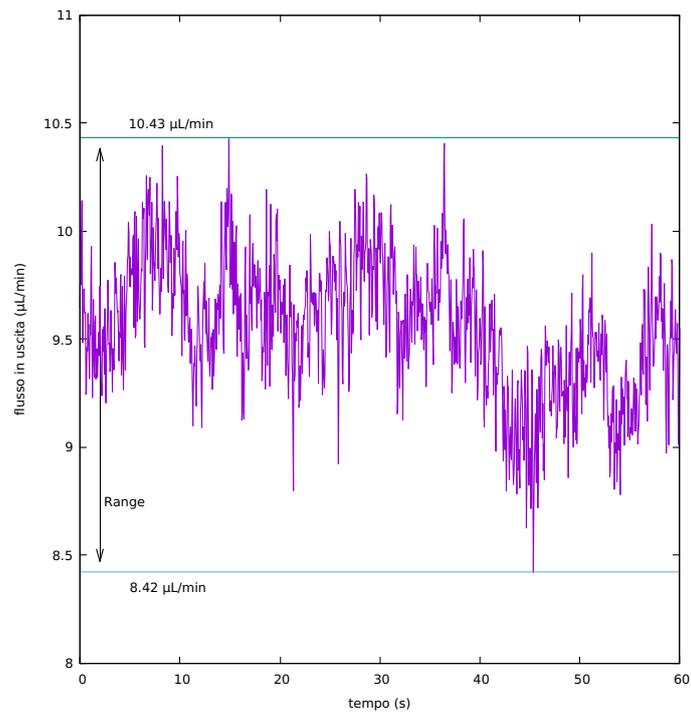


Figura 2.4: Andamento del flusso in uscita con l'utilizzo delle siringhe a diametro maggiore impostando i due flussi d'ingresso a  $5 \mu\text{L}/\text{min}$

l'apparato strumentale a nostra disposizione ci permette di ottenere buoni risultati a patto che si riesca a ridurre le fluttuazioni esterne. Questo verrà fatto nel capitolo 3 posizionandosi su un tavolo che presenta un sistema di smorzamento delle vibrazioni.



## Capitolo 3

# Prestazioni della piattaforma opto-microfluidica per l'analisi del pH

In questo capitolo sono presentate le misure effettuate con l'apparato opto-microfluidico per la verifica sperimentale dell'obiettivo di questo lavoro di tesi: visualizzare la curva di viraggio di pH mediante un chip opto-microfluidico a partire da due soluzioni, una acida e una basica, che, mescolate in percentuali differenti, permettono l'introduzione in modo continuo, all'interno del canale presente nel chip, di soluzioni a diverso pH. Questo capitolo contiene la descrizione dell'apparato sperimentale utilizzato, il protocollo di misura seguito per la presa dati e le analisi svolte sui dati raccolti.

### 3.1 Apparato sperimentale

Le misure effettuate con apparato opto-microfluidico si basano sulla tecnica near field che prevede l'accoppiamento ottico di una sorgente laser con la guida d'onda inserita nell'apparato microfluidico e il successivo rilevamento del fascio trasmesso in uscita dalla guida. Gli elementi principali dell'apparato sperimentale utilizzati per realizzare le misure mediante il chip opto-microfluidico in Niobato di Litio sono, nell'ordine in cui sono disposti, i seguenti:

- una sorgente laser di He-Ne alla lunghezza d'onda caratteristica di  $632.8nm$  con una potenza nominale di  $4mW$ ;
- un beam splitter con la funzione di dividere il fascio in due con percentuali relative di 24% e 76%;
- un optical chopper cioè un disco metallico rotante che modula l'intensità del fascio laser con una frequenza impostabile;
- una lente bifocale per la collimazione del fascio;
- una lamina  $\lambda/2$  e un polarizzatore regolabile per selezionare la polarizzazione del fascio luminoso in modo da eccitare entrambi i modi TE e TM della guida d'onda;
- un obiettivo 20x per focalizzare il fascio luminoso sulla superficie del chip in niobato in modo da garantire un accoppiamento in guida a butt-coupling;
- il campione su cui è integrato il circuito opto-microfluidico e il relativo supporto in grado di traslare e ruotare il chip con sensibilità  $1\mu m$  in tutte e tre le dimensioni: x, y, z;
- un microscopio, posizionato orizzontalmente su un supporto mobile nelle tre direzioni, con un obiettivo 20x e due livelli di zoom, accoppiabile con un rivelatore che può essere

un fotodiodo o un CDD. In quest'ultimo caso è possibile, mediante opportune ottiche, un ingrandimento complessivo di  $15.5 \text{ nm}/\text{pixel}$ ;

- un PIN diodo, cioè un fotodiodo con base in silicio, con zona di lavoro in luce visibile, posizionato sull'obiettivo del microscopio per misurare l'intensità luminosa all'uscita dalle guide di luce.

Inoltre, la strumentazione comprende un oscilloscopio analogico; un amplificatore lock-in che permette di amplificare l'ampiezza del segnale isolandolo dal rumore di background; una FAST acquisition Card collegata ad un computer con un apposito software per la registrazione e la visualizzazione del segnale raccolto dal fotodiodo; un sistema di due pompe a siringa su cui sono posizionate due siringhe in vetro di diametro  $14.567\text{mm}$  contenenti le due soluzioni, una basica e una acida, e collegate al volume di mescolamento (presentato in sezione 2.2) collegato a sua volta al chip opto-microfluidico per introdurre la soluzione da analizzare. [2]

## 3.2 Protocollo di misura

Il metodo utilizzato per giungere all'obbiettivo di questo lavoro di tesi consiste in una serie di procedure che verranno di seguito riassunte.

Per prima cosa sono state preparate due soluzioni: una a pH 2.18 diluendo HCl in acqua distillata, la seconda a pH 11.8 diluendo NaOH in acqua distillata. In entrambe le soluzioni è stato sciolto una quantità di blu di bromotimolo tale da ottenere una concentrazione pari a circa  $12 \cdot 10^{-5}\text{M}$  (sulla base delle analisi esposte nel paragrafo 1.2.2).

Ognuna delle due soluzioni è stata utilizzata per riempire due siringhe di diametro  $14.567\text{mm}$  (la scelta del diametro della siringa è stata motivata nel paragrafo 2.2.2) e, quest'ultime, sono state poste ciascuna in una delle due pompe a siringa di cui si disponeva. Le due soluzioni, mescolandosi all'interno del volume di mescolamento, producevano una soluzione risultate dipendente dai flussi impostati per le due pompe, che veniva fatta circolare all'interno del chip microfluidico. Sfruttando le guide di luce accoppiate in modo integrato al circuito microfluidico (vedi paragrafo 2.1.3) è stato possibile analizzare le diverse soluzioni immesse nel circuito: il laser è stato fatto incidere ortogonalmente al canale ed è stato raccolto il segnale a seguito dell'attraversamento da parte del laser del liquido in esame. Il segnale raccolto è una quantità proporzionale alla trasmissione, cioè al rapporto tra intensità trasmessa a seguito dell'attraversamento del liquido e intensità luminosa incidente al liquido.

In questo lavoro di tesi, lo scopo principale era riuscire ad osservare il viraggio di pH in modo continuo, ovvero variare il pH della soluzione entrante nel chip opto-microfluidico e analizzarla con continuità in modo da osservare la curva di titolazione. Per ottenere questo risultato, si è cercato di regolare il pH della soluzione in esame mediante la regolazione dei flussi di due soluzioni di partenza, quella a pH 2.18 e quella a pH 11.8, variandone il rapporto in modo dinamico. Queste due soluzioni, immesse nel sistema con flussi differenti, si mescolano producendo una soluzione che viene condotta nella piattaforma opto-microfluidica in modo da poterne stimare il pH dipendente dal rapporto dei flussi.

Prima di procedere all'acquisizione delle misure di segnale trasmesso si è eseguita una misura di stabilità, cioè si è verificato l'andamento dell'accoppiamento tra la sorgente laser e la guida d'onda integrata al chip opto-microfluidico. La misura di stabilità del laser è stata necessaria per verificare che la modifica dell'accoppiamento non incida in maniera significativa sulle misure presentate successivamente per determinare il pH incognito di una soluzione.

### 3.2.1 Misura di stabilità

La misura di stabilità consiste nel monitoraggio dell'andamento dell'accoppiamento tra la sorgente luminosa e la guida d'onda integrata al chip opto-microfluidico. Per realizzare tale monitoraggio si è inizialmente riempito il canale microfluidico con una soluzione e si è accoppiato il laser con il chip opto-microfluidico. I dati sono stati acquisiti con una frequenza pari a 0.1 Hz e si sono acquisiti dati per un tempo maggiore di 10 ore. I dati grezzi sono rappresentati in figura 3.1.

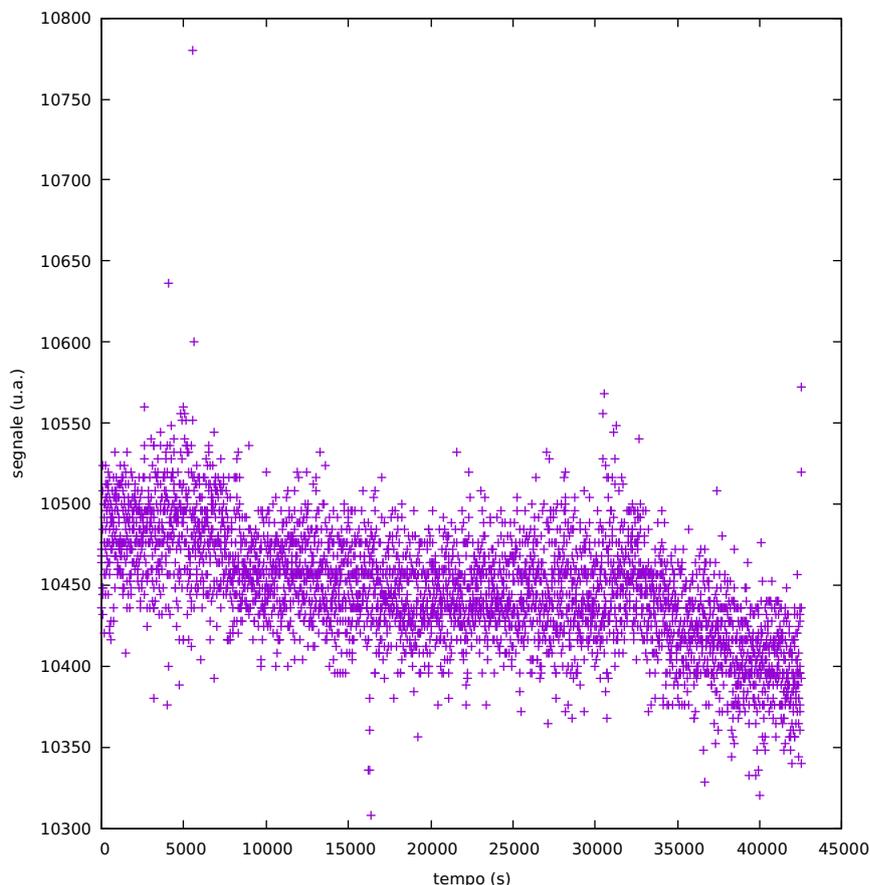


Figura 3.1: Grafico che mostra l'andamento dell'accoppiamento tra la sorgente luminosa e la guida d'onda integrata al chip

Osservando il grafico in figura 3.1 si nota che la maggior parte delle misure si mantiene in un intervallo di segnale compreso tra 10350 e 10550, con una dispersione massima sempre inferiore al 5%. Eseguendo una media su tutti i dati raccolti e associandovi un errore ottenuto mediante deviazione standard si giunge ad un valore di segnale pari a  $10446 \pm 35$ . Da questo risultato si può ricavare l'errore relativo percentuale pari a 0,3% che ci permette di affermare che l'accoppiamento tra il laser e la guida d'onda integrata al chip opto-microfluidico si mantiene quasi costante nel corso delle misure. Affinando l'analisi si possono suddividere i dati in gruppi successivi da 360 misure in modo da raggruppare segnali raccolti in un range temporale di un'ora. La scelta del range temporale è dovuta al fatto che le misure di viraggio di pH eseguite con la piattaforma opto-microfluidica, presentate nella prossima sezione, vengono acquisite in un intervallo temporale minore di un'ora. Tra i gruppi di 360 elementi creati, se ne sono scelti 5 consecutivi in maniera del tutto casuale e si è calcolata la media e l'errore ad essa associato come deviazione standard. In tutti e 5 i gruppi è risultato un errore relativo percentuale pari a 0.09%. Di conseguenza, a maggior ragione, è possibile sostenere che le misure relative al viraggio di pH non sono influenzate in maniera significativa dalla variazione dell'accoppiamento tra il laser e la guida d'onda integrata al chip opto-microfluidico

Tabella 3.1: Flussi impostati per la soluzione di NaOH e per quella di HCl nel primo set di misura

	I set										
$Q_{sol.NaOH}(\mu L/min)$	1	31	36	41	46	51	56	61	66	71	100
$Q_{sol.HCl}(\mu L/min)$	100	70	65	60	55	50	45	40	35	30	1

Tabella 3.2: Flussi impostati per la soluzione di NaOH e per quella di HCl nel secondo set di misura

	II set										
$Q_{sol.NaOH}(\mu L/min)$	100	70	65	60	55	50	45	40	35	30	1
$Q_{sol.HCl}(\mu L/min)$	1	31	36	41	46	51	56	61	66	71	100

### 3.3 Misure per osservare il viraggio di pH

#### 3.3.1 Acquisizione dati

Le misure effettuate con il chip opto-microfluidico per osservare il viraggio di pH sono state ottenute partendo dalle due soluzioni precedentemente preparate, e mescolandole in percentuali continuamente diverse, è stata analizzata la soluzione risultante facendola scorrere all'interno del canale microfluidico e illuminandola con il laser, incanalato nelle apposite guide di luce integrate nel substrato e perpendicolari al canale, del quale si misurava il segnale trasmesso a seguito dell'attraversamento del fluido. I dati sono stati raccolti con una frequenza di acquisizione pari a 1Hz. La soluzione risultante è stata ottenuta modificando i flussi delle soluzioni di HCl e NaOH. Si sono eseguiti due set di misura facendo variare i flussi della soluzione basica e acida seguendo l'ordine esposto nelle tabelle 3.1 e 3.2.

È stato deciso di mantenere costante la somma dei due flussi relativi alle soluzioni di partenza in modo tale che il flusso associato alla soluzione risultante entrante nel chip si mantenesse costante. Invece, la scelta di eseguire due set di misure in cui il valore del rapporto tra i flussi della soluzione di NaOH e quella di HCl viene invertito è legata al fatto che si voleva verificare che il viraggio non dipendesse dall'impostazione dei flussi scelta e dal fatto che si passasse da una soluzione acida ad una basica, piuttosto che da una basica ad una acida.

Per ogni set di misura è stato precedentemente riempito il canale microfluidico con il rapporto di flussi dato dal primo step ( $Q_{sol.NaOH} = 1(\mu L/min)$  e  $Q_{sol.HCl} = 100(\mu L/min)$  nel primo set;  $Q_{sol.NaOH} = 100(\mu L/min)$  e  $Q_{sol.HCl} = 1(\mu L/min)$  nel secondo) e l'acquisizione è stata fatta partire nel momento in cui è stato variato il rapporto di flussi passando dal primo step al secondo. Successivamente gli step sono stati modificati ogni 3 minuti.

La scelta di uno passaggio temporale di 3 minuti tra uno step e l'altro è legata al tempo necessario per il miscelamento dei fluidi. Infatti, nel momento in cui vengono cambiati i flussi delle due soluzioni di partenza è necessario far trascorrere un intervallo temporale prima di poter osservare nell'apparato opto-microfluidico la presenza della soluzione ottenuta con il rapporto dei fluidi scelto. Il tempo necessario (che definiremo nel seguito tempo totale) è dato dalla somma di diversi contributi tra cui: la lunghezza dei canali ottici che la soluzione deve percorrere per giungere al chip, il valore della somma dei flussi delle due soluzioni di partenza direttamente collegato alla velocità di movimento del fluido e il tempo necessario affinché le due soluzioni di partenza si mescolino fino a che non si giunga ad avere un rapporto tra le due soluzioni, in termini di volume, all'interno del volume di mescolamento, dei canali e del chip, pari a quello dei flussi. Il tempo totale può essere ridotto riducendo al minimo la lunghezza dei canali ottici in modo che il tempo necessario per percorrere tale lunghezza diminuisca, aumentando la somma dei flussi delle due soluzioni di partenza in modo da aumentare la velocità di movimento del fluido e riducendo il volume di mescolamento in modo che il tempo per variare

il rapporto dei volumi delle due soluzioni di partenza all'interno di tale volume di mescolamento diminuisca. Malgrado tutti questi accorgimenti il tempo totale risulta comunque un parametro importante da tenere in considerazione. Nel lavoro qui proposto, è stato stimato un tempo totale indicativamente di 2 minuti e mezzo, di conseguenza, per poter analizzare mediante la piattaforma opto-microfluidica una soluzione data da un determinato rapporto di flussi, è necessario far trascorrere un tempo tale per cui la soluzione giunga al chip, dunque un tempo maggiore di 2 minuti e mezzo. Tale prerogativa è garantita dallo step scelto tra l'impostazione di un rapporto di flussi e il successivo pari a 3 minuti.

### 3.3.2 Analisi dati

Lo scopo principale di questa analisi è verificare di poter regolare il pH di una soluzione variando il rapporto dei flussi che la compongono e, conseguentemente, di poter stimare il pH della medesima soluzione mediante un apparato opto-microfluidico eseguendo analisi in trasmittanza sfruttando l'indicatore di colore disciolto nella soluzione in esame. Per verificare che l'andamento del segnale non sia legato alla stabilità dell'accoppiamento in guida si sono eseguiti due set di misure: uno che prevedeva il passaggio da un pH acido fino ad uno basico, l'altro il passaggio da un pH basico ad uno acido. Questo è stato possibile regolando i flussi delle siringhe in cui erano contenute le due soluzioni di partenza, come esposto nel paragrafo precedente. Quello che ci si aspettava era un andamento analogo per i due set di misura (i dati dovrebbero seguire un andamento di tipo sigmoideo, di cui un esempio visto in figura 1.3 nel paragrafo 1.2.3), ma invertito: nel primo caso, in cui si passa da un pH minore ad uno maggiore, il segnale deve passare da un valore maggiore ad uno minore; nel secondo caso, in cui si passa da un pH maggiore ad uno minore, il segnale deve passare da un valore minore ad uno maggiore. Infatti, un pH acido implica, per via dell'indicatore scelto per questo lavoro di tesi, un colore giallo, mentre un pH basico implica un colore blu. Di conseguenza, studiando la trasmittanza per un laser ad una lunghezza d'onda nella zona del rosso, il segnale deve essere maggiore per le soluzioni di colore giallo e minore per quelle di colore blu. Tale aspettativa viene confermata dai dati grezzi raccolti ed esposti in figura 3.2 e 3.3. I grafici mostrano l'andamento del segnale in funzione del tempo. Risulta interessante notare la presenza, in entrambi i grafici, di due plateau: uno per le soluzioni di colore giallo (cioè acide), l'altro per quelle di colore blu (cioè basiche); e una zona di transizione, tra un plateau e l'altro, dovuta alla presenza di soluzioni di colore verde (con pH indicativamente in un intervallo compreso tra 6 e 7.6). Questo primo aspetto visivo è già molto importante perché ci permette di constatare la presenza di un'analogia tra i due set di misura e, conseguentemente, una prima conferma della possibilità di misurare il pH mediante una piattaforma opto-microfluidica.

L'analisi dei dati raccolti si suddivide in due parti. La prima parte consiste in una verifica sistematica dell'analogia tra i due set di misura acquisiti in cui si varia il pH della soluzione risultante da acido a basico e da basico a acido, rispettivamente. La seconda parte consiste nella stima del pH della soluzione risultante a partire dal segnale acquisito.

La verifica sistematica di un'analogia tra i due set di misura è stata eseguita suddividendo entrambi i grafici in tre regioni: una comprendente i dati relativi al plateau ottenuto a seguito del passaggio di una soluzione di colore blu nel chip opto-microfluidico (cioè il plateau a segnale minore), una comprendente i dati relativi al plateau ottenuto a seguito del passaggio di una soluzione di colore giallo nel chip opto-microfluidico (cioè il plateau a segnale maggiore) ed infine una comprendente i dati relativi alla zona di transizione tra un plateau e l'altro ottenuti a seguito del passaggio di una soluzione di colore verde nel chip opto-microfluidico. Si è fatta la media del segnale dei dati appartenenti ai gruppi relativi ai due plateau e l'errore ad essa associato è stato ottenuto come deviazione standard, i risultati ottenuti sono esposti in tabella 3.3.

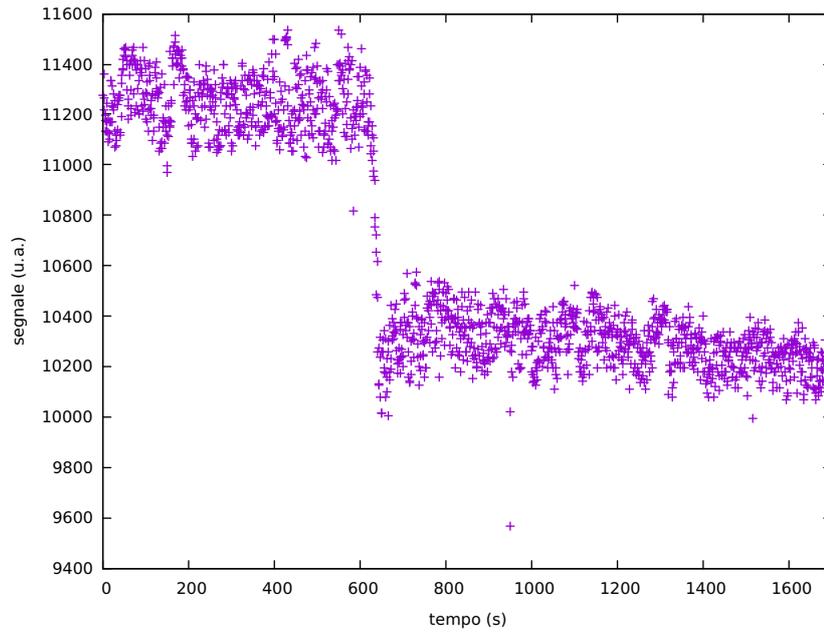


Figura 3.2: Grafico relativo al segnale in funzione del tempo nel primo set di misure

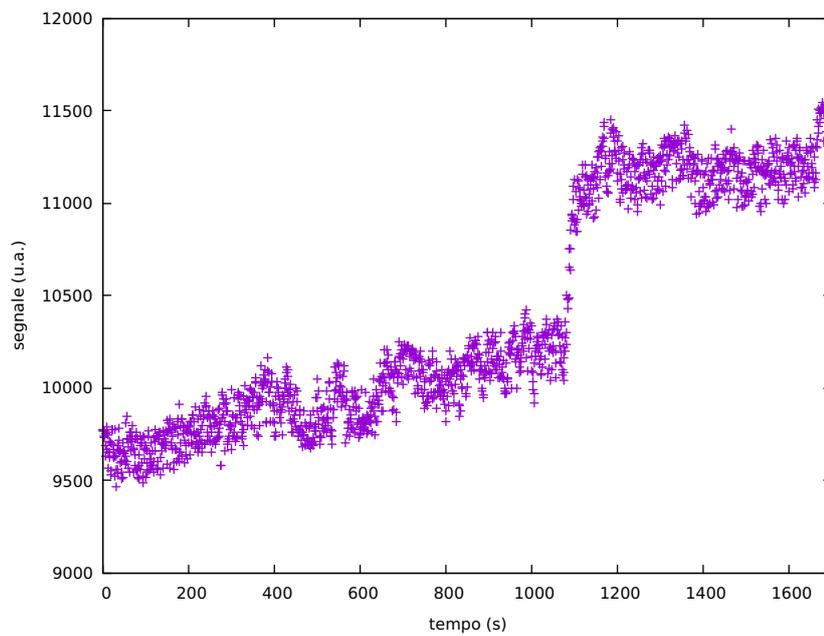


Figura 3.3: Grafico relativo al segnale in funzione del tempo nel secondo set di misure

Tabella 3.3: Medie relative al segnale ottenuto nelle due zone di plateau, una relativa a soluzioni acide di colore giallo e l'altra a soluzioni basiche di colore blu, per entrambi i set di misura.

	I set	II set
media relativa al giallo	$11250 \pm 117$	$11199 \pm 131$
media relativa al blu	$10295 \pm 102$	$9976 \pm 182$

Tabella 3.4: Parametri ottenuti a seguito dell'interpolazione delle tre regioni del grafico: plateau relativo al giallo, zona di transizione e plateau relativo al blu, per il primo set di misura.

	intercetta (u.a.)	coeff. angolare (u.a.)s <sup>-1</sup>	$\chi_{ridotto}^2$
<i>plateaudelgiallo</i>	11275 ±9	-0.08 ±0.03	13535
zona di transizione	44541±5843	-54 ±9	7270
plateau del blu	10418 ±13	-0.11 ±0.01	9410

Il calcolo di queste medie ha permesso di verificare la distinzione tra i due plateau e la riproducibilità delle misure eseguite con un apparato opto-microfluidico per la stima di pH di una soluzione. Infatti, all'interno del medesimo set di misura la stima di compatibilità ottenuta tra le medie relative alle due zone di plateau, pari a 6.2 nel primo set e a 5.5 nel secondo, ci permette di affermare la totale incompatibilità tra i segnali acquisiti per soluzioni acide di colore giallo e quelli acquisiti per soluzioni basiche di colore blu e, conseguentemente, la distinguibilità mediante apparato opto-microfluidico tra soluzioni acide e basiche nelle quali è stato aggiunto l'indicatore blu di bromotimolo. Inoltre, la stima di compatibilità tra le medie ottenute nel caso del plateau relativo alle soluzioni di colore giallo e in quello relativo alle soluzioni di colore blu, che è risultata, rispettivamente, pari a 0.3 e a 1.5, risultata ottima nel primo caso e buona nel secondo, ci permette di associare un intervallo di segnale identificativo a seguito del passaggio, nell'apparato opto-microfluidico, di soluzioni acide e basiche nelle quali è stato aggiunto l'indicatore blu di bromotimolo. In aggiunta, tali risultati di compatibilità ci permettono di identificare la zona di transizione tra un plateau e l'altro, presente in ciascun set di misura e visibile nei grafici 3.2 e 3.3 come una retta verticale formata da una decina di punti, come la zona comprendente i dati acquisiti a seguito del passaggio di una soluzione di colore verde nel chip opto-microfluidico. Un'ulteriore informazione che si può ricavare dai valori medie calcolati risiede nel fatto che la variazione tra la media associata al plateau del giallo e quella associata al plateau del blu, nel medesimo set di misura, è indicativamente dell'8% per il primo set e del 10% per il secondo. Tale risultato è maggiore rispetto a quello preventivato nel paragrafo 1.2.2 pari al 6%. Questa discordanza può essere dovuta a molteplici fattori tra cui, per citarne alcuni: la concentrazione dell'indicatore blu di bromotimolo (per l'obiettivo di questa tesi non era fondamentale una misura il più accurata possibile della concentrazione dell'indicatore), la larghezza effettiva del canale (nei conti è stata posta uguale alla larghezza della lamina utilizzata per incidere il canale microfluidico) e la non perfetta collimazione del raggio laser che comporta la percorrenza di un tratto maggiore rispetto a quello ortogonale alla direzione del fluido.

La stima del pH a partire dal segnale acquisito al passaggio della soluzione risultate nell'apparato opto-microfluidico è stata, inizialmente, ricercata in maniera separata in ciascuna regione del grafico: i due plateau e la zona di transizione. In ciascuna regione è stato supposto un andamento di tipo rettilineo e sono stati interpolati i dati, raggruppati in base alla zona di appartenenza, mediante una retta. Tuttavia, i parametri ottenuti a seguito dell'interpolazione, per i 3 gruppi analizzati, in particolare nelle zone di transizione di ciascun set di misura, sono affetti da un errore molto elevato.. Inoltre, l'elevato valore che assume il  $\chi_{ridotto}^2$ , in tutte e 6 le interpolazioni, suggerisce di non poter assumere che i dati si distribuiscano in modo lineare in quanto tale valore, che dovrebbe essere pari a 1, si discosta di molto dall'aspettativa teorica (vedi tabella 3.4 e 3.5).

L'assenza di un andamento lineare nei tre gruppi di dati ha portato a focalizzare la concentrazione nella sola zona di transizione nella quale si assume che il segnale ricavato sia associato ad una soluzione di colore verde. Tale scelta è dovuta al fatto che, mentre nelle due zone di plateau l'intervallo in termini di pH è molto elevato, nella zona di transizione il pH della soluzione analizzata è ristretto ad un intervallo compreso indicativamente tra 6 e 7.6. Per stimare il valore di pH associato alle misure di segnale ottenute, si è eseguito un confronto con i risultati ricavati nel caso macroscopico a seguito delle analisi spettrofotometriche presentate

Tabella 3.5: Parametri ottenuti a seguito dell'interpolazione delle tre regioni del grafico: plateau relativo al blu, zona di transizione e plateau relativo al giallo, per il secondo set di misura.

	intercetta (u.a.)	coeff. angolare (u.a.)s <sup>-1</sup>	$\chi_{ridotto}^2$
<i>plateau del blu</i>	10794 ±36	0.26 ±0.02	14294
zona di transizione	-39663 ±8892	42 ±7	4916
plateau del giallo	9505 ±7	0.64 ±0.01	15072

nel paragrafo 1.2.3. Il confronto effettuato tra i dati ottenuti nel caso opto-microfluidico e quelli ottenuti nel caso macroscopico ha richiesto una serie di procedimenti preliminari di seguito illustrati. Innanzitutto, si è operata una stima dei valori di trasmittanza attesi nel caso opto-microfluidico a partire dai dati ottenuti nel caso macroscopico mediante l'uso di uno spettrofotometro. La stima dei valori attesi è stata ottenuta utilizzando la legge di Lambert-Beer (equazione 1.1 presentata nel paragrafo 1.2.2) che stima il valore di trasmissione per una data soluzione ad una determinata concentrazione di indicatore di colore in funzione della lunghezza di soluzione attraversata da parte del segnale luminoso. Di conseguenza, per ciascun valore di trasmissione di tabella 1.3 è stata prima di tutto stimato il parametro moltiplicativo della lunghezza di fluido attraversata posta nota la trasmissione (si ricorda che la lunghezza di fluido attraversata nel caso macroscopico è uguale a 1cm) successivamente, noto il parametro moltiplicativo, si è calcolata la trasmissione nel caso opto-microfluidico ponendo la lunghezza di fluido attraversata pari a 200  $\mu\text{m}$ . I valori di trasmissione attesi nel caso opto-microfluidico, così ottenuti, sono stati poi normalizzati in modo tale da avere un segnale che variasse tra 0 e 1: il valore minimo ottenuto è stato posto uguale a 0, il valore massimo uguale a 1 e tutti gli altri riscalati di conseguenza.

Per quanto riguarda i segnali raccolti nei due set di misura opto-microfluidici relativi alla zona di trasmissione, si è eseguita una normalizzazione in modo da avere, anche per questi dati, un segnale che variasse tra 0 e 1. In entrambi i set è stato posto come valore 0 la rispettiva media ottenuta dai dati relativi al plateau associato ad una soluzione di colore blu, mentre la rispettiva media ottenuta dai dati relativi al plateau associato ad una soluzione di colore giallo è stata posta uguale a 1. I segnali relativi ai dati della zona di transizione di entrambi i set di misura sono stati riscalati di conseguenza. La normalizzazione dei segnali ottenuti con le misure opto-microfluidiche e dei valori di trasmissione attesi a partire dai risultati macroscopici è un passaggio cruciale in quanto permette di confrontare i risultati ottenuti con metodologia standard utilizzando lo spettrofotometro, valori in trasmissione, con quelli ottenuti mediante il sistema opto-microfluidico, valori proporzionali alla trasmissione.

A questo punto, appurato di non poter considerare lineare l'andamento dei dati, si è deciso di operare nel seguente modo: per ogni valore di segnale normalizzato, relativo alle misure prese mediante l'utilizzo della piattaforma opto-microfluidica, si sono cercati i valori più vicini, tra i segnali normalizzati ricavati a partire dalle misure spettrofotometriche, tra cui esso fosse compreso. Tale coppia di valori costituisce non solo un intervallo di segnale, ma anche uno di pH in quanto a ciascun valore ricavato con metodologia standard è associato un valore di pH. L'intervallo, in termini di pH, tra cui cade il segnale normalizzato relativo alle misure prese con apparato opto-microfluidico viene assunto essere l'intervallo di pH che possiamo associare alla soluzione esaminata. In particolare, il pH che associamo a ciascun segnale è il valore medio degli estremi dell'intervallo, mentre l'errore è il valore maggiore tra quello ottenuto mediante semi-dispersione massima e quello ottenuto per propagazione degli errori associati ai due valori di pH estremanti (che si ricorda essere uguali a 0.05). I risultati ottenuti per entrambi i set di misura sono presentati in tabella 3.6 e 3.7.

Risulta interessante notare come, in entrambi i set di misura, il valore di pH stimato nella zona di transizione varia in un intervallo compreso tra 7.04 e 7.13, dunque la zona di transizione individua una regione abbastanza ristretta dello spettro di pH. Inoltre la conferma del fatto che la soluzione viri con continuità è data dai valori di pH i quali presentano un andamento

Tabella 3.6: Valori di pH associati ai segnali ricavati nel primo set di misura

	Segnale (u.a.)	pH associato
1	10976	7,04 $\pm$ 0,05
2	10956	7,04 $\pm$ 0,05
3	10936	7,04 $\pm$ 0,05
4	10792	7,13 $\pm$ 0,04
5	10752	7,13 $\pm$ 0,04
6	10656	7,3 $\pm$ 0,2
7	10484	7,3 $\pm$ 0,2
8	10724	7,13 $\pm$ 0,04
9	10616	7,3 $\pm$ 0,2
10	10476	7,3 $\pm$ 0,2

Tabella 3.7: Valori di pH associati ai segnali ricavati nel secondo set di misura

	Segnale (u.a.)	pH associato
1	10504	7,13 $\pm$ 0,04
2	10432	7,13 $\pm$ 0,04
3	10476	7,13 $\pm$ 0,04
4	10476	7,13 $\pm$ 0,04
5	10488	7,13 $\pm$ 0,04
6	10652	7,10 $\pm$ 0,04
7	10752	7,04 $\pm$ 0,05
8	10636	7,10 $\pm$ 0,04
9	10752	7,04 $\pm$ 0,05
10	10856	7,08 $\pm$ 0,04

complessivamente crescente nel primo set di misura e decrescente nel secondo (nelle tabelle 3.6 e 3.7 l'ordine temporale è dato dai numeri della prima colonna dove 1 indica la misura acquisita per prima e 10 quella acquisita per ultima). L'andamento crescente e decrescente è dettato dal passaggio da soluzione acida a basica o il viceversa: nel primo caso, lavorando con un laser nella regione del rosso, il segnale diminuirà passando da una soluzione acida, di colore giallo, ad una basica, di colore blu, e il pH aumenterà; nel secondo caso il segnale aumenterà passando da una soluzione basica ad una acida, mentre il pH diminuirà.

In conclusione, la procedura fin qui presentata permette di associare un valore di pH ad ogni soluzione, il cui pH appartiene all'intervallo di viraggio del blu di bromotimolo, mediante un apparato opto-microfluidico utilizzando un laser ad una lunghezza d'onda pari a  $632.8nm$ . Infatti, l'utilizzo dell'indicatore di colore blu di bromotimolo combinato alla piattaforma opto-microfluidica permette di identificare con una buona precisione soluzioni a diverso pH nella zona di viraggio e di distinguere soluzioni basiche da soluzioni acide. Sfruttando laser a diversa lunghezza d'onda e combinando l'utilizzo d'indicatori di colore con punto viraggio a pH differenti da quello del blu di bromotimolo, sarà possibile indagare in maniera sempre più dettagliata, mediante una piattaforma opto-microfluidica, tutto lo spettro di pH e, di conseguenza, di stabilire il pH incognito di una soluzione.

# Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi consisteva nello studio della dinamica del viraggio di pH chimico mediante una piattaforma opto-microfluidica realizzata in Niobato di Litio. In particolare, si è cercato di visualizzare la curva di viraggio relativa a soluzioni chimiche nelle quali era stato aggiunto l'indicatore di colore blu di bromotimolo e, da tale curva, risalire al pH incognito di una soluzione a seguito di analisi di trasmittanza di un fascio laser incidente il fluido. L'aspetto innovativo di questo lavoro consisteva nell'utilizzo di una piattaforma opto-microfluidica realizzata in Niobato di Litio nella quale sono state combinate sia il circuito microfluidico che quello ottico. Il primo consiste in un canale realizzato scavando direttamente sul materiale caratterizzante il chip e permette la transizione del fluido da analizzare; il secondo è costituito da guide di luce integrate sul substrato e disposte perpendicolarmente al canale che svolgono la funzione di trasmettere la luce all'interno del canale e di raccoglierla, una volta attraversato il fluido in esame, per permettere la fase di analisi.

L'indicatore di colore utilizzato, il blu di bromotimolo, aveva il compito di identificare, mediante colorazioni differenti, soluzioni a diverso pH in modo da poterle distinguere mediante la stima del segnale trasmesso a seguito dell'attraversamento del fluido.

Sono stati eseguiti degli studi preliminari volti alla determinazione della concentrazione ottimale d'indicatore da aggiungere alle soluzioni in modo da poter percepire una differenza in trasmittanza mediante l'apparato opto-microfluidico. In secondo luogo sono state eseguite delle misure per osservare la curva di viraggio mediante metodologia standard, cioè preparando una serie di soluzioni, alle quali era stato aggiunto blu di bromotimolo e il cui pH era stato misurato utilizzando un pH-metro ad elettrodo, sulle quali sono stati eseguiti studi di trasmittanza mediante uno spettrofotometro. Queste ultime analisi sono servite per associare a un segnale ottenuto con piattaforma opto-microfluidica un valore di pH relativo alla soluzione analizzata.

In questo lavoro di tesi è stata, inoltre, avanzata la possibilità di osservare in maniera dinamica il viraggio di pH, cioè analizzare in un unico set di misura una soluzione di cui veniva modificato il pH continuamente e di cui veniva studiata la variazione nel tempo del segnale trasmesso a seguito dell'attraversamento, da parte di un laser, del fluido. Per ottenere tale risultato si è lavorato con due soluzioni di partenza, una acida e una basica, che venivano introdotte nel sistema di misura e mescolate in percentuali via via differenti variando i flussi d'ingresso. Al fine di ottenere tale risultato è stato necessario realizzare un strumento che permettesse il mescolamento di tali soluzioni. Esso consiste in un volume caratterizzato da due ingressi per le soluzioni da mescolare e un'uscita per la soluzione mescolata.

Prima di procedere con le misure in flusso continuo mediante apparato opto-microfluidico, si è verificata la stabilità dell'accoppiamento della sorgente luminosa con la guida d'onda integrata al chip. L'intervallo temporale su cui sono state eseguite queste misure ha avuto una durata di 10 ore e la dispersione massima associata al segnale acquisito è risultata essere sempre minore al 5%, con un errore relativo percentuale associato alla media pari a 0.3%. Tale dispersione si riduceva ulteriormente analizzando dati acquisiti nell'intervallo temporale di un'ora, in cui l'errore relativo percentuale scendeva a 0.09%. Queste misure di stabilità

hanno potuto concludere che i risultati ottenuti studiando il viraggio di pH non sono stati influenzati in maniera significativa dall'accoppiamento tra laser e la guida d'onda.

A questo punto, sono state eseguite le misure mediante piattaforma opto-microfluidica per visualizzare il viraggio di pH. Dalle misure effettuate si è ottenuta una curva di segnale raccolto, a seguito dell'attraversamento, da parte del laser, della soluzione presente nel canale microfluidico, in funzione del tempo. In tale grafico sono state distinte tre zone caratteristiche: due plateau e una zona di transizione tra un plateau e l'altro. La zona di transizione costituisce la zona di viraggio dell'indicatore blu di bromotimolo dovuta al passaggio, nel canale microfluidico, di soluzioni di colore verde. Invece, i due plateau sono relativi al passaggio di soluzioni acide, di colore giallo, (segnale maggiore) e di soluzioni basiche, di colore blu, (segnale minore). Stimando il valore medio delle due zone di plateau si è riscontrata una totale incompatibilità tra i segnali relativi a soluzioni acide e a quelli relativi a soluzioni basiche, con una variazione percentuale di circa il 10%. Inoltre, concentrandosi nella zona di transizione è stato possibile stimare il valore di pH associato ai segnali ottenuti. Questo è stato possibile mediante confronto con la curva di titolazione eseguita in fase preliminare con l'ausilio dello spettrofotometro. A seguito di questo confronto è stato possibile associare ad un dato segnale un valore di pH con un errore medio pari a 1%.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno permesso di confermare la possibilità di realizzare un nuovo sistema di misura di pH in grado di fornire una risposta affidabile sfruttando una piattaforma opto-microfluidica integrata in Niobato di Litio. Rispetto agli attuali sistemi in uso per la stima di pH, i vantaggi di questa strumentazione consistono nell'utilizzo di volumi estremamente ridotti (dell'ordine di pL-nL), una prontezza di risposta (legata alla velocità di acquisizione del segnale luminoso) che si traduce in una totale indipendenza tra due misure consecutive e l'utilizzo di un micro-dispositivo che garantisce una riduzione dei consumi, una riduzione degli spazi e una facilità d'uso e di trasporto. Inoltre, le proprietà del Niobato di Litio lo rendono il materiale ideale per questa innovativa strumentazione e, in particolare, la sua resistenza a reagenti chimici permetterà di realizzare uno strumento in grado di misurare valori di pH di soluzioni estremamente acide o basiche mantenendo le ottime prestazioni ottenute in questo lavoro di tesi.

Le prestazioni del dispositivo opto-microfluidico integrato in Niobato di Litio potranno essere ulteriormente migliorate indagando un maggior vastità di indicatori di colore in modo da incrementare le zone di transizione relative ai punti di viraggio di ciascun indicatore nella scala di pH. Inoltre, la stima del pH potrà essere ottenuta eccitando il campione in esame mediante sorgenti luminose a diversa lunghezza d'onda, rispetto a quella utilizzata in questo lavoro di tesi pari a  $632.8nm$ , in modo tale da osservare distinzioni apprezzabili in tutte le scale cromatiche fornite dagli indicatori. Mediante questa strumentazione, sono già state eseguiti studi per un utilizzo di volumi ulteriormente ridotto rispetto a questo lavoro di tesi (dell'ordine dei pL) sfruttando le potenzialità microfluidiche dello strumento che permettono di inserire nel canale gocce di soluzione da analizzare mediante la componente ottica integrata. Questi ultimi studi sono presentati in [1].

# Bibliografia

- [1] L. Garbellotto, *Integrated opto-microfluidic platform in LiNbO<sub>3</sub> crystals toward a new concept of miniaturized microphotometry*, Tesi di laurea, Dipartimento di Scienze Chimiche, Dipartimento di Fisica, Università degli studi di Padova (2016-2017).
- [2] S. Saoncella, *Applicazione optofluidica di uno spettrofotometro integrato in niobato di litio per misure di pH*, Tesi di laurea, Dipartimento di Fisica, Università degli studi di Padova (2016-2017).
- [3] R.S. Weis and T.K. Gaylord, *Lithium Niobate: Summary of Physical Properties and Crystal Structure*, School of Electrical Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA 30332, USA, Appl. Phys. A 37, 191-203 (1985).
- [4] R. Zamboni, *Caratterizzazione microfluidica di un generatore di gocce a T-junction integrato in niobato di litio*, Tesi di laurea, Dipartimento di Fisica, Università degli studi di Padova (2013-2014).