



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE DII

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Meccanica

**OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO DI STAMPAGGIO A
INIEZIONE DI SUPERFICI MICRO STRUTTURATE PER
LA COLTURA IN VITRO DI CELLULE STAMINALI**

Relatore: Ing. Giovanni Lucchetta

Laureando: Carlo Laconi 1015227

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

INDICE.....	3
INDICE DELLE FIGURE	5
INDICE DELLE TABELLE	9
INDICE DEI GRAFICI.....	11
SOMMARIO	13
INTRODUZIONE	15
CAPITOLO 1 ANALISI DELLO STATO DELL'ARTE	17
1.1. RELAZIONE TRA LA FUNZIONALITÀ CELLULARE E LA MORFOLOGIA DELLA SUPERFICIE	17
<i>Micro - Topografia.....</i>	<i>17</i>
<i>Nano - Topografia.....</i>	<i>19</i>
<i>Elasticità del substrato.....</i>	<i>20</i>
<i>Chimica della superficie.....</i>	<i>21</i>
1.2. REPLICAZIONE DI SUPERFICI MICRO STRUTTURATE CON STAMPAGGIO A INIEZIONE	21
<i>Stampaggio tradizionale vs Micro stampaggio.....</i>	<i>22</i>
<i>Influenza dei parametri geometrici e di processo</i>	<i>24</i>
1.3. FABBRICAZIONE DI FEATURES MICRO E NANO METRICHE	27
<i>Fotolitografia.....</i>	<i>27</i>
<i>Litografia a fascio elettronico (EBL).....</i>	<i>28</i>
<i>Trasferimento del pattern</i>	<i>30</i>
<i>Strati porosi di ossido di allumina anodizzato (AAO).....</i>	<i>31</i>
CAPITOLO 2 MISURAZIONE DELLA TOPOGRAFIA SUPERFICIALE.....	33
2.1. PROFILOMETRIA OTTICA	33
<i>Microscopio confocale</i>	<i>33</i>
<i>Interferometro a luce bianca</i>	<i>36</i>
2.2. PROFILOMETRIA A SONDA.....	38
<i>Microscopio a forza atomica (AFM).....</i>	<i>39</i>
2.3. MICROSCOPIA A SCANSIONE (SEM).....	43
CAPITOLO 3 STAMPO E INSERTI.....	47
3.1. PROGETTAZIONE DEL SUPPORTO DI CRESCITA	47
3.2. PRODUZIONE DEGLI INSERTI.....	50
3.3. LUCIDATURA DEGLI INSERTI	52
3.4. REALIZZAZIONE DEI MICRO FORI	54
<i>Hybrid Sol-Gel resist.....</i>	<i>56</i>

3.5.	OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI.....	57
	<i>Geometria Ø4 - I10</i>	58
	<i>Geometria Ø3 - I9</i>	60
	<i>Geometria Ø2 - I8</i>	61
3.6.	CONSIDERAZIONI.....	62
CAPITOLO 4 MICRO STAMPAGGIO A INIEZIONE.....		63
4.1.	SIMULAZIONE DEL PROCESSO DI INIEZIONE	63
	<i>Molding window analysis</i>	64
	<i>Fill and pack analysis</i>	65
	<i>Cooling Analysis</i>	67
	<i>Warpage Analysis</i>	68
4.2.	PROVE DI STAMPAGGIO	70
CAPITOLO 5 OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI DI PROCESSO.....		73
5.1.	ANALISI DEI PARAMETRI OTTIMALI DI PROCESSO SU GEOMETRIA Ø4 - I10.....	73
	<i>Misurazione dell'altezza dei pillars</i>	75
5.2.	ANALISI DEL PIANO FATTORIALE	77
	<i>Analisi della risposta Altezza pillars</i>	78
	<i>Ricerca della regione di ottimo</i>	79
5.3.	STUDIO DEI PARAMETRI P_{PACK} E $V_{INJECTION}$	82
5.4.	REPLICAZIONE DEI MICRO PILLARS	87
5.5.	STAMPAGGIO GEOMETRIA Ø3 - I9	91
5.6.	STAMPAGGIO GEOMETRIA Ø2 - I8	92
5.7.	STAMPAGGIO PER LA CRESCITA CELLULARE	92
	<i>Insert2_4-10</i>	93
	<i>Insert7_3-9</i>	94
	<i>Insert1_2-8</i>	95
5.8.	MICROSCOPIA A SCANSIONE	96
CAPITOLO 6 COLTURA CELLULARE IN VITRO.....		99
6.1.	MTS - TEST	99
6.2.	MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)	100
6.3.	RISULTATI.....	101
CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....		105
RINGRAZIAMENTI.....		107
BIBLIOGRAFIA		109
DISEGNI TECNICI.....		113

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1 - <i>Superfici microstrutturate</i>	17
Figura 2 - <i>Coltura cellulare su una superficie micro strutturata</i>	19
Figura 3 - <i>Elasticità del substrato</i>	20
Figura 4 - <i>Micro e nano-pillars</i>	21
Figura 5 - <i>Processo di iniezione</i>	22
Figura 6 - <i>Unità di iniezione di una macchina per micro stampaggio</i>	23
Figura 7 - <i>Disposizione dei micro canali negli stampi</i>	25
Figura 8 - <i>La pressione all'interno della cavità aumenta più rapidamente nell'ultima zona riempita</i>	25
Figura 9 - <i>Distorsioni in dirazione del flusso del polimero</i>	26
Figura 10 - <i>Fotolitografia</i>	28
Figura 11 - <i>Electron bean lithography</i>	29
Figura 12 - <i>Due tipi di attacco chimico</i>	30
Figura 13 - <i>Lift off</i>	30
Figura 14 - <i>Effetto dei parametri di anodizzazione</i>	31
Figura 15 - <i>Funzionamento del microscopio confocale</i>	34
Figura 16 - <i>A sinistra una immagine di tipo bright fields, a destra una immagine confocale</i>	34
Figura 17 - <i>Sequenza di immagini confocali</i>	35
Figura 18 - <i>Ricostruzione 3D della superficie</i>	35
Figura 19 - <i>Interferenza costruttiva e distruttiva</i>	36
Figura 20 - <i>Interferenza costruttiva da una sorgente luminosa</i>	36
Figura 21 - <i>Configurazione tipica di un interferometro</i>	38
Figura 22 - <i>Schema di una sonda AFM</i>	39
Figura 23 - <i>Andamento qualitativo del potenziale di Lennard-Jones</i>	39
Figura 24 - <i>Schema per rilevare le flessione della leva con metodo ottico</i>	40
Figura 25 - <i>Relazione tra i modi di flessione della leva (sotto) e gli spostamenti del fascio riflesso sul fotodiodo (sopra)</i>	40
Figura 26 - <i>Disegno schematico di una sonda per AFM</i>	41
Figura 27 - <i>In alto una immagine AFM acquisita con forza costante, in basso acquisita a distanza media costante</i>	42
Figura 28 - <i>Diagramma schematico di oscillazioni in modalità di "semi-contatto"</i>	43
Figura 29 - <i>a) interazione di un fascio di elettroni con un solido e conseguenti emissioni</i>	44
Figura 30 - <i>Schema di un tipico microscopio elettronico a scansione</i>	45
Figura 31 - <i>Rappresentazione schematica dei sensori all'interno di una camera SEM</i>	46
Figura 32 - <i>Piastra per la crescita e il supporto</i>	47
Figura 33 - <i>Polimerizzazione del Polistirene (PS)</i>	48
Figura 34 - <i>Maschera per fotolitografia a contatto</i>	49
Figura 35 - <i>Micro pillars nelle configurazioni 03, 06 e 09 (quote espresse in μm)</i>	49
Figura 36 - <i>Inserti</i>	50

Figura 37 - <i>Assemblaggio dell'inserto</i>	51
Figura 38 - <i>Assemblaggio dello stampo</i>	51
Figura 39 - <i>Definizione di rugosità Ra e Rq</i>	52
Figura 40 - <i>Operazione di lucidatura con inserti inglobati: prima e dopo la lucidatura</i>	53
Figura 41 - <i>Inserto lucidato</i>	53
Figura 42 - <i>Topografia della superficie lappata</i>	54
Figura 43 - <i>Spin coating del resist</i>	55
Figura 44 - <i>Maschera per fotolitografia a contatto</i>	55
Figura 45 - <i>Maschera a contatto col resist e irradiazione UV</i>	55
Figura 46 - <i>Risultato della fotolitografia</i>	56
Figura 47 - <i>Zone di misurazione degli inserti, quote espresse in mm.</i>	57
Figura 48 - <i>A sinistra il microscopio a forza atomica, a destra un immagine ingrandita del tastatore e della superficie</i>	58
Figura 49 - <i>Misurazione AFM, insert3_4-10</i>	59
Figura 50 - <i>Misurazione AFM, insert2_4-10</i>	60
Figura 51 - <i>Misurazione AFM, insert7_3-9</i>	61
Figura 52 - <i>Misurazione AFM, insert1_2-8</i>	61
Figura 53 - <i>Creazione della mesh</i>	63
Figura 54 - <i>Pressione e ritiri volumetrici</i>	67
Figura 55 - <i>Temperature nel circuito di raffreddamento</i>	67
Figura 56 - <i>Cause di deformazione del componente</i>	68
Figura 57 - <i>Wittman Battenfeld Micropower 15</i>	70
Figura 58 - <i>Stampaggio di prova: a sinistra il componente più la materozza, a destra senza materozza</i>	71
Figura 59 - <i>Piano fattoriale composito a facce centrate</i>	74
Figura 60 - <i>A sinistra la misurazione con AFM, a destra la misurazione con microscopio confocale</i>	75
Figura 61 - <i>Microscopio confocale</i>	76
Figura 62 - <i>Zone di misurazione nei pezzi stampati, quote espresse in mm.</i>	76
Figura 63 - <i>Ricerca della regione dell'ottimo con i piani fattoriali</i>	80
Figura 64 - <i>Piano fattoriale 2² con punto centrale</i>	82
Figura 65 - <i>Percentuale di riempimento di microstrutture in HDPE, in funzione della velocità e a diverse temperature dello stampo</i>	87
Figura 66 - <i>Replicazione dei micro pillars</i>	88
Figura 67 - <i>A sinistra la misurazione con AFM, a destra la misurazione con microscopio confocale</i>	91
Figura 68 - <i>A sinistra la misurazione con AFM, a destra la misurazione con microscopio confocale</i>	92
Figura 69 - <i>Misurazione confocale geometria 4-10</i>	93
Figura 70 - <i>Misurazione confocale geometria 3-9</i>	94
Figura 71 - <i>Misurazione confocale geometria 2-8</i>	95
Figura 72 - <i>Preparazione dei provini per il SEM</i>	96
Figura 73 - <i>Microscopio elettronico a scansione</i>	96
Figura 74 - <i>Rilevazioni al SEM dei micro fori, Insert3_4-10</i>	97

Figura 75 - Rilevazione al SEM dei micro pillars.....	97
Figura 76 – Le tre geometrie utilizzate	97
Figura 77 - Funzionamento del test MTS	100
Figura 78 - Microscopia elettronica a scansione di colture di cellule MC3T3E1 sui supporti di controllo e su supporti con micropillar	103

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1 - <i>Geometrie realizzate sulla maschera</i>	48
Tabella 2 - <i>Parametri ottimizzati nella realizzazione degli inserti</i>	57
Tabella 3 - <i>Caratteristiche del tastatore AFM</i>	58
Tabella 4 - <i>Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm, Insert3_4-10</i>	59
Tabella 5 - <i>Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm, Insert2_4-10</i>	60
Tabella 6 - <i>Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm, Insert3_3-9</i>	60
Tabella 7 - <i>Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm, Insert7_3-9</i>	61
Tabella 8 - <i>Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm, Insert1_2-8</i>	62
Tabella 9 - <i>Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm, Insert1_2-8</i>	62
Tabella 10 - <i>Diagnostica della mesh</i>	63
Tabella 11 - <i>Flow front temperature</i>	65
Tabella 12 - <i>Tabella dei risultati</i>	69
Tabella 13 - <i>Principali caratteristiche della Wittman Battenfeld Micropower 15</i>	70
Tabella 14 - <i>Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm, Insert3_4-10 prima di stampare</i>	71
Tabella 15 - <i>Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm, Insert3_4-10 dopo 100 pezzi stampati</i>	71
Tabella 16 - <i>Scelta dei livelli dei fattori</i>	74
Tabella 18 - <i>Confronto tra le misurazioni AFM e Confocali espresse in μm, geometria $\emptyset 4 - 110$</i>	75
Tabella 19 - <i>Inserimento dei valori nel piano fattoriale</i>	77
Tabella 20 - <i>Inserimento dei valori nel piano fattoriale</i>	82
Tabella 21 - <i>Scelta dei livelli dei fattori</i>	85
Tabella 22 - <i>Nuovo piano fattoriale 2^2 con un punto centrale</i>	85
Tabella 23 - <i>Deviazione altezza del pillars per tre livelli di velocità</i>	89
Tabella 24 - <i>Confronto tra le misurazioni AFM e Confocali espresse in μm, geometria $\emptyset 3 - 19$</i>	91
Tabella 25 - <i>Confronto tra le misurazioni AFM e Confocali espresse in μm, geometria $\emptyset 2 - 18$</i>	92

INDICE DEI GRAFICI

Grafico 1 - <i>Misurazione di profondità e interasse, Insert3_4-10</i>	59
Grafico 2 - <i>Profilo di compattazione iniziale</i>	66
Grafico 3 - <i>Profilo di compattazione migliorato</i>	66
Grafico 4 - <i>Grafici dei residui per la risposta altezza dei pillars</i>	78
Grafico 6 - <i>Superfici di risposta per l'altezza dei pillars</i>	79
Grafico 8 - <i>Rette di massima pendenza sovrapposte alle superfici di risposta</i>	81
Grafico 9 - <i>Stime degli effetti</i>	83
Grafico 10 - <i>Grafici dei residui per la risposta altezza dei pillars</i>	83
Grafico 11 - <i>Superficie di risposta per altezza dei pillars</i>	84
Grafico 12 - <i>Retta di massima pendenza sovrapposta alla superficie di risposta</i>	84
Grafico 13 - <i>In rosso la nuova regione di esplorazione dei test</i>	85
Grafico 14 - <i>Superficie di risposta</i>	86
Grafico 15 - <i>Diagramma a barre della deviazione standard dei pillars rispetto la velocità di iniezione</i>	90
Grafico 16 - <i>Crescita di cellule MC3T3E1 sui supporti a 24, 72 ore e 7 giorni dalla semina. I risultati sono espressi come densità ottica \pm deviazione standard</i>	101

SOMMARIO

Il seguente lavoro di tesi ha l'obiettivo di progettare e realizzare, tramite stampaggio a iniezione, delle superfici micro strutturate per la coltura in vitro di cellule staminali mesenchimali, per capire se è possibile indirizzare il comportamento di queste cellule in termini di adesione, crescita e differenziazione. In particolare queste superfici contengono un pattern quadratico con ai vertici dei pillars cilindrici. Questi supporti sono stati realizzati con un Polistirene bio compatibile.

Gli inserti per lo stampo sono stati realizzati con un processo fotolitografico. Consiste nella deposizione tramite spin coating di un resist innovativo, questo resist polimerizza tramite una lampada UV: è quindi possibile fotolitografare la superficie grazie a una maschera. Sono stati realizzate tre configurazioni di pattern a pillars:

- Diametro 4 μm – Interasse 10 μm ($\text{Ø}4 - \text{I}10$) – Aspect ratio 0.2
- Diametro 3 μm – Interasse 9 μm ($\text{Ø}3 - \text{I}9$) – Aspect ratio 0.4
- Diametro 2 μm – Interasse 8 μm ($\text{Ø}2 - \text{I}8$) – Aspect ratio 0.4

È stato quindi progettato lo stampo che accoglie gli inserti descritti, e sono stati stampati i supporti con una pressa a micro iniezione, studiando l'influenza della temperatura dello stampo, della velocità di iniezione e della pressione di impaccamento sulla replicabilità delle micro features. Il fattore in assoluto più significativo è la temperatura dello stampo. Non essendo possibile alzarla a più di 90°C, sono stati ottimizzati gli altri due fattori, che risultano rispettivamente 700 mm/s e 400 bar.

Con questi parametri di processo sono state stampate le tre geometrie differenti di diametro e interasse dei pillars e delle superfici senza pillars che servono da controllo.

I supporti di crescita sono stati utilizzati per la coltura cellulare in vitro. Sono state seminate cellule staminali preosteoblastiche ottenute dalla teca cranica di topi. Con il test di vitalità cellulare MTS a 24 ore dalla semina, si osserva una minore adesione cellulare nei supporti con micro pillar rispetto ai controlli; tuttavia a 7 giorni dalla semina, le colture sul campione $\text{Ø}2 - \text{I}8$, presentano valori di crescita e adesione maggiori rispetto al controllo ed anche la grandezza delle cellule è mediamente maggiore. Inoltre nei supporti con pillars c'è una disposizione a formare un mono strato sottile. Questi aspetti indicano chiaramente che è in corso una differenziazione verso forme mature (osteoblasti/osteociti) dovuta alla presenza dei micro pillars. Forte di questi primi risultati, sono in corso ulteriori test di crescita a 3/4 settimane di coltura per determinare il tipo di differenziazione.

INTRODUZIONE

Il National Center of Health Statistics (NCHS) afferma che al giorno d'oggi avvengono molte fratture ossee, osteoartriti, osteoporosi, cancro delle ossa. Nel 2004, negli Stati Uniti le fratture ossee sono state all'incirca 1039000, e nel 2000 in circa 118700 pazienti è stata riscontrata osteoporosi. L'American Academy of Orthopedic Surgeons (AAOS) riporta che dal 2000 al 2004 c'è stato un aumento dell'83.72% di interventi per protesi dell'anca, da 258000 a 474000 [1]. Anche nel settore odontoiatrico ogni anno avvengono numerosi interventi per ripristinare la dentatura persa.

I materiali tradizionali utilizzati per gli impianti, mediamente dopo 10-15 anni causano vibrazioni, infiammazioni, infezioni, osteolisi, usure. Per conferire alla protesi, solitamente costruita con metalli o altri materiali sintetici, una funzionalità a lungo termine è necessario che avvenga un processo chiamato osteointegrazione. Con questo termine si indica la migrazione di cellule indifferenziate dal tessuto ospitante verso la protesi e la loro differenziazione in cellule ossee che possano produrre tessuto osseo con la funzione di mantenere l'impianto nella posizione corretta. Quando le cellule non riescono a fare questo una soffice capsula ricopre la protesi e sono consentiti movimenti indesiderati di quest'ultima, e l'impianto ha una scarsa qualità.

Le cellule che hanno l'importante compito di assicurare l'osteointegrazione sono cellule staminali. Queste cellule non specializzate possono auto-rinnovarsi indefinitamente e differenziarsi in diverse cellule somatiche, se sono presenti gli stimoli ambientali corretti. Nel campo dell'ingegneria dei tessuti particolare attenzione è rivolta alle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (MSC), perché le tecniche per la raccolta e purificazione sono relativamente convenienti, ma soprattutto perché sono naturalmente pronte a generare diversi tipi di tessuto: ossa, cartilagine, muscolo, adiposi, ecc [2].

Il comportamento di queste cellule dipende fortemente dall'ambiente che le circonda. Gli stimoli esterni vengono recepiti tramite la matrice extra-cellulare (ECM), cioè l'insieme di tutti quei componenti che partecipano a fornire un'impalcatura sulla quale le cellule possono crescere, proliferare e, se ci sono gli stimoli giusti, anche influire sull'organizzazione del citoscheletro. Il contatto tra le cellule e il substrato della protesi può quindi determinare il successo o il fallimento dell'impianto.

È ormai noto che l'interazione cellula-substrato è influenzata dall'energia superficiale, dalla composizione chimica, dalla topografia, dalla forma e dalle dimensioni del pattern, dalla bagnabilità e dall'elasticità del supporto.

Recenti studi hanno dimostrato l'importanza della micro topografia, perché questa induce segnali fisici alle cellule che possono indurle ad aderire, proliferare e differenziarsi in maniera controllata. Con l'avvento delle nanotecnologie si è visto che anche la nano topografia guida il comportamento cellulare.

L'obiettivo di questo lavoro è la progettazione e la produzione di supporti biocompatibili che possano indurre crescita e differenziazione in cellule ossee delle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (MSC). Questi supporti potranno in futuro essere utilizzati per assicurare una efficace osteointegrazione dell'impianto accorciando i tempi di guarigione.

I nuovi sviluppi nel campo del micro-nano stampaggio a iniezione rendono questa tecnologia adatta alla produzione di questi supporti. Con questo processo è infatti possibile generare features micro e nano metriche, ma soprattutto lo stampaggio a iniezione si adatta molto bene a una futura produzione industriale, perché assicura tempi di produzione bassi e costi contenuti per produzioni su larga scala.

Capitolo 1

ANALISI DELLO STATO DELL'ARTE

1.1. Relazione tra la funzionalità cellulare e la morfologia della superficie

Ci sono molti parametri che influenzano il comportamento cellulare quando queste sono a contatto con un biomateriale: la rugosità superficiale, la densità, la bagnabilità, la topografia e le proprietà meccaniche del materiale. Insieme, queste proprietà del materiale agiscono sulla ECM delle MSC per produrre un desiderato fenotipo.

Soprattutto le proprietà superficiali del supporto devono essere prese attentamente in considerazione, perché agiscono anche sulla velocità di degradazione del supporto, il trasporto di fluidi e di molecole bioattive, chimiche di superficie riconoscibili dalla cellula, l'integrità meccanica, e la capacità di indurre segnali alla cellula. Il successo del supporto dipende da queste proprietà, in quanto influenzano l'adesione delle cellule, il trasporto di nutrienti e rifiuti, l'organizzazione e la differenziazione cellulare [2].

Micro - Topografia

La micro topografia è la presenza su una superficie di features di dimensioni micrometriche, a partire da qualche unità fino a qualche centinaia di micrometri. Molti studi hanno rivelato che la micro topografia sembra influenzare la migrazione, l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule.

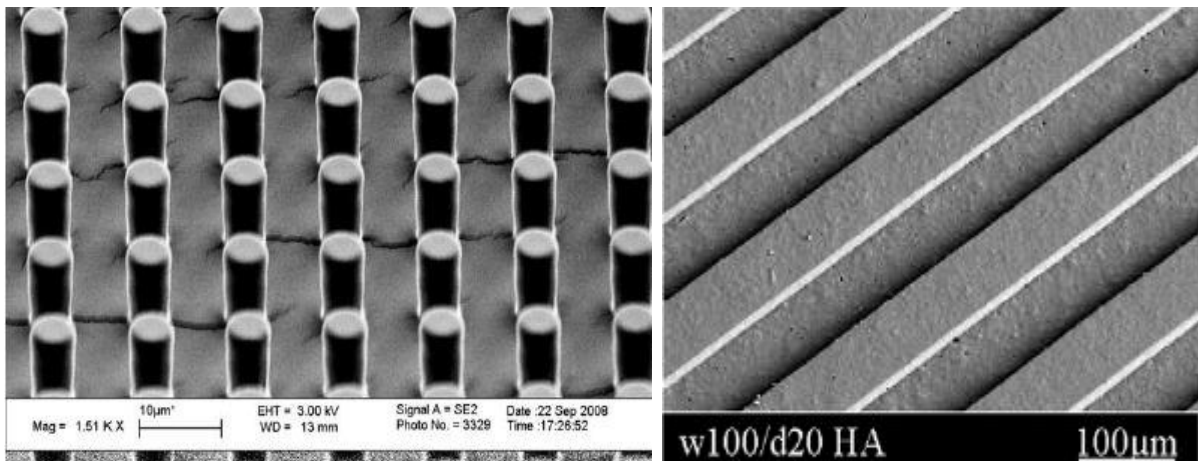


Figura 1 - Superfici microstrutturate

L'influenza del substrato sulla migrazione delle cellule è stata studiata la prima volta da Harrison nel 1911, quando ha fatto crescere cellule su una ragnatela e ha scoperto che le cellule embrionali seguivano l'andamento delle fibre della ragnatela [2].

Molto più recentemente è stato scoperto che su una superficie strutturata con micro canali si osserva tendenza delle cellule ad allungarsi e ad allinearsi lungo l'asse di questi, aumentando così la proliferazione, e riuscendo anche a indurre una certa differenziazione preferenziale. In questi studi è stato riscontrato che se la distanza tra i canali supera i 20 μm la superficie non sembra fornire particolari stimoli alle cellule, segno del fatto che le dimensioni della topografia devono calare. Inoltre l'orientazione aumenta con l'aumentare della profondità, ma cala con l'aumentare della larghezza dei canali. Se il canale ha una larghezza adeguata la cellula si adagia su di esso riprendendone la forma, altrimenti lo scavalca, formando una specie di ponte [3].

La presenza invece di pattern che contengono micro pillars ha effetti principalmente sull'adesione. I pattern con strutture circolari presentano una maggiore adesione rispetto a quelli con forma quadratica. Si può indurre differenziazione in cellule ossee tramite l'utilizzo di aggregati cellulari intrappolati in micro pozzetti [4].

Inoltre se il substrato riesce a conferire alla cellula una deformazione a forma di stella o ellittica del nucleo e del citoscheletro aumentano le possibilità di avere differenziazione in cellule ossee [5].

Nel lavoro di Kolind [6] *et al.* è descritto il comportamento delle cellule su varie tipologie di pattern micrometrici costituiti da micro pillars costruiti per litografia su wafer di silicio. Rivela una stretta combinazione tra le topografie e il modo con cui risponde la cellula. Sono stati studiati 169 diversi pattern, riscontrando che forma e distribuzione dei pillars ha effetto minore sulla proliferazione rispetto a diametro e passo, essi hanno tanto più effetto, tanto più grande è il tempo di cultura. Passo ampio tra i pilastri, 4-6 μm , riduce la proliferazione, perché comporta un grande allungamento delle cellule che spezza l'actina (proteina che serve per l'adesione tra cellula-substrato e tra cellula-cellula), invece passo ridotto, 1-2 μm , aumenta la proliferazione, e i legami tra cellula e substrato si presentano sulla sommità dei pillars. Le superfici con diametro di 2 μm sembrano presentare una proliferazione maggiore, e si nota aumento della proliferazione quando l'area proiettata dei pillars è almeno il 30% della superficie totale, ulteriori aumenti dell'area proiettata non comportano aumenti rilevanti della proliferazione.

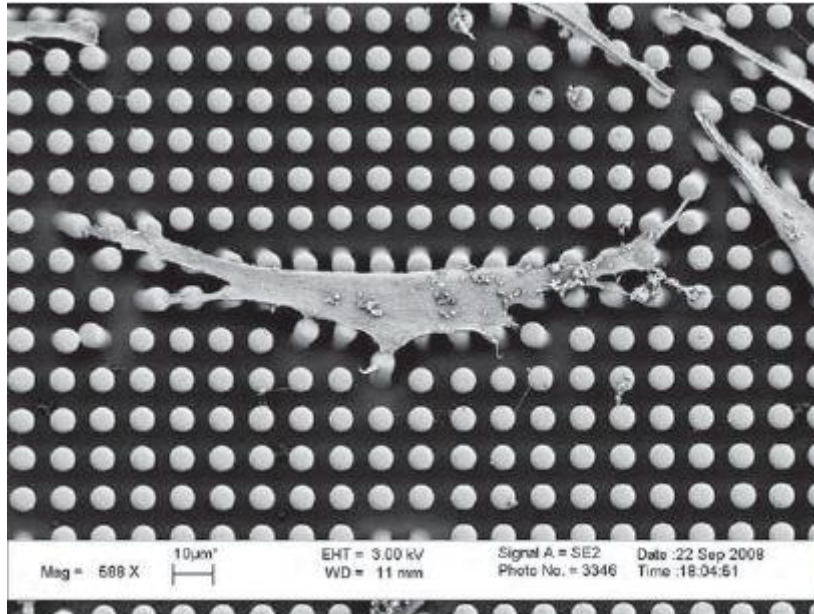


Figura 2 - Coltura cellulare su una superficie micro strutturata

Nano - Topografia

La nano topografia è la presenza su una superficie di features di dimensioni nano metriche, a partire da qualche unità fino a poche centinaia di nanometri. La costruzione di queste geometrie si è sviluppata solo negli ultimi anni, ma ci si è resi subito conto che si ottengono risultati migliori rispetto alla micro topografia.

Infatti, analizzando la struttura delle ossa ci si rende subito conto che è un materiale nano-composito, ad esempio è costituito per il 70% da hydroxyapatite, i cui cristalli sono lunghi 20-80 nm e spessi 2-5 nm [1].

Accelerazione nella crescita delle cellule ossee è stata riscontrata da Seunghan Oh [7] *et al.* È stato dimostrato che coltivando le cellule su una superficie composta da nano tubi di TiO₂ con diametro esterno di 100 nm, diametro interno di 70 nm e altezza 250 nm si ha un aumento di crescita e adesione col substrato del 300-400% rispetto una superficie piana.

Nello studio di Dalby [8] *et al.* sono state confrontate degli array quadrati ed esagonali ordinati e disordinati, composti da nano pits di diametro 120 nm, profondità 100 nm e interasse 300 nm. È stato riscontrato che gli array con pits disordinati, cioè che presentano un allineamento non perfetto presentano maggiore crescita e differenziazione in tessuto osseo (osteopontina e osteocalcina).

La creazione di features nanometriche è possibile anche con stampaggio a iniezione di materiale polimerico. Per la cultura di cellula in provetta è infatti largamente utilizzato il polistirene perché è biocompatibile, oltre che per le sue note caratteristiche di processabilità.

Nel lavoro di Coulter [9] *et al.* è descritta la realizzazione di pillars nanometrici in polistirene. Lo stampo è stato realizzato su wafer di silicio tramite litografia, ottenendo dei nanofori disposti con array esagonale, 400 nm di diametro, altezza di 150 nm (aspect ratio tra altezza e diametro è di 5/8) e distanza tra i centri dei pillars di 800 nm, su una superficie totale di 120x120 μm . In questo studio è stato dimostrato che è possibile ottenere una buona replicazione dello stampo grazie a un leggerissimo strato di teflon che agisce come agente distaccante e basso rapporto profondità/diametro. Sono stati quindi confrontati i risultati ottenuti dalla crescita di MSC sul provino nano strutturato, su un provino piano di polistirene iniettato, e su un provino commerciale. Sul provino nano strutturato è evidente la maggiore capacità di adesione, proliferazione e migrazione delle cellule.

Nello stesso lavoro è stato provato anche un altro tipo di materiale e processo: poliglicerolo sebacato (PSG) colato sullo stampo. Questo materiale è un bioelastomero biodegradabile e biocompatibile, con proprietà meccaniche simili ai tessuti umani. In questo caso sono state ottenute delle superfici micrometriche con array ortogonale, ma si hanno avuto problemi di replicazione quando si riduce la distanza tra i pillars. Si ha inoltre difficoltà di riempimento, in quanto il diametro dei pillars alla base è maggiore rispetto alla sommità.

Elasticità del substrato

Le cellule dei mammiferi in generale risentono dell'elasticità del substrato. È stato dimostrato che le forze che si trasmettono tra cellula e substrato influiscono su diffusione, migrazione, proliferazione, apoptosi (morte programmata delle cellule) e differenziazione. Recentemente Engler [10] *et al.* hanno confrontato i risultati di crescita ottenuti su substrati di differente elasticità paragonabili a quelle di tessuto nervoso (0.1-1 kPa), muscoloso (8-17 kPa) e osseo (25-40 kPa); ed è stato osservato che le MSC coltivate su questi substrati si differenziano in rispettivamente in tessuto neurogenico, miogenico e osteogenico.

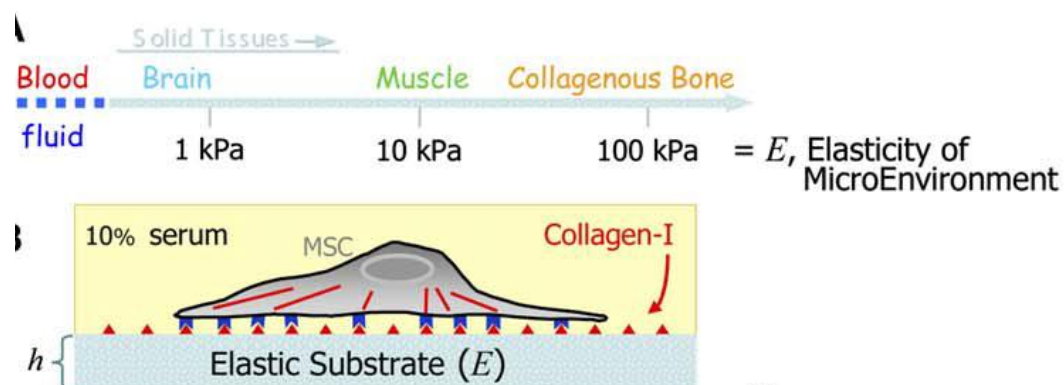


Figura 3 - Elasticità del substrato

Chimica della superficie

Interessante è il confronto tra l'idrofobicità di superfici micro e nano strutturate analizzata da Brammer [11] *et al.* Sono state costruite delle superfici con dei micro pillars ottenuti per fotolitografia su wafer di silicio e rivestito con uno strato d'oro. I micro pillars sono circolari e hanno altezza di 2.5 μm , e diametro circa uguale al passo e pari a 2 μm . I nano pillars sono anch'essi circolari, con la stessa altezza ma diametro e passo pari a circa 20 nm. Brammer ha riscontrato che la diminuzione delle dimensioni, da micro a nano, ha comportato un effettivo aumento in crescita e adesione al substrato delle MSC, in quanto le dimensioni sono ora comparabile a quelle delle proteine che favoriscono l'adesione. L'idrofobicità della superficie nano è maggiore di quella micro, si riesce a raggiungere un angolo di contatto di 134°, che favorisce la formazione di piccoli gruppi di cellule, le quali essendo a contatto possono maggiormente differenziarsi verso una direzione. Nella superficie piana di confronto e in quella micro le cellule sembrano restare indifferenziate, mentre in quella nano sia ha una preferenziale differenziazione in cellule ossee dovuta probabilmente alla particolare rigidità del supporto e al contatto cellula-cellula generato dall'idrofobicità della superficie.

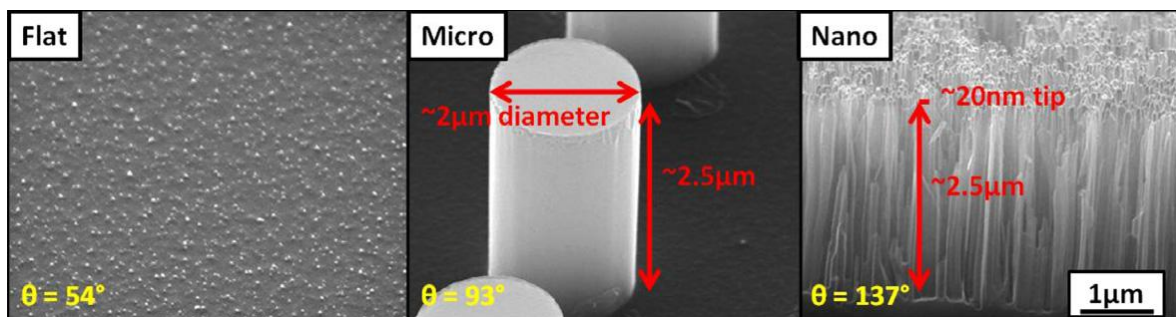


Figura 4 - Micro e nano-pillars

1.2. Replicazione di superfici micro strutturate con stampaggio a iniezione

Lo stampaggio a iniezione è una delle tecnologie più importanti e versatili per la produzione di massa di componenti in plastica. I componenti realizzati con questa tecnologia hanno buone tolleranze dimensionali e non necessitano solitamente di operazioni successive di finitura o assemblaggio. Tra tutte le materie plastiche processate, almeno il 32% in peso sono realizzate con questa tecnologia.

Il micro stampaggio a iniezione è una nuova tecnologia che deriva dallo stampaggio tradizionale e consente di creare componenti del peso nell'ordine dei milligrammi e dimensioni complessive nell'ordine dei micrometri, ma anche di creare micro-nano strutture su un'area definita di un componente più grande, del peso nell'ordine di qualche

grammo. La produzione di componenti micro strutturati è presente nel mercato già da diversi anni nel settore ottico (micro lenti, connettori per fibre ottiche), meccanico (micro ingranaggi, micro attuatori, micro swithes), archiviazione dati (CD, DVD) e medico (analisi del DNA, apparecchi audio protesici) [12].

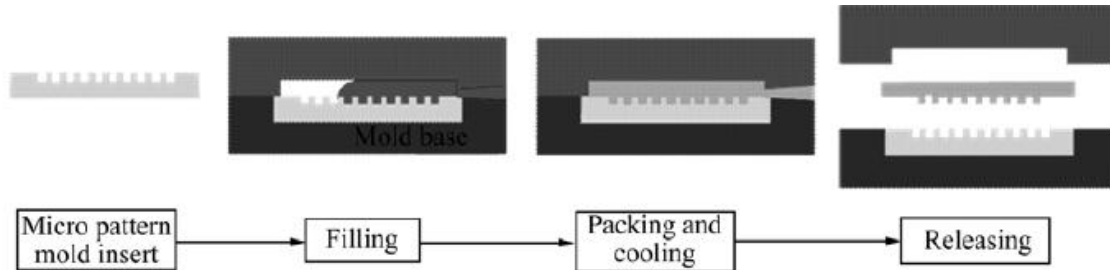


Figura 5 - Processo di iniezione

Stampaggio tradizionale vs Micro stampaggio

Le tradizionali tecnologie di stampaggio a iniezione difficilmente si adattano quando si riducono le dimensioni del prodotto su scale micrometriche, perché cambia il comportamento del materiale, ad esempio le proprietà reologiche. Si è riusciti a realizzare componenti con dimensioni micrometriche e dettagli con rapporto profondità/larghezza oltre 10 modificando alcune tecnologie tradizionali e inventandone di nuove.

Lo stampaggio a iniezione tradizionale è composto da tre fasi principali:

1. **Plastificazione** – la vite di plastificazione ruota fondendo la quantità necessaria per la fase di iniezione. La pressione spinge indietro la vite finché la quantità necessaria di polimero è fusa, quindi la vite si ferma.
2. **Iniezione, riempimento e impaccamento** – quando lo stampo è chiuso la vite avanza finché il polimero riempie la carota, i canali di alimentazione e la cavità. Quindi la vite continua a iniettare un po' di materiale per compensare i ritiri successivi.
3. **Raffreddamento ed espulsione** – quando il polimero è solidificato lo stampo si apre e il componente è espulso dagli estrattori automatici.

Quando si cerca di adattare i macchinari tradizionali alla fabbricazione di componenti dalle dimensioni molto piccole sorgono alcuni problemi. Prima di tutto la dimensione dei pellets non consente di realizzare viti sotto un certo diametro, in certi casi il peso stesso di un pellet supera quello del componente. Una vite di una certa dimensione ha inoltre bisogno di una corsa minima per poter accelerare fino a velocità di iniezione adeguate. Quindi la dosatura precisa di un componente così piccolo è impossibile da realizzare, bisogna necessariamente progettare delle carote e dei canali molto grandi, col risultato che il 90% del materiale diventa scarto.

Tutti questi problemi nascono dal fatto che una singola unità, cioè la vite, svolge quattro funzioni: plastificare, omogeneizzare, dosare, iniettare. Disaccoppiando la fase di plastificazione dalla fase di iniezione tramite un pistone è possibile dosare la quantità da iniettare in maniera molto precisa (solitamente da 5 a 300 mg), l'iniezione avviene poi tramite un secondo pistone controllato da un motore elettrico in grado di iniettare a grande velocità (da 500 a 1000 mm/s) ed è sostanzialmente questa la differenza principale tra una macchina tradizionale e una per il micro stampaggio.

Il micro stampaggio è composto dalle seguenti fasi:

1. Plastificazione – la vite plastifica il materiale nella camera di dosaggio e si chiude la valvola per impedire che il materiale torni indietro
2. Dosaggio – in base al volume di materiale desiderato un pistone di dosaggio fornisce la quantità esatta al cilindro di iniezione
3. Iniezione, riempimento, impaccamento – il pistone di iniezione spinge il fuso dentro la cavità dello stampo a grande velocità, il pistone esercita poi una pressione di mantenimento avanzando
4. Raffreddamento ed espulsione – quando il polimero è solidificato lo stampo si apre e si espelle il componente [12]

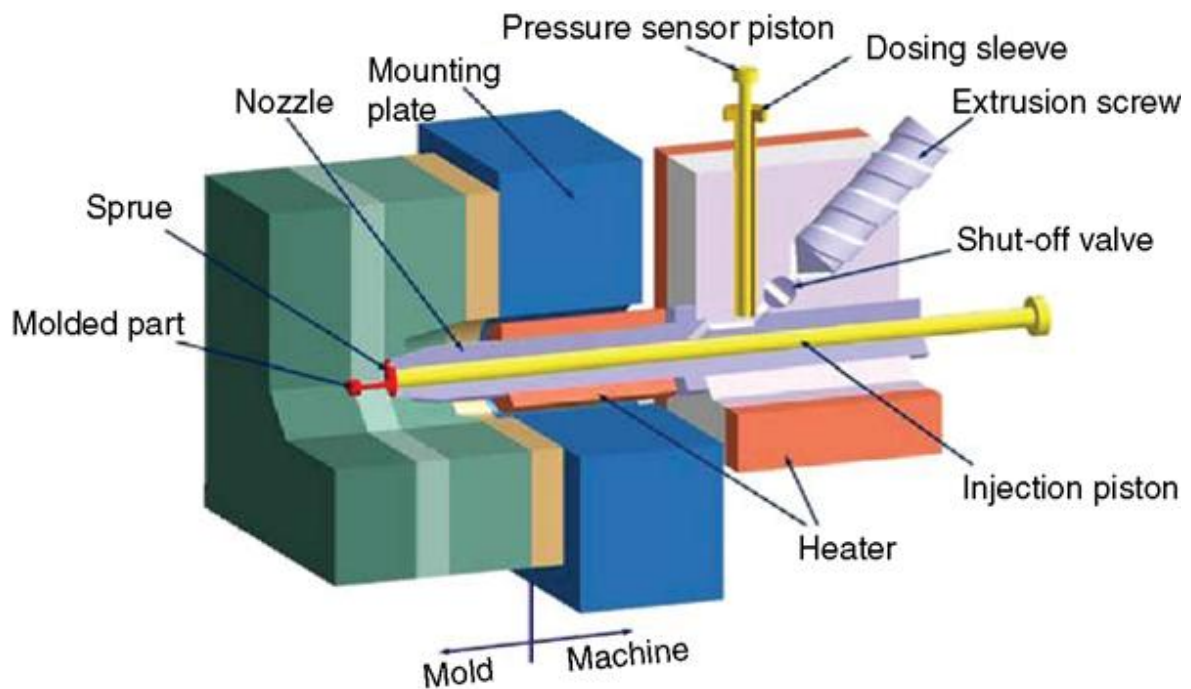


Figura 6 - Unità di iniezione di una macchina per micro stampaggio

Influenza dei parametri geometrici e di processo

Per produrre componenti di alta qualità bisogna comprendere le relazioni tra la il riempimento della cavità e i parametri di processo, questa operazione può essere molto complessa, e servono solitamente diversi esperimenti per determinare le condizioni ottimali dei principali parametri di processo:

- Temperatura del fuso T_{melt}
- Temperatura dello stampo T_{mold}
- Tempo di iniezione t_{inj}
- Pressione di compattazione P_{pack}

Sperimentalmente si è visto che si ha un buon riempimento di features micrometriche usando alte temperature dello stampo, perché diminuisce la viscosità del fuso e previene la solidificazione prima del completo riempimento. Anche alte velocità di iniezione sono desiderabili, perché cala la viscosità del fuso a causa della pseudo-plasticità (thinning) e a causa del riscaldamento viscoso del polimero.

Non è invece conveniente alzare la temperatura del fuso, perché porta ben pochi benefici al riempimento della cavità, e si rischia invece di degradare maggiormente il materiale. Nemmeno la pressione di compattazione è da aumentare troppo, altrimenti si rischia di indurre tensioni residue che possono distorcere il polimero fuori dallo stampo, oltre che a indurre tensioni allo stampo [12].

Griffith [13] *et al.* hanno studiato la replicazione di pins micrometrici, con dimensioni diverse: diametro 0.15 mm e altezza 0.4 mm (aspect ratio 0.375), e diametro 0.1 mm e altezza 0.35 mm (aspect ratio 0.286); al variare di temperatura del fuso, temperatura dello stampo, velocità di iniezione. Il gruppo di ricerca ha determinato che i fattori di processo più significativi sono la velocità di iniezione, a valori alti aumenta la replicabilità ma peggiora la finitura superficiale; la temperatura del fuso è desiderabile anch'essa a livelli alti, ma se troppo elevata crea una sorta di flusso stagnante nella zona adiacente al gate, e i pillars più vicini a questa zona vengono riempiti solamente alla fine della fase di riempimento dell'intera cavità, ed è più difficile la replicazione a causa del raffreddamento del materiale. Anche alte temperature dello stampo migliorano la replicabilità. Per quanto riguarda i parametri geometrici, essi affermano che non c'è influenza del passo tra i pins, ma c'è influenza delle dimensioni geometriche e della loro posizione rispetto al gate.

Nello studio di Koelling [8] *et al.* è stato studiato lo stampaggio di micro canali con aspect ratio 5: profondità 500 e spessore 100 μm , e profondità 250 con spessore 50 μm . I parametri di processo che hanno maggiore influenza sono la velocità di iniezione, la temperatura dello stampo, la reologia del fuso e la collocazione nello stampo delle micro features rispetto il gate. È stato inoltre riscontrato che più i canali sono vicini tra loro, maggiore è il riempimento perché ho minor perdita di calore. Da notare che a parità di condizioni, più lo stampo è corto, maggiore è il riempimento che avviene grazie alla pressione che aumenta rapidamente. Nei canali (B) più distanti dal gate si ha maggior riempimento, rispetto a quelli vicino al gate (A), perché la solidificazione avviene prima e la pressione non riesce a spingere il fuso all'interno dei canali.

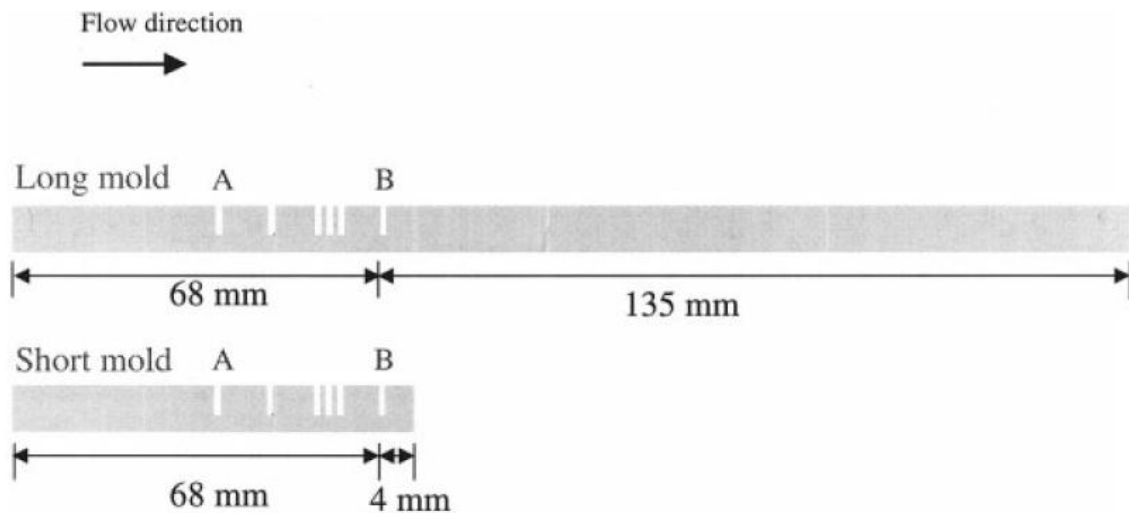


Figura 7 - Disposizione dei micro canali negli stampi

Quest'ultimo fenomeno è stato riscontrato anche in altri studi. Ad esempio nello studio di Kim [14] *et al.* è stato riscontrato che nella replicazione di uno stampo con pattern a prisma sa ha più difficoltà nel riempimento nella zona adiacente al gate proprio a causa della pressione che aumenta più rapidamente nella zona finale dello stampo.

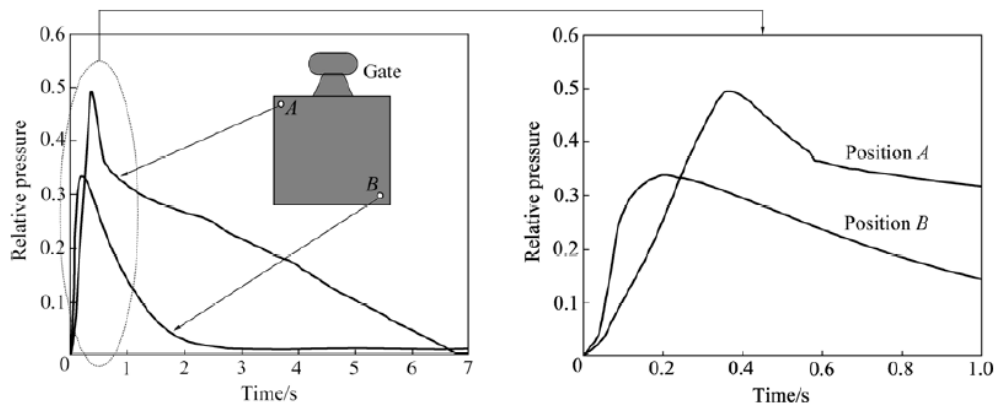


Figura 8 - La pressione all'interno della cavità aumenta più rapidamente nell'ultima zona riempita

In altri studi condotti da Kim [16] è stato realizzato uno stampo con fori del diametro di 200 nm e profondità variabile da qualche centinaia di nm fino a 60 μm . Lo stampo è stato realizzato con ossido di alluminio anodizzato (AAO). Dato l'alto aspect ratio delle strutture (fino a 300) da replicare lo stampo è fornito di un sistema di raffreddamento/riscaldamento rapido, che risulta indispensabile per prevenire il raffreddamento prematuro del materiale.

Anche nello studio di Lin [17] *et al.* sono stati studiati i parametri di processo più significativi nella replicazione di features micro e nano metriche. Lo stampo è costituito da micro canali di larghezza 400 nm e profondità 650 nm (aspect ratio 0.15). Anche in questo caso è stato necessario un sistema vario termico dello stampo per avere una efficace replicazione, lo stampo deve avere una temperatura prossima alla transizione vetrosa del materiale. Inoltre la replicazione aumenta con l'aumentare della pressione di compattazione.

Nello studio di Larsen [18] *et al.* è stato studiato lo stampaggio a iniezione di un pattern regolare di geometrie. Essi affermano che è molto difficile riuscire a replicare un pattern regolare a causa del raffreddamento rapido che induce distorsioni. Queste distorsioni solitamente non raggiungono le dimensioni del micrometro, ma se il pattern ha dimensioni molto ridotte possono influire in maniera significativa. Maggiore è la temperatura dello stampo, maggiore è il gradiente termico e quindi l'instabilità che può generarsi.

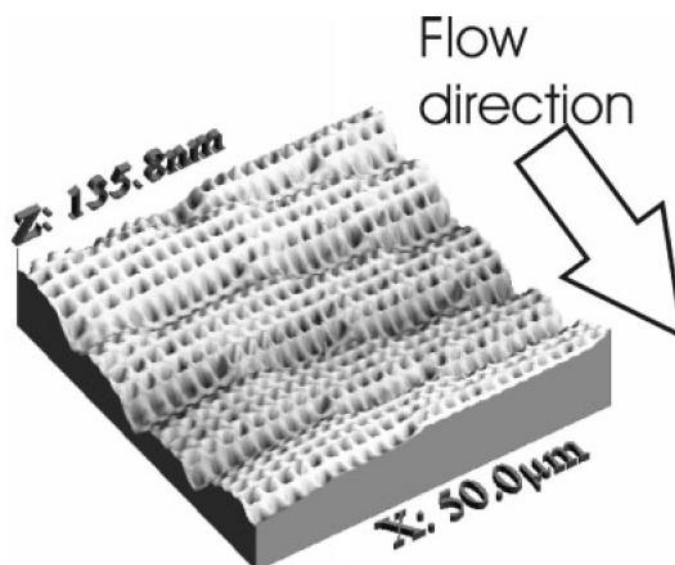


Figura 9 - Distorsioni in direzione del flusso del polimero

1.3. Fabbricazione di features micro e nano metriche

Le principali tecnologie utilizzate per modellare features micro e nanometriche sono basate su tecniche litografiche e tecniche di attacco chimico. Con queste tecnologie è possibile controllare accuratamente le dimensioni.

Fotolitografia

Una delle prime tecniche in grado di generare topografie precise e ben definite con dimensioni comparabili a quelle delle cellule (5-100 μm) è stata la fotolitografia, nata nei primi anni ottanta essa è ancora largamente utilizzata e da allora le fasi principali di questi processo non sono cambiate più di tanto (figura 10). Per prima cosa è necessaria una superficie di rugosità molto fine, solitamente si utilizzano superfici di quarzo, vetro o silicio che sono disponibili con rugosità inferiore al nanometro. Si applica poi un rivestimento di polimero foto-sensibile, tramite rotazione della superficie (2000-6000 rpm) è possibile applicare uno strato uniforme, questo rivestimento si chiama “resist”. Si rimuove poi il solvente del resist grazie a riscaldamento in forno del provino. Infine la modellazione del pattern sul substrato avviene tramite una maschera che lascia passare la luce solo dove desiderato. Ci sono due tipi di resist: “positive tone resist” è il più utilizzato, l’area esposta alla luce si dissolve durante questa fase, mentre il “negative tone resist” è insolubile nelle aree esposte. La risoluzione ottenibile dipende principalmente dalla lunghezza d’onda del fascio luminoso. In molte ricerche accademiche sono state raggiunte dimensioni di 250 nm, tipicamente le risoluzioni massime ottenibili si aggirano attorno al micrometro [12].

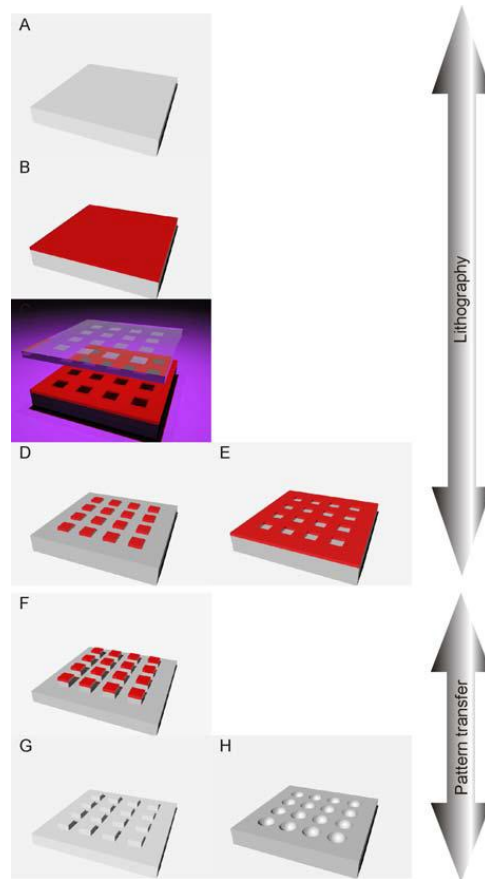


Figura 10 - Fotolitografia

Litografia a fascio elettronico (EBL)

È basato sul principio del microscopio elettronico a scansione, un fascio di elettroni è concentrato in un'area molto piccola, solitamente 2-5 nm, grazie a una serie di lenti elettrostatiche. La ragione per cui è possibile ottenere pattern fino a 5 nm risiede nel fatto che la lunghezza d'onda degli elettroni è molto minore rispetto alla fotolitografia. La fotolitografia è un processo parallelo, cioè tutta la superficie è lavorata nello stesso momento, l'EBL invece è un processo in serie, viene lavorata una superficie limitata per volta e il tempo di lavorazione può essere anche molto lungo. La procedura è simile alla fotolitografia, la differenza sostanziale è che la superficie deve necessariamente essere conduttrice altrimenti si caricherà in seguito alla scarica di elettroni. Il resist è sensibile alle radiazioni e si tratta di un polimero che si dissolve durante l'esposizione (positive tone) o reticola (negative tone).

Il voltaggio del fascio è determinato dai requisiti geometrici che si vogliono ottenere. Il fascio è sostanzialmente una nuvola di cariche negative, e si osserva una tendenza del fascio ad allargarsi a causa delle interazioni di repulsione tra le particelle. Alta accelerazione del voltaggio e focalizzazione solo in prossimità della superficie minimizza

questo effetto. Alti valori del voltaggio stroncano la divergenza del fascio perché rende molto breve l'intervallo di tempo in cui gli elettroni hanno elevata densità. È un processo molto influenzato dai campi magnetici ed elettrici che sono presenti nell'ambiente circostante, maggiore è il voltaggio minore è la loro influenza. I tipici valori di tensione si aggirano intorno a 20kV, a volte anche 30-40kV.

L'intensità di corrente influenza la qualità del fascio. Il fascio risulta compatto e ben focalizzato se la corrente è bassa, cioè quando le forze di repulsione e la densità sono basse. Questo è in contrasto con la produttività del sistema, ma si può ovviare a questo inconveniente con resist molto sensibili che garantiscono una sufficiente velocità di lavorazione.

La risoluzione non dipende tanto dal diametro del fascio, sono invece molto importanti i meccanismi di interazione tra gli elettroni del fascio e gli atomi del substrato. Il fascio di elettroni solitamente non interagisce con gli elettroni della superficie, ma li colpisce spargendoli nell'area circostante, il fascio principale perde così energia, e gli elettroni rimossi ionizzano l'area circostante formando un fascio secondario che allarga la zona interessata dal fascio elettronico. Questo effetto dipende molto dal numero atomico del materiale colpito, nei materiali con basso numero la profondità è maggiore rispetto all'allargamento del fascio in confronto a materiali con alto numero atomico. Pertanto l'area interessata è maggiore del diametro del fascio e forma una zona di penetrazione fatta a "pera". Questo si chiama effetto di prossimità, e può raggiungere dimensioni di 0.5-1 μm se il numero atomico dell'elemento è basso.

Per generare features su scala nanometrica è necessario minimizzare l'effetto di prossimità, questo è possibile realizzando resist molto sottili e usando supporti di metallo pesante quale oro o platino [13].

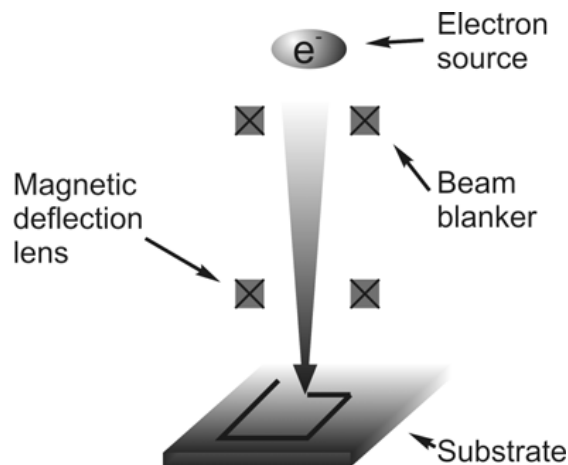


Figura 11 - Electron beam lithography

Trasferimento del pattern

Spesso, il pattern ottenuto viene trasferito sulla superficie tramite attacco chimico, il resist funziona come maschera. Ci sono due tipi di attacco chimico: anisotropo, la velocità di incisione è prevalente in una direzione, solitamente si esegue con gas; e isotropo, la velocità di incisione è uguale in tutte le direzioni, si esegue con soluzioni chimiche. In base al tipo di attacco si ottengono risultati diversi come mostrato in figura 12.

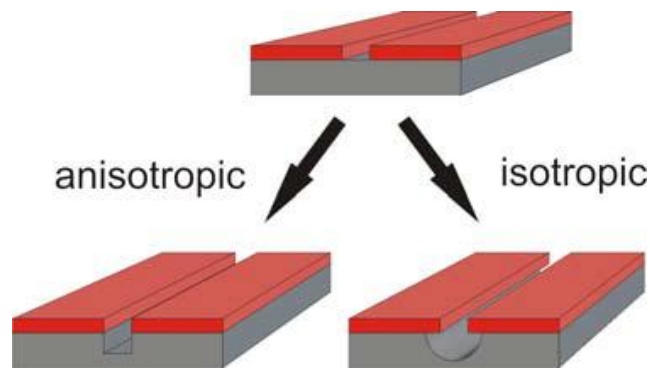


Figura 12 - Due tipi di attacco chimico

Oppure è possibile applicare un film metallico per evaporazione con conseguente dissoluzione del resist. Questo procedimento è chiamato lift-off.

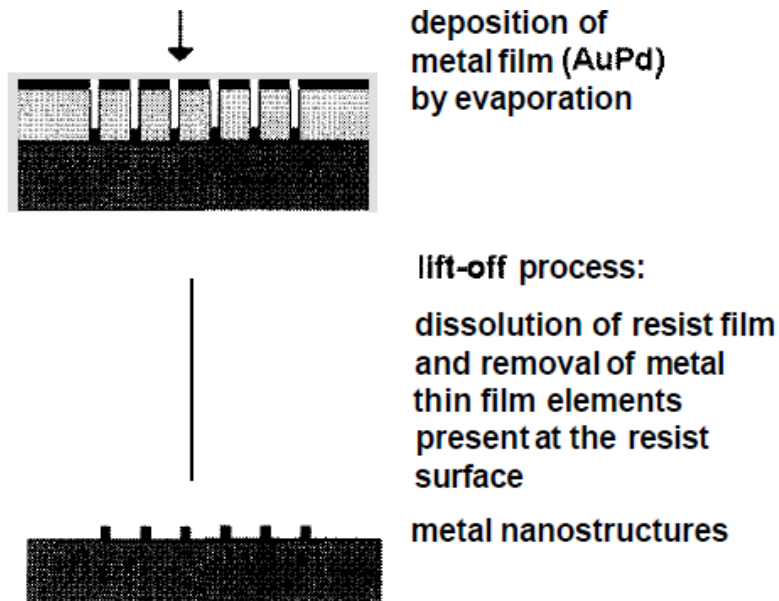


Figura 13 - Lift off

Poiché la litografia è un processo lungo e costoso, solitamente viene utilizzata per creare dei provini master da replicare ad esempio con lo stampaggio a iniezione. Il master ottenuto viene rivestito con uno strato metallico tramite deposizione elettrolitica [12].

Strati porosi di ossido di allumina anodizzato (AAO)

L'alluminio è sempre ricoperto di ossido perché molto affine con l'ossigeno. Lo strato di ossido può anche essere creato e controllato inserendo l'alluminio in una cella elettrolitica. Un particolare procedimento prevede due anodizzazioni della superficie dell'alluminio per ottenere un film di ossido di allumina che presenta degli array ordinati. La superficie dell'alluminio deve prima di tutto essere pulita chimicamente, in seguito si esegue la prima anodizzazione per un tempo molto lungo (circa 12 h). Inizialmente si creano sulla superficie dei pori disposti in maniera casuale, ma grazie alle forze di repulsione che vengono a crearsi tra pori adiacenti questi cercano di disporsi in maniera regolare, riuscendoci in maniera parziale. Questa prima anodizzazione viene poi rimossa chimicamente, ma lascia sulla superficie una serie di pattern esagonali molto ordinati, sui quali si effettua una seconda anodizzazione del tutto simile alla prima per un tempo più breve (circa 20 min), ma grazie ai pattern precedentemente creati è molto più ordinata. Nel lavoro di Hwang [14] *et al.* è stata studiata l'influenza della temperatura dell'elettrolite e del voltaggio sulla disposizione ordinata dei pori, ottenendo i risultati riassunti in figura 14.

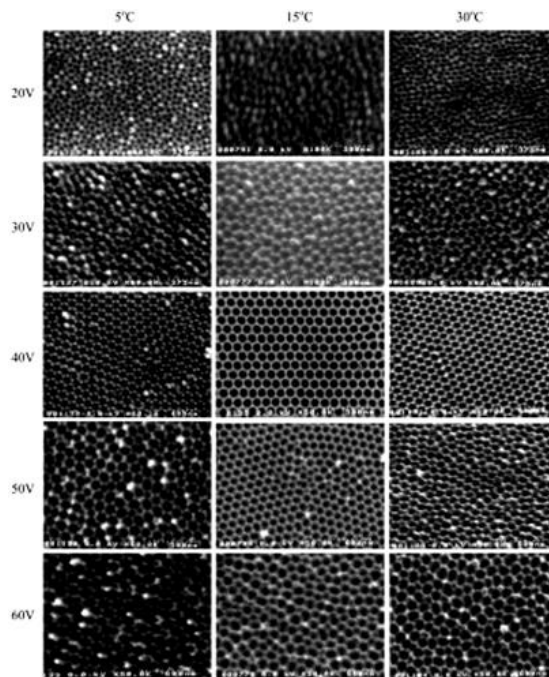


Figura 14 - Effetto dei parametri di anodizzazione

Si può notare che con 15° e 40 V si ottiene un discreto ordine a corto raggio, con pori di diametro medio 24 nm e distanza media 109 nm. È anche possibile aumentare il diametro dei fori con un attacco chimico. Da notare che la prima causa di distorsione è dovuta a stress termici dovuti alla grande differenza tra i coefficienti di dilatazione termica tra alluminio ($24 \times 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$) e ossido di alluminio ($8 \times 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$).

Capitolo 2

MISURAZIONE DELLA TOPOGRAFIA SUPERFICIALE

Esistono diversi modi per effettuare la misurazione delle proprietà superficiali di un campione. Nel nostro caso il sistema di misurazione deve essere in grado di eseguire una topografia superficiale con una risoluzione nell'ordine delle decine di nanometri in modo da consentire una rilevazione ottimale delle dimensioni dei pillars micrometrici. Le tecniche di misurazione si differenziano in due grandi classi: ottica, quindi non in contatto col campione; e a sonda, con tastatore in contatto o a distanza molto ravvicinata col campione.

2.1. Profilometria ottica

Mentre storicamente il profilometro era simile a un fonografo che funzionava per contatto tramite uno stilo in moto relativo con la superficie, adesso sono disponibili molte tecniche di profilometria ottica senza contatto. I maggiori vantaggi di un profilometro ottico sono: la velocità, non toccando la superficie la velocità di scansione dipende solo dalla velocità di riflessione della luce sulla superficie e dalla velocità di acquisizione dell'elettronica dello strumento; l'affidabilità, i profilometri ottici non toccano le superfici e non possono danneggiarle, sono più sicuri. Molti profilometri senza contatto hanno bisogno di poca manutenzione; e la risoluzione, è in un intervallo di pochi micrometri fino a meno di un micrometro.

Microscopio confocale

Il microscopio confocale produce immagini sezionate del provino che si vuole misurare. Il principio base per produrre questo tipo di immagini consiste nell'illuminare un'area molto ristretta con una luce strutturata, osservando la luce riflessa e diffusa mediante un secondo pattern identico a quello iniziale, che blocca la luce che proviene dalle regioni della superficie che non stanno nel piano focale dell'obiettivo del microscopio.

La tipica configurazione è rappresentata in figura 15. In tale configurazione il microscopio inquadra la superficie mediante l'obiettivo. Tramite una sorgente luminosa e un foro si ottiene una piccola zona illuminata sul piano focale dell'obiettivo. La luce riflessa dalla superficie torna indietro e passa attraverso l'obiettivo e viene rilevata su un secondo foro, chiamato apertura confocale. Nella parte posteriore del diaframma confocale, c'è un foto-rilevatore che registra il segnale d'intensità riflessa dalla superficie.

Quando la superficie è posta esattamente sul piano focale dell'obiettivo, la luce riflessa

entra sul diaframma confocale e quindi il segnale registrato sul foto-rilevatore è alta. Al contrario, quando la superficie è posizionata lontano dal piano focale dell'obiettivo, la luce riflessa non entra sul diaframma confocale e il foto-rilevatore registra un segnale basso.

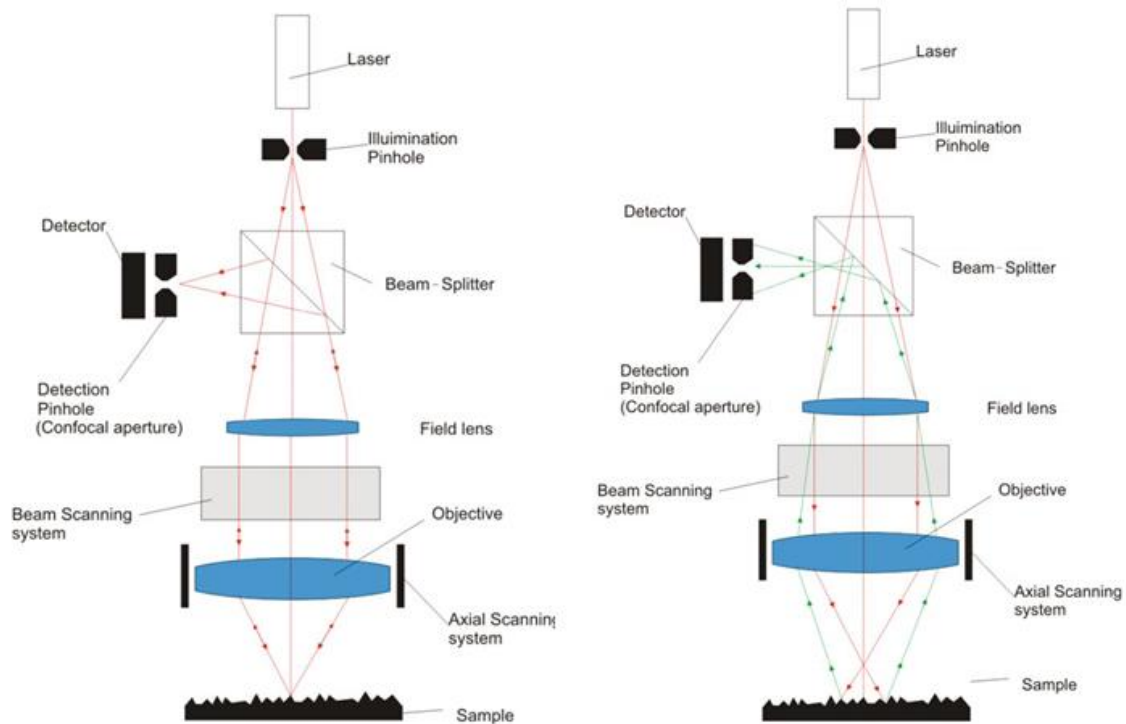


Figura 15 - Funzionamento del microscopio confocale

In un'immagine semplice di tipo "bright fields" c'è segnale lungo tutta l'immagine, che mostra dettagli ad alta definizione solo su quelle regioni che sono in prossimità del piano focale dell'obiettivo. Al contrario, in un'immagine confocale le regioni a fuoco hanno definizione alta, mentre le regioni fuori fuoco tendono ad essere scure, completamente scure sono le regioni molto lontane dal fuoco. La figura 16 mostra la differenza tra il bright fields e l'immagine confocale.

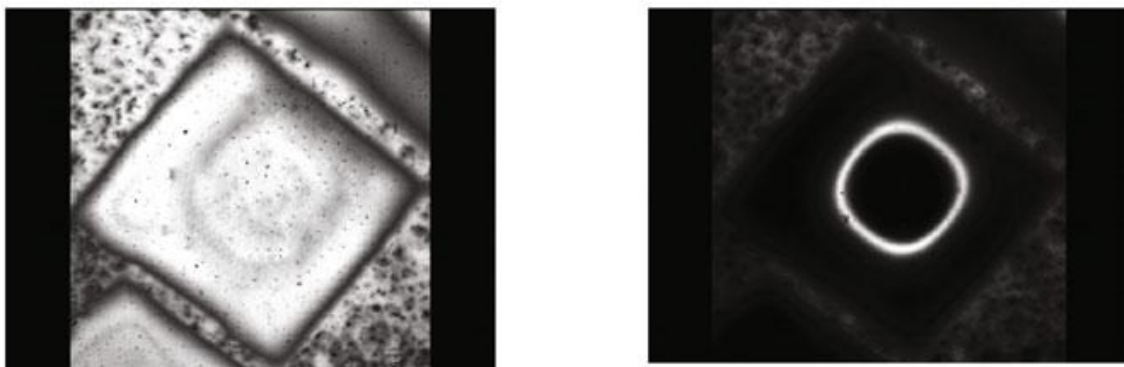


Figura 16 - A sinistra una immagine di tipo bright fields, a destra una immagine confocale

Il principio con cui si effettua la profilatura della superficie consiste nel memorizzare una sequenza di immagini confocali nella memoria di un computer. Queste immagini sono rilevate da diversi piani lungo l'asse di profondità di fuoco dell'obiettivo del microscopio.

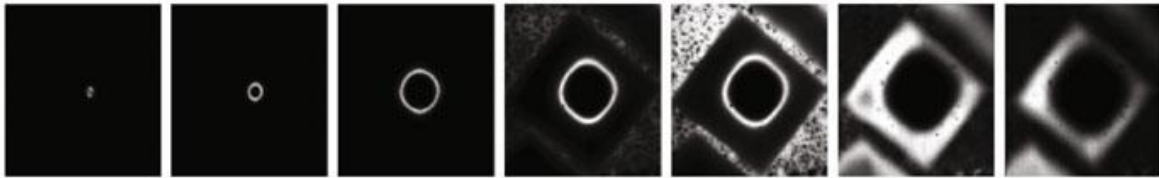


Figura 17 - Sequenza di immagini confocali

Ogni pixel dell'immagine contiene un segnale chiamato risposta assiale. Il segnale massimo della risposta assiale è raggiunto quando la superficie si trova esattamente sul piano focale dell'obiettivo del microscopio. Pixel differenti avranno la massima risposta assiale in diverse posizioni dell'asse z secondo la forma 3D della superficie. Individuando la posizione del massimo della risposta assiale per ogni pixel, la superficie 3D viene ricostruita.

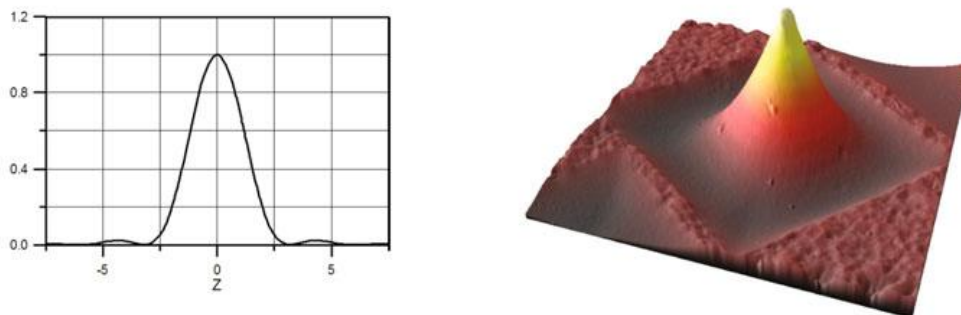


Figura 18 - Ricostruzione 3D della superficie

La posizione dell'asse del massimo della risposta assiale è riferita all'altezza della posizione della superficie. Il modo più veloce per calcolare la posizione dell'asse è assegnare posizioni discrete dello scanner. Questo è un metodo a bassa risoluzione poiché il più piccolo passo tipico su un microscopio confocale è dell'ordine di 0,05 micron. Metodi matematici più avanzati sono utilizzati al fine di individuare con maggiore precisione i dati metrologici, si può così arrivare a una risoluzione di 0.01 micron. Per la rilevazione di superfici metalliche ingegneristiche è bene che la lunghezza d'onda della luce sia molto piccola, pertanto la sorgente luminosa ha tipicamente un colore blu/viola [15].

Interferometro a luce bianca

L'interferometria si basa sull'idea che le ampiezze di due onde (per esempio, luce, suono o acqua) con la stessa frequenza si possono sommare tra loro raddoppiando la loro ampiezza se entrambe hanno la stessa ampiezza iniziale; quando le due onde sono sfasate di 180° la somma è nulla, assumendo nuovamente per entrambe la stessa ampiezza iniziale. Questa somma tra onde che modifica le proprietà dell'onda finale è nota come sovrapposizione e si traduce in una serie di bande chiare e scure note come frange di interferenza che vengono visualizzate su uno schermo o attraverso un microscopio.

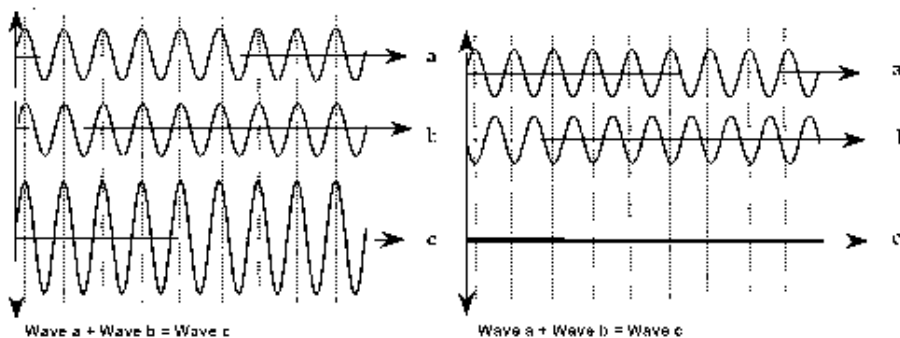


Figura 19 - Interferenza costruttiva e distruttiva

Per poter utilizzare la sovrapposizione e costruire un interferometro utilizzando una singola sorgente luminosa, può essere utilizzato un divisore di fascio per creare le due onde. Tipicamente in un interferometro, un'onda è divisa in due parti, che viaggiano in percorsi differenti e le onde vengono poi combinate per creare interferenze. Quando i percorsi differiscono di un numero pari di mezze lunghezze d'onda, le onde sovrapposte sono in fase e si ottiene una interferenza costruttiva, aumentando l'ampiezza dell'onda di uscita. Quando differiscono da un numero dispari di mezze lunghezze d'onda, le onde sono sfasate di 180° e si osserva interferenza distruttiva, diminuendo l'ampiezza dell'uscita, come mostrato nella figura 19. Uno schema di come i fasci separati producono interferenza costruttiva è mostrato in figura 20.

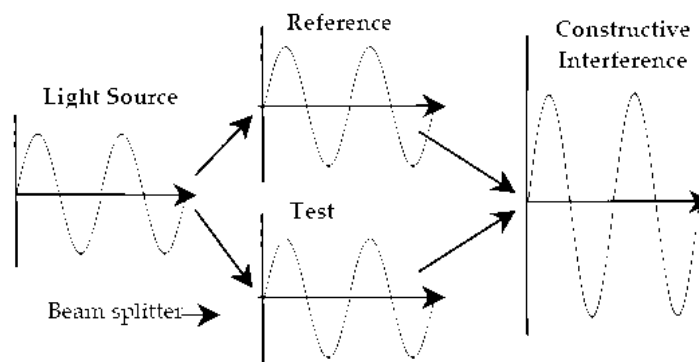


Figura 20 - Interferenza costruttiva da una sorgente luminosa

Uno schema di un interferometro è mostrato in figura 21. Il divisore di fascio superiore dirige la luce dalla sorgente luminosa verso la lente di obiettivo. Il divisore di fascio inferiore nella lente obiettivo divide la luce in due fasci separati. Un raggio è diretto verso il campione e un raggio è diretto verso uno specchio di riferimento interno. La combinazione dei due raggi viene inviata al rivelatore. A causa della bassa coerenza della sorgente di luce bianca, per poter osservare interferenza la lunghezza del percorso ottico dal campione al riferimento deve essere quasi identica.

Quando si parla di fase di un'onda ci si riferisce sempre all'approssimazione di onde piane ovvero di onde perfettamente monocromatiche. In realtà ogni onda reale ha delle deviazioni rispetto a questo andamento ideale e quindi, dopo che si è propagata per una certa distanza (ovvero per un certo tempo) le deviazioni da un andamento perfettamente sinusoidale diventano sensibili. Queste deviazioni sono matematicamente descrivibili come una deviazione sulla fase dell'onda. Quando il rapporto di fase si perde per via di queste deviazioni si dice che l'onda ha perso la sua coerenza temporale. Si può dunque definire come tempo di coerenza l'intervallo medio di tempo nel quale l'onda oscilla in un modo prevedibile. Durante questo intervallo essa compirà un certo numero di oscillazioni prima di cambiare fase. Il prodotto tra il tempo di coerenza e la velocità della luce è detto lunghezza di coerenza. Un'onda perfettamente monocromatica sarebbe descrivibile come una perfetta senoide, la cui lunghezza di coerenza sarebbe infinita. Una lampada comune ha una lunghezza di coerenza di frazioni di millimetro, mentre alcuni laser arrivano anche a qualche decina di chilometri.

La differenza di lunghezza tollerabile tra i bracci di un interferometro dà una misura del tempo di coerenza della sorgente usata. Il rivelatore misura l'intensità della luce come obiettivo interferometrico viene azionato nella direzione verticale (asse z), e trova la massima interferenza. Ciascun pixel del sensore misura l'intensità della luce e l'involuppo della frangia ottenuta può essere utilizzato per calcolare la posizione della superficie.

Si utilizza luce bianca piuttosto che luce monocromatica perché ha una lunghezza di coerenza più breve, e quindi evita ambiguità nella determinazione dell'ordine della frangia. Strumenti differenti usano diverse tecniche per controllare il movimento dell'obiettivo e per calcolare i parametri di superficie. La precisione e la ripetibilità della misura dell'interferometro dipendono da numerosi parametri tra cui il controllo e la linearità dell'attuatore verticale, le prestazioni della macchina, il disegno del telaio metrologia, la stabilità del campione, l'ambiente, ecc

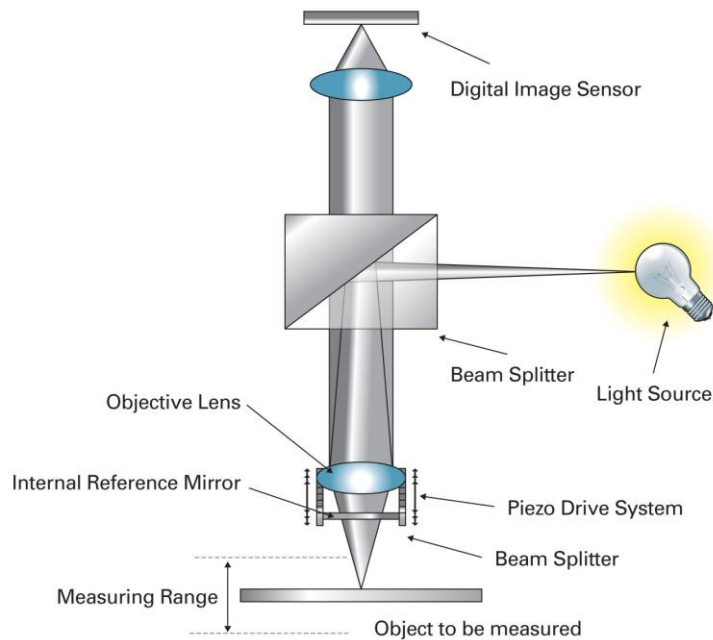


Figura 21 - Configurazione tipica di un interferometro

Se la lente obiettivo viene spostata accade un cambiamento di intensità su ogni pixel a causa delle interferenze che intervengono quando la distanza dal campione al separatore di fascio è la stessa della distanza dallo specchio di riferimento al separatore di fascio. Se l'obiettivo viene spostato verso il basso i punti più alti della superficie causano interferenza prima. Queste informazioni possono essere utilizzate per costruire una mappa tridimensionale della superficie [16].

2.2. Profilometria a sonda

L'analisi della microstruttura superficiale e delle sue proprietà locali avviene in questo tipo di profilometri con un microscopio a scansione di sonda utilizzando speciali sonde appuntite a forma di ago. Le dimensioni tipiche della porzione della sonda che si utilizza nella analisi (l'apice della punta) è di circa 10 nanometri, e la distanza tipica tra punta e campione negli SPM è circa 0.1 – 10 nanometri. I diversi tipi di profilometri a contatto sfruttano diversi tipi di interazione tra punta e campione. Con questi strumenti si ottengono delle misurazioni molto più accurate rispetto ai profilometri ottici, lo svantaggio è la delicatezza di queste apparecchiature, il tempo elevato di misurazione, e il contatto col campione che può danneggiare la superficie.

Microscopio a forza atomica (AFM)

Si tratta di una tecnologia piuttosto recente, fu inventata nel 1986 da Gerd Binnig, Calvin F. Quate e Christopher Herber. Il principio di funzionamento di un AFM consiste nella misura della forza di interazione tra la punta e il campione, usando sonde particolari costituite da una leva elastica con una punta acuminata posta sulla estremità libera (Fig. 59). La forza esercitata sulla punta dalla superficie produce una flessione della leva, e misurando tale flessione si può valutare la forza di interazione punta-campione.

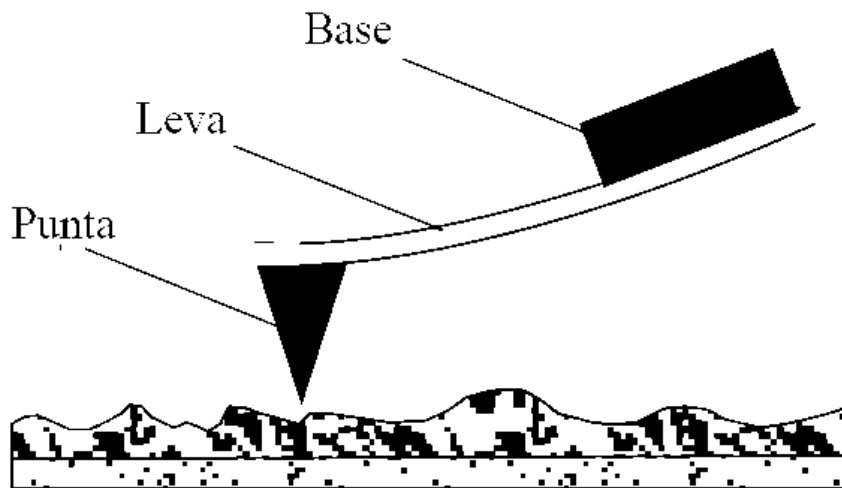


Figura 22 - Schema di una sonda AFM

Il funzionamento può essere semplificato considerando le forze di Van Der Waals. L'energia potenziale di due atomi posti a distanza r l'uno dall'altro è descritta dal potenziale di Lennard-Jones.

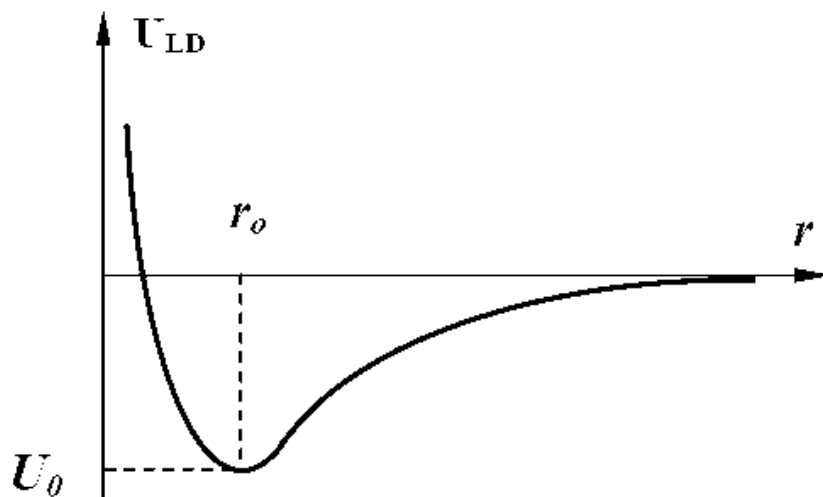


Figura 23 - Andamento qualitativo del potenziale di Lennard-Jones

La punta AFM viene attratta quando si trova a grandi distanze e respinta a brevi distanze dal campione. L'acquisizione di una topografia si può fare registrando il metodo della leva

ottica, il sistema ottico è allineato in modo che il fascio emesso da un diodo laser viene focalizzato sulla leva, e il fascio riflesso colpisce il centro di un sensore ottico costituito da un fotodiodo diviso in quattro settori.

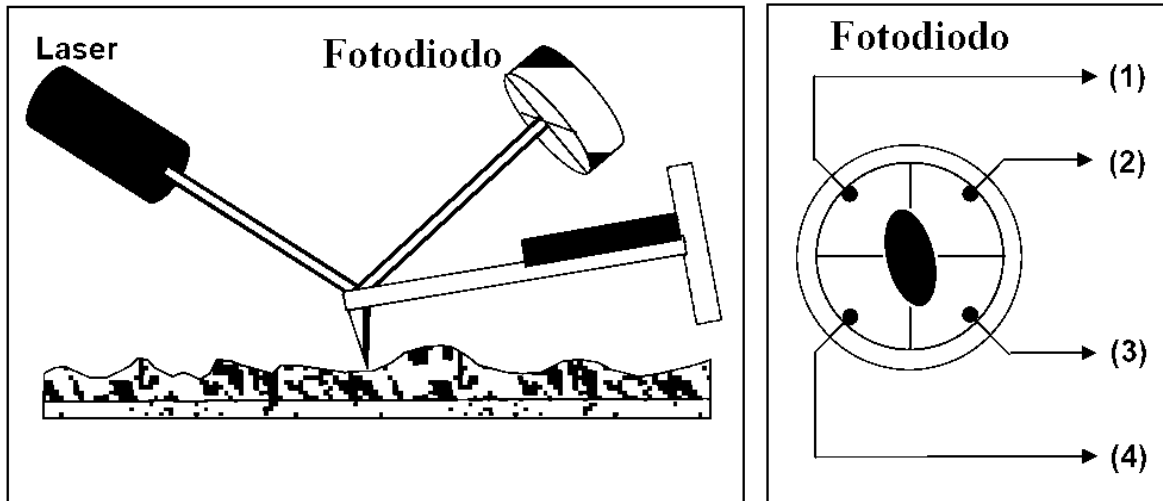


Figura 24 - Schema per rilevare le flessione della leva con metodo ottico

In generale la forza di interazione ha una componente normale alla superficie e una laterale. Il fotodiodo grazie ai quattro settori di cui è costituito può rilevare questi due tipi di forze: la flessione della leva soggetta a forza attrattiva o repulsiva (F_z) e la torsione dovuta alla componente laterale (F_L) delle interazioni punta-campione.

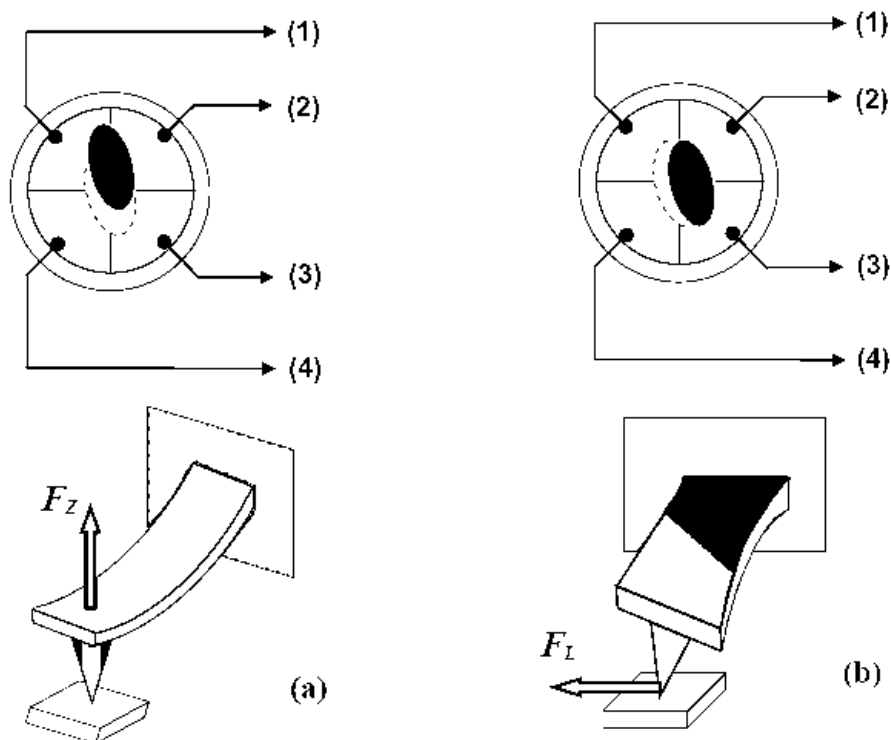


Figura 25 - Relazione tra i modi di flessione della leva (sotto) e gli spostamenti del fascio riflesso sul fotodiodo (sopra)

Il sistema può così rilevare la flessione dovuta alla forza normale alla superficie, e usarla come segnale di ingresso in un anello di retroazione che mantiene costante la flessione mediante un attuatore piezoelettrico. Questo attuatore controlla la distanza punta-campione mantenendo la flessione uguale al valore prefissato dall'operatore.

Quando si scansiona un campione nella modalità flessione costante la tensione che pilota l'elettrodo Z dello scanner viene memorizzata in una matrice i cui indici sono numeri interi proporzionali ai valori delle tensioni fornite agli elettrodi X,Y tale matrice $Z = f(x, y)$ costituisce l'immagine topografica AFM. La risoluzione laterale di tale immagine dipende, oltre che dal raggio di curvatura della punta anche dalla sensibilità del sistema di rivelazione delle flessioni della leva. I moderni AFM sono in grado di fornire risoluzione atomica. Le sonde per AFM sono di solito microscopiche leve elastiche dotate di una sottile punta all'estremità, prodotte mediante fotolitografia ed attacco chimico di strati di silicio depositati su un wafer di silicio.

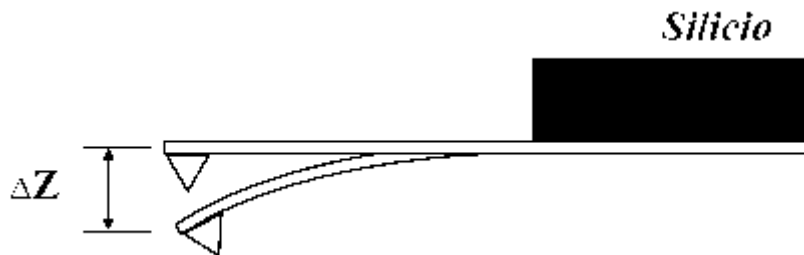


Figura 26 - Disegno schematico di una sonda per AFM

Una estremità della leva è bloccata alla base di silicio, e la punta è collocata alla estremità libera. Il raggio di curvatura dell'apice di una punta AFM è dell'ordine di $1 \div 50$ nanometri a seconda del tipo di punta e di tecnologia di produzione. L'angolo di apertura all'apice è circa $10 \div 20^\circ$. La forza F di interazione può essere stimata tramite la legge di Hooke:

$$F = k \cdot \Delta Z$$

Il valore di k varia nell'intervallo $10^{-3} \div 10$ N/m a seconda del materiale e della geometria della leva. La frequenza di risonanza è un parametro importante nell'uso di AFM con leva oscillante. Le frequenze dei modi normali di oscillazione di una leva sono dati dalla seguente relazione:

$$\omega_i = \frac{\lambda_i}{l^2} \sqrt{\frac{EJ}{\rho S}}$$

Le frequenze giacciono di solito nell'intervallo 10-1000 kHz.

I metodi usati in AFM per acquisire immagini si possono suddividere in due grandi gruppi: i modi in contatto e i modi in semi-contatto.

Nelle modalità del primo gruppo la punta resta in contatto diretto con la superficie e la forza (attrattiva o repulsiva) che agisce tra gli atomi della punta e del campione è bilanciata dalla forza elastica generata dalla flessione della leva. Le leve che si usano in contact-mode hanno costante elastica relativamente piccola, il che offre maggiore sensibilità e riduce il rischio di eccessiva interazione tra punta e campione. La modalità in contatto può essere eseguita sia a forza costante che a distanza media costante (tra punta e campione). Durante una scansione a forza costante il sistema di retroazione garantisce una flessione costante della leva e di conseguenza una forza di interazione. In questa situazione la tensione applicata dal sistema di retroazione all'elettrodo Z dello scanner risulta proporzionale in ogni punto della superficie alla quota topografica. Una scansione che mantiene costante la distanza media tra punta e campione ($Z = cost$) si può usare con campioni la cui rugosità è molto piccola (pochi Angstrom). In questa modalità (detta anche ad altezza costante) la sonda, praticamente in assenza di retroazione, si muove ad una distanza dal campione Z_{av} che è circa costante e sono i valori ΔZ della flessione della leva, proporzionali alla forza di interazione, che vengono registrati punto per punto. L'immagine AFM in questo caso descrive la distribuzione spaziale della forza di interazione.

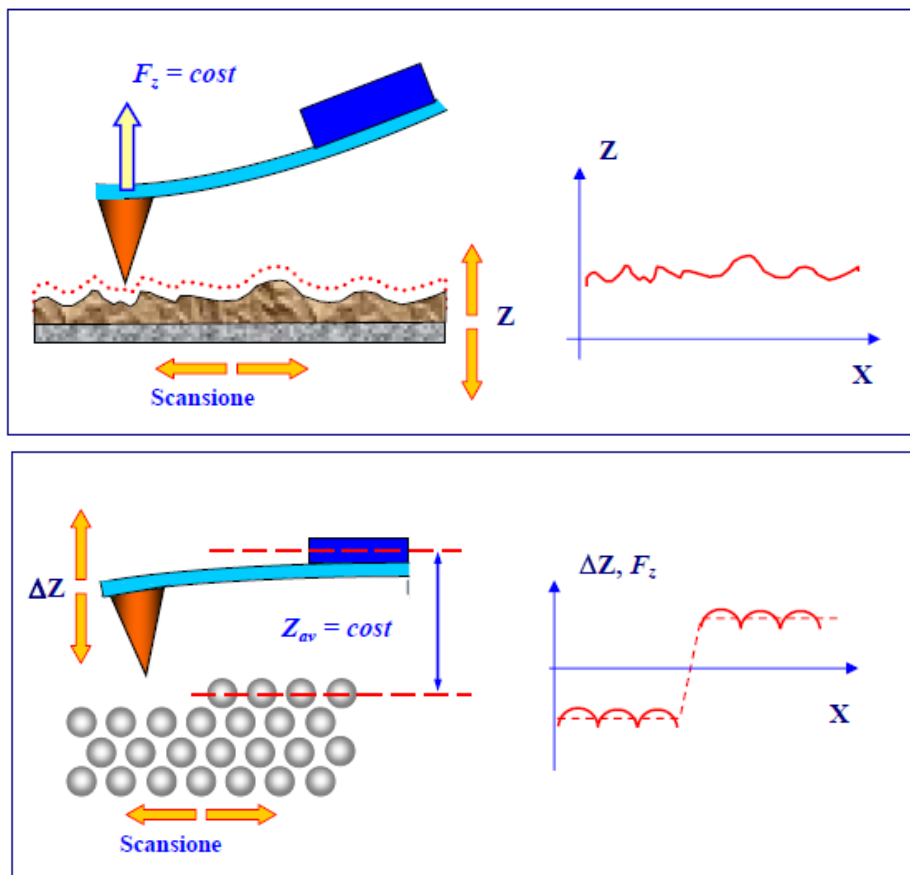


Figura 27 – In alto una immagine AFM acquisita con forza costante, in basso acquisita a distanza media costante

Uno svantaggio dei modi in contatto è l'interazione meccanica diretta tra punta e campione, che spesso produce il danneggiamento della punta o della superficie del campione. Si tratta quindi di tecniche non adatte a studiare campioni soffici quali sono ad esempio i materiali organici o biologici.

Nella modalità in semi-contatto le oscillazioni forzate della leva vengono eccitate in prossimità della frequenza di risonanza con grande ampiezza (circa 10–100 nanometri). La leva in prossimità della superficie, durante la semioscillazione inferiore entra in contatto con la superficie del campione (ovvero entra nella regione delle forze repulsive come mostrato in Figura 28).

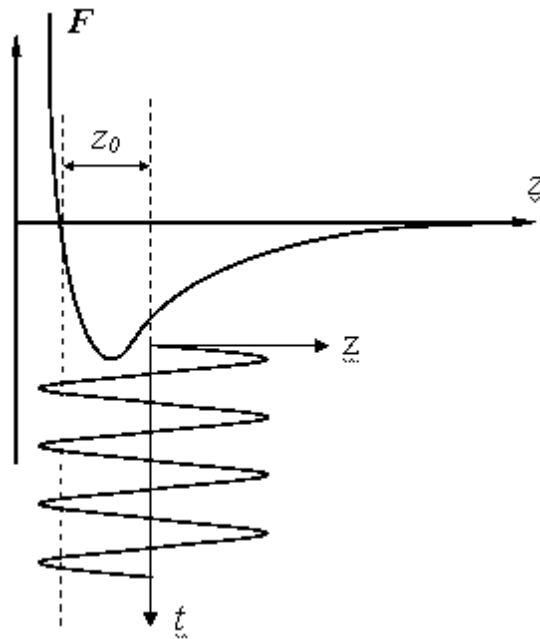


Figura 28 - Diagramma schematico di oscillazioni in modalità di "semi-contatto"

L'acquisizione delle immagini AFM nella modalità "semi-contatto" avviene come segue. Il piezovibratore eccita la leva alla frequenza ω (prossima ad una risonanza) con ampiezza A_ω . Durante la scansione la retroazione mantiene costante l'ampiezza di oscillazione al valore A_0 , impostato dall'operatore ($A_0 < A_\omega$). La tensione fornita dall'anello di retroazione all'elettrodo Z dello scanner viene memorizzata come immagine topografica [17].

2.3. Microscopia a scansione (SEM)

Il microscopio elettronico è stato inventato dai tedeschi Ernst Ruska e Max Knoll nel 1931. Il microscopio elettronico utilizza un fascio di elettroni e non di fotoni, come un microscopio ottico, in quanto i fotoni che compongono un raggio di luce possiedono una lunghezza d'onda molto maggiore rispetto a quella degli elettroni. Dato che il potere di risoluzione di un microscopio è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda della

radiazione che esso utilizza, usando un fascio di elettroni è possibile raggiungere una risoluzione di parecchi ordini di grandezza superiore. Il potere di risoluzione di un normale microscopio elettronico SEM a catodo di tungsteno si aggira intorno ai 5 nm, ma i nuovi modelli arrivano a 1 nm.

Quando un fascio di elettroni con energia di alcune decine di keV colpisce la superficie di un materiale si ha un'eccitazione degli elettroni del materiale e può dar luogo ad emissioni di vario tipo:

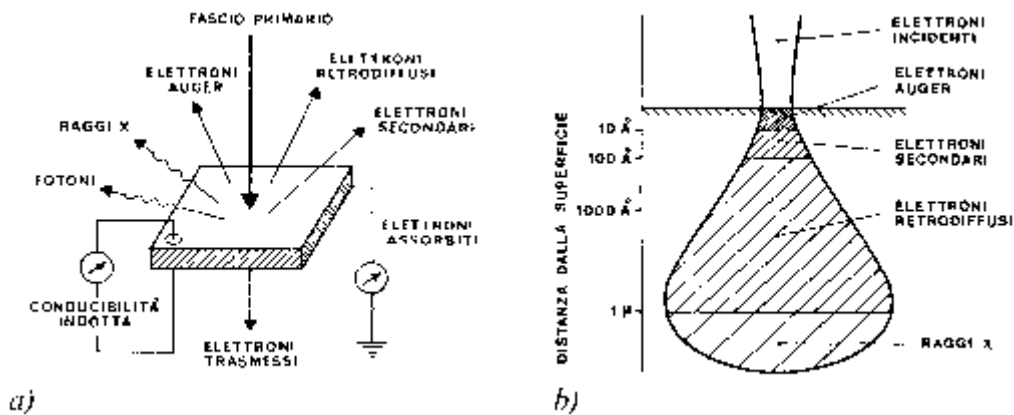


Figura 29 - a) interazione di un fascio di elettroni con un solido e conseguenti emissioni
 b) volumi di emissione delle varie radiazioni

- **Elettroni retrodiffusi:** quando parte degli elettroni incidenti viene riflessa, subisce delle deviazioni a causa degli urti elastici con il campo coulombiano degli atomi del campione, ma mantiene la stessa energia del fascio iniziale; il segnale arriva più intenso all'aumentare del numero atomico Z ; l'emissione proviene da circa 0,1-1 μm di profondità dalla superficie e dà informazioni principalmente di composizione, oltre che morfologiche.
- **Elettroni secondari:** quando gli elettroni del fascio primario non riflessi perdono la loro energia trasferendola agli elettroni del solido, parte di questi ultimi sfuggirà verso l'esterno; il segnale non dipende da Z ; l'emissione proviene da 1-10 nm e dà esclusivamente informazioni morfologiche.
- **Elettroni Auger:** quando gli elettroni incidenti hanno energia sufficiente per ionizzare i livelli energetici più interni degli atomi del materiale, questi possono emettere un elettrone.
- **Elettroni trasmessi:** è possibile solo se il campione è molto sottile, per rilevarli si utilizza il microscopio elettronico in trasmissione (TEM).

- **Raggi X:** un elettrone del fascio primario può interagire con la struttura atomica del campione ionizzandola e scalzando un elettrone dagli orbitali più interni, la struttura così eccitata si rilassa tornando al suo stato fondamentale tramite l'emissione di un fotone X ; il segnale proviene da profondità molto elevate (1-10 μm) e dà informazioni riguardanti la composizione del campione.

Il microscopio elettronico a scansione consente un ingrandimento massimo di 100.000 ingrandimenti, ha la particolarità di lavorare in una camera ad alto vuoto (circa 10^{-5} torr) poiché l'aria impedirebbe la formazione del fascio, ed è in grado di determinare la composizione chimica della zona esaminata. Si utilizza in questo caso una sorgente termoionica di elettroni con energia del fascio variabile tra 5-30 kV. A seconda dei rivelatori affiancati alla colonna vengono captati principalmente i segnali di: elettroni secondari, elettroni retrodiffusi e radiazioni X.

I campioni da osservare al SEM devono necessariamente essere conduttivi, in modo da evitare un eventuale accumulo di carica elettrica sul campione stesso; i materiali che non presentano tale caratteristica vengono resi conduttivi mediante deposizione di un sottile strato metallico conduttivo.

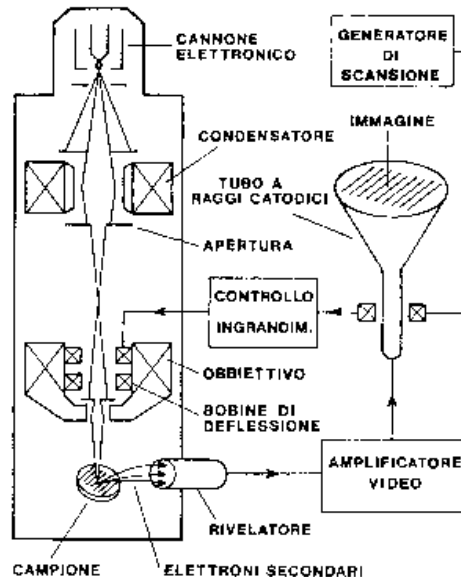


Figura 30 - Schema di un tipico microscopio elettronico a scansione

Il funzionamento del SEM è mostrato schematicamente in Figura 30. All'interno del cannone elettronico un fascio di elettroni viene emesso per effetto termoionico da un filamento (generalmente di tungsteno) e accelerato dal campo elettrico esistente tra catodo (filamento stesso, mantenuto ad elevato potenziale negativo) e anodo, collegato a massa. Uscendo dal cannone elettronico il fascio ha un diametro di circa 50 μm , subisce poi una

prima riduzione ad opera dei condensatori; l'obiettivo effettua la riduzione finale del fascio (circa 50-100 Å) e lo focalizza sul campione. Le due coppie di bobine di deflessione presenti nell'obiettivo fanno muovere il fascio secondo linee parallele successive, facendogli così esplorare una determinata zona del campione, proprio per questo motivo il fascio a questo punto può essere definito "pennello elettronico". I segnali emessi dal campione vengono quindi captati da un rivelatore, amplificati e rappresentati sullo schermo. Il risultato è un'immagine in bianco e nero che ha caratteristiche simili a quelle di una normale immagine fotografica. Per questa ragione le immagini SEM sono immediatamente intelligibili ed intuitive da comprendere.

A seconda del sistema di rilevazione associato al SEM si possono captare i diversi segnali emessi dal campione. Il metodo più comune per analizzare le emissioni di elettroni secondari consiste nell'utilizzo della gabbia di Faraday, posizionata lateralmente al campione e schematizzata in Figura 31.

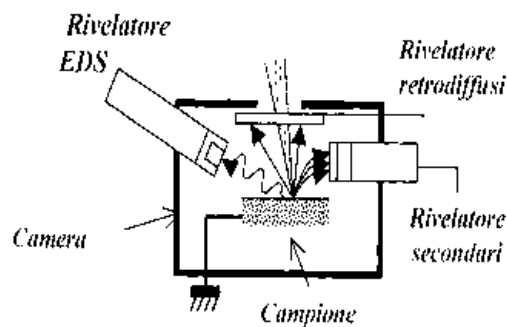


Figura 31 – Rappresentazione schematica dei sensori all'interno di una camera SEM

Tale rivelatore è polarizzato a 200 V rispetto al campione, e proprio grazie a questa differenza di potenziale gli elettroni sono attratti e successivamente accelerati da uno scintillatore, che trasforma il flusso elettronico in radiazione luminosa. Questi ultimi, attraverso una guida di luce, vengono indirizzati ad un fotocatodo presente all'ingresso di un fotomoltiplicatore, alla cui uscita il segnale elettrico prodotto viene modulato in segnale televisivo. Il rivelatore per elettroni secondari è posto lateralmente rispetto alla superficie del campione, e questa posizione conferisce alle immagini risultanti il tipico aspetto tridimensionale.

Il rivelatore per elettroni retrodiffusi (back scattered) è forato e in posizione coassiale con il foro della lente obiettivo, al di sopra della regione di osservazione, dove il numero di elettroni retrodiffusi emessi per ogni elettrone incidente è massimo [18].

Capitolo 3

STAMPO E INSERTI

Dalla ricerca effettuata risulta chiara l'influenza sulla crescita cellulare di pillars micro e nano metrici presenti nel substrato a contatto con le cellule. In questo lavoro si vuole in primo luogo studiare l'influenza di questo tipo di pattern superficiali. È necessario quindi definire le dimensioni dei pillars e la geometria del supporto di crescita delle MSC.

3.1. Progettazione del supporto di crescita

La crescita cellulare sarà effettuata su delle piastre in polistirene studiate per la crescita cellulare, queste dispongono di 96 pozzetti sulle quali è possibile alloggiare il supporto che presenta sulla superficie i micro pillars. Il diametro dei pozzetti è di 6.35 mm per una profondità di 10.76 mm. Quindi è stato scelto di realizzare dei dischi di diametro 5.9 mm e altezza 2 mm, in maniera tale da assicurare un facile inserimento nei pozzetti di crescita.

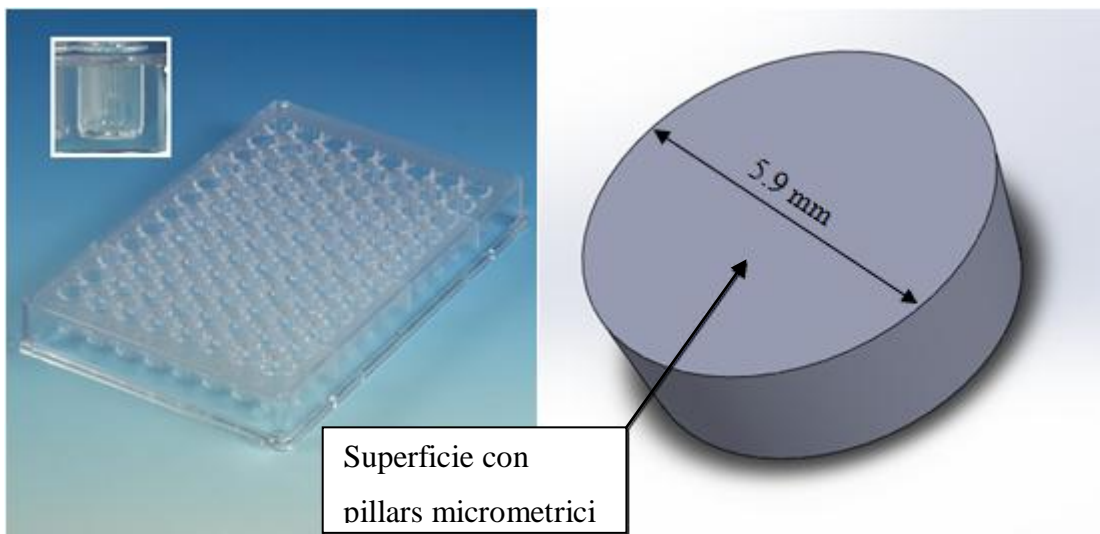


Figura 32 - Piastra per la crescita e il supporto

Il materiale scelto per la realizzazione di questi supporti è polistirene, in quanto è un materiale molto semplice da processare, economico, ed è biocompatibile [8]. Si ottiene per polimerizzazione a catena radicalica che porta all'ottenimento di una struttura per lo più amorfa e atattica. A causa della presenza dell'anello benzenico che irrigidisce la catena, è praticamente esente da ritiri e deformazioni nello stampo, ma molto fragile e duro e scarsamente resistente all'impatto. Una delle sue caratteristiche predominanti è la chiarezza e trasparenza, la sua praticamente nulla igroscopicità, ma è facilmente solubile in solventi aromatici e clorurati. La sua temperatura di transizione vetrosa T_g è intorno ai 100°C e la temperatura di fusione T_f è di 270°C .

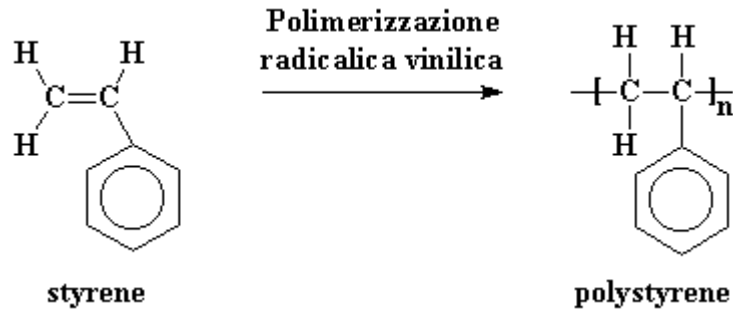


Figura 33 - Polimerizzazione del Polistirene (PS)

Nel lavoro di Kolind [6] *et al.* risulta molto influente sulla crescita cellulare il diametro e il passo tra i pillars, piuttosto che la forma del singolo pillars. Pertanto è stata scelta una geometria cilindrica dei pillars, sono stati scelti diversi diametri (\emptyset) e per ognuno di essi è stato variato la distanza tra i centri dei pillars (I = interasse). Le geometrie a disposizione sono le seguenti:

Tabella 1 - Geometrie realizzate sulla maschera

01 $\emptyset = 2\mu\text{m}$ $I = 4\mu\text{m}$	02 $\emptyset = 2\mu\text{m}$ $I = 6\mu\text{m}$	03 $\emptyset = 2\mu\text{m}$ $I = 8\mu\text{m}$
04 $\emptyset = 3\mu\text{m}$ $I = 5\mu\text{m}$	05 $\emptyset = 3\mu\text{m}$ $I = 7\mu\text{m}$	06 $\emptyset = 3\mu\text{m}$ $I = 9\mu\text{m}$
07 $\emptyset = 4\mu\text{m}$ $I = 6\mu\text{m}$	08 $\emptyset = 4\mu\text{m}$ $I = 8\mu\text{m}$	09 $\emptyset = 4\mu\text{m}$ $I = 10\mu\text{m}$

Dato che lo stampo sarà realizzato con tecniche litografiche, con queste geometrie è stata realizzata una maschera, che ha il compito di bloccare i raggi UV provenienti dalla lampada litografica. Questa maschera è stata realizzata con tecniche di deposizione di cromo su una lastra di vetro.



Figura 34 - *Maschera per fotolitografia a contatto*

È così possibile ottenere il pattern di micro pits desiderato sulla superficie dello stampo, che la plastica dovrà poi replicare ottenendo i micro pillars.

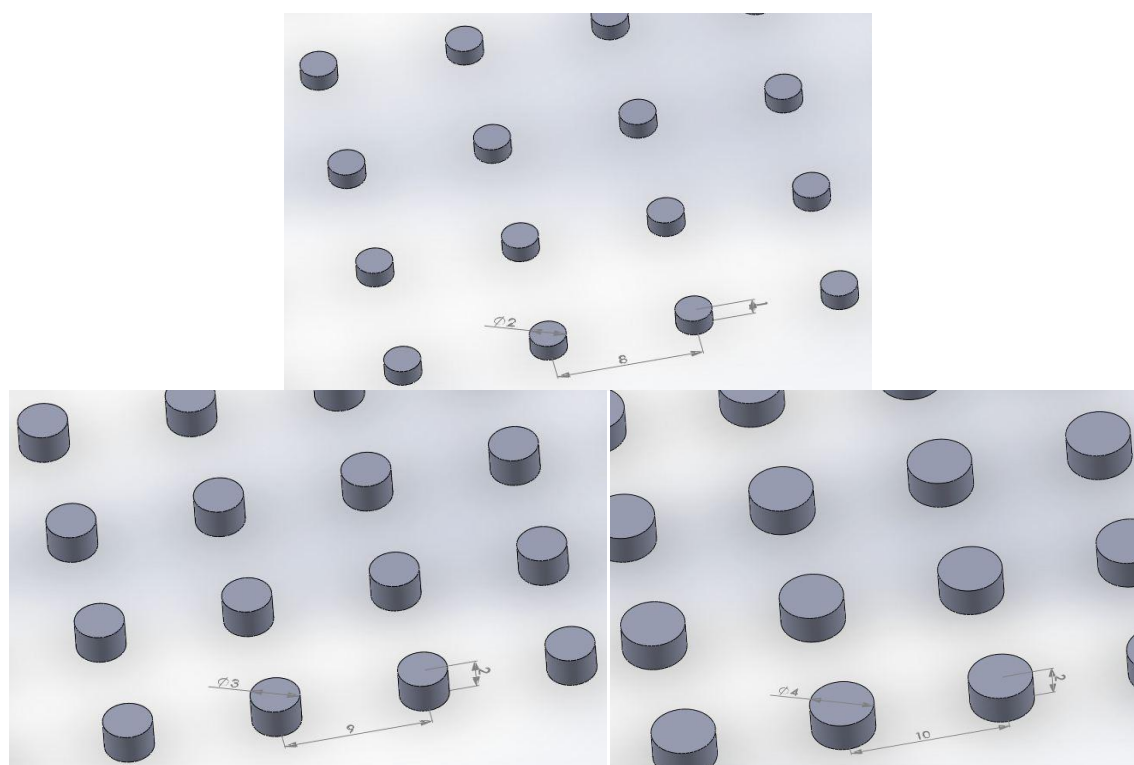


Figura 35 - *Micro pillars nelle configurazioni 03, 06 e 09 (quote espresse in μm)*

3.2. Produzione degli inserti

Per realizzare la geometria desiderata sono stati progettati e realizzati degli inserti da alloggiare nello stampo già esistente per la macchina a stampaggio a iniezione.

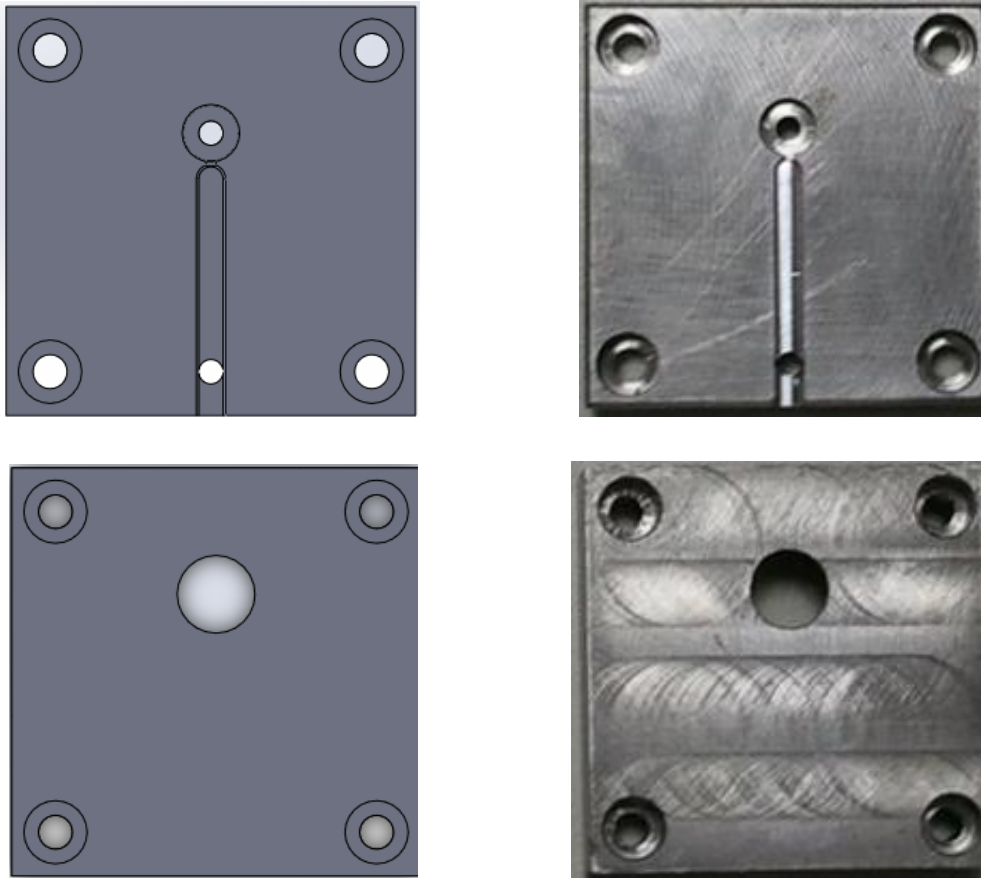


Figura 36 – Inserti

Lo stampo è composto da due piastre con due cavità sulle quali è possibile alloggiare gli inserti, nel nostro caso ne utilizzeremo solamente una. La posizione della cavità nella piastra è stata scelta per poter sfruttare gli estrattori già esistenti, ma non essendo possibile utilizzare solamente questi, è stato aggiunto un nuovo estrattore. Questo è posizionato in maniera tale da poter modificare con poche lavorazioni l'inserto in caso di problemi di mancata fuoriuscita dell'aria presente nella cavità, andando a sfruttare un altro estrattore.

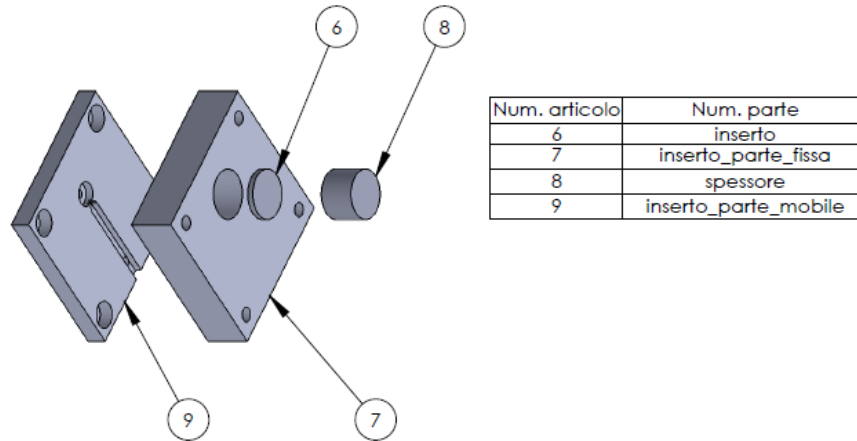


Figura 37 - Assemblaggio dell'inserto

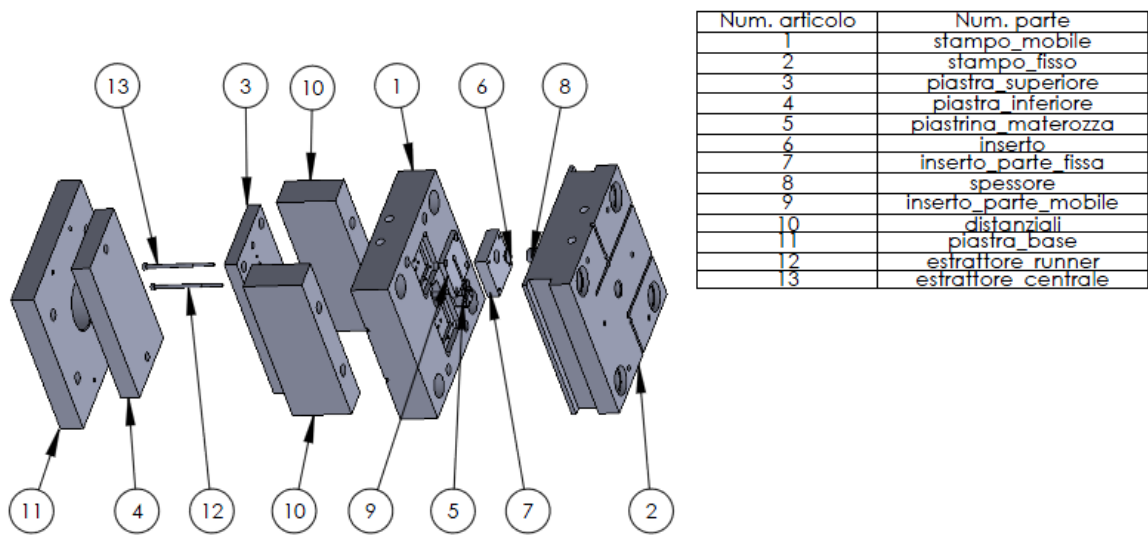


Figura 38 - Assemblaggio dello stampo

Per creare uno stampo che realizzi dei micro pillars è necessaria una superficie che disponga di micro pits, in modo che il polimero possa replicare la superficie. Utilizzando le tecniche descritte è necessaria una superficie di partenza che presenti una rugosità molto fine.

Ci sono diversi parametri per definire la rugosità di una superficie, uno di questi è la rugosità Ra. Assunto come asse x_m come linea media del profilo, questa è definita come il valore medio espresso in μm delle coordinate del profilo rispetto alla sua linea media, calcolato su una lunghezza di base L. Solitamente si effettuano rilevazioni del profilo su più lunghezze di base, la somma delle lunghezze di base rilevate si chiama lunghezza di valutazione L_n , è usuale prendere una lunghezza di valutazione pari a cinque volte la lunghezza di base.

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |y| dx$$

$$R_q = \frac{1}{L} \int_0^L |y|^2 dx$$

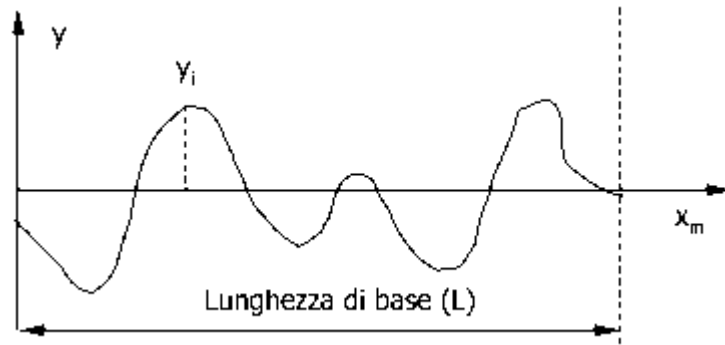


Figura 39 - Definizione di rugosità R_a e R_q

Per gli inserti il valore di R_a non deve superare i $0.050 \mu\text{m}$, pena una scarsa qualità dei micro pits. Un altro parametro per definire la rugosità superficiale è R_q . Si tratta della media quadratica degli scostamenti dei punti del profilo dalla linea media; tale parametro, essendo una media quadratica è più sensibile ai bruschi scostamenti del profilo da un andamento regolare ed è in generale maggiore rispetto al valore R_a .

La realizzazione degli inserti microforati comprende una permanenza di questi all'interno di un forno, è quindi necessario che il materiale a contatto col resist abbia delle proprietà di dilatazione termica simili a quelle del resist per evitare cricche e rotture dovute a stress termici. Per questo motivo è stato scelto l'acciaio perché presenta un coefficiente di dilatazione termica ($12 \times 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$) molto più simile a quello dei resist rispetto all'alluminio ($24 \times 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$), sebbene quest'ultimo sia più facilmente lavorabile alle macchine utensili.

3.3. Lucidatura degli inserti

Dopo diverse prove di lucidatura sugli acciai a disposizione è stato scelto il 39 Ni Cr Mo 3, si tratta di semplice acciaio da bonifica con le seguenti proprietà:

- Carico di rottura: 980 - 1180 MPa
- Durezza HB: 180 - 240

La lucidatura è stata eseguita utilizzando carte abrasive e paste diamantate:

- Carta abrasiva: grana 1000 - 1200
- Panno con pasta diamantata: 6, 3 e $1 \mu\text{m}$

Per eseguire questa operazione è necessaria una attrezzatura per la lappatura che disponga di un supporto automatico per l'applicazione della pressione sul provino, così facendo non si rischia di danneggiare la planarità delle superfici. Non avendo a disposizione tale attrezzatura, l'operazione di lucidatura è stata fatta manualmente, cioè inglobando l'inserto

in una resina acrilica per facilitare la presa date le piccole dimensioni, e cercando di mantenere una pressione quanto più possibile uniforme sul provino a contatto con la carta o il panno abrasivo.

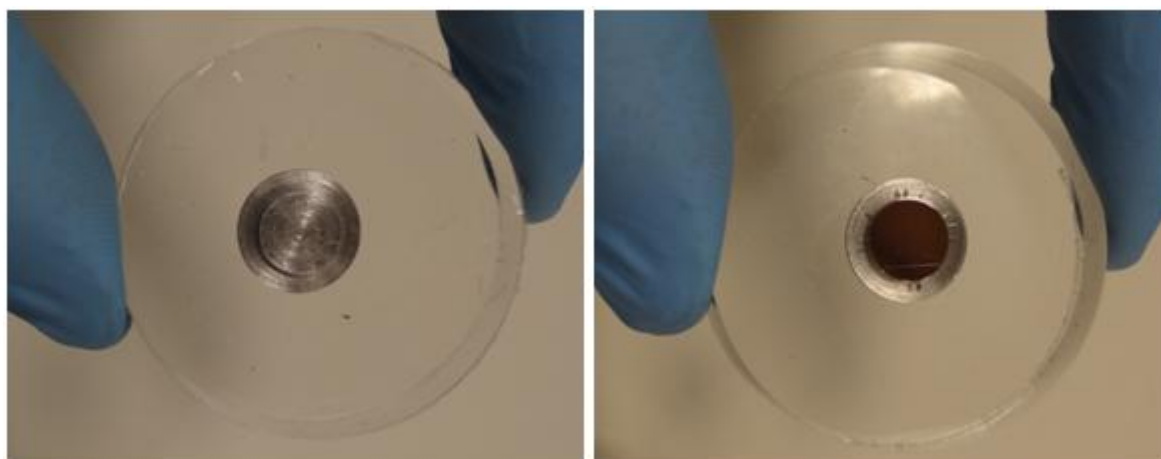


Figura 40 - Operazione di lucidatura con inserti inglobati: prima e dopo la lucidatura

È consigliato mantenere il pezzo a contatto con l'abrasivo almeno per 10 min per ogni tipo di abrasivo, in diverse posizioni e facendolo inoltre ruotare su se stesso. Gli inserti sono poi stati tolti dalla resina, puliti, numerati e misurati con il microscopio ottico confocale.

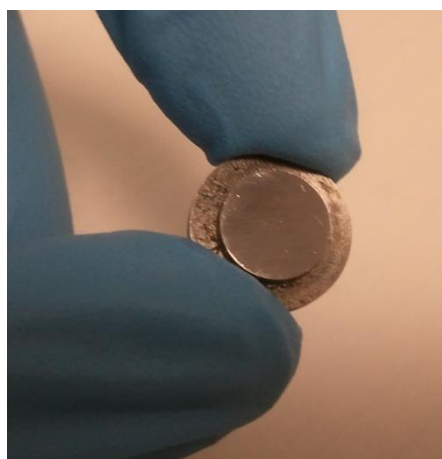


Figura 41 - Inserto lucidato

Con il microscopio ottico confocale è stata effettuata per ogni inserto una topografia superficiale di un'area pari a 0.09 mm^2 . Su ogni provino la rugosità superficiale R_a rilevata è stata inferiore ai $0.050 \text{ }\mu\text{m}$, si riporta come esempio il provino numero cinque.

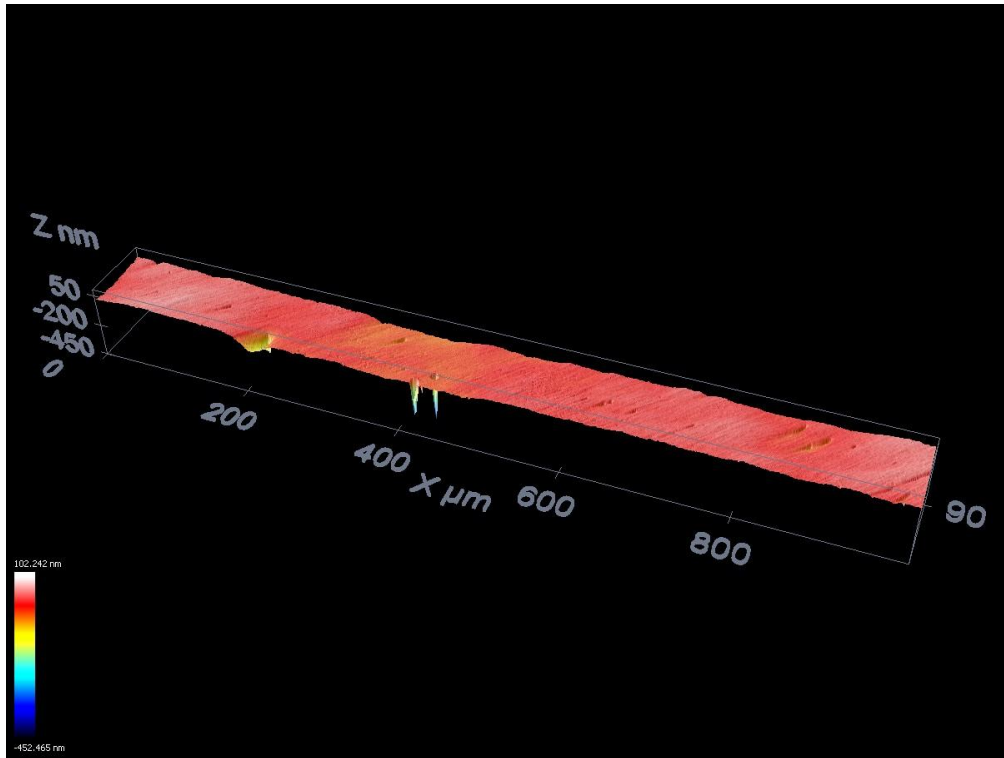


Figura 42 - Topografia della superficie lappata

Le rugosità R_a e R_q su una lunghezza di base di 1 mm, e lunghezza di valutazione di 5mm risultano pari a:

- $R_a = 0.006 \text{ }\mu\text{m}$
- $R_q = 0.008 \text{ }\mu\text{m}$

3.4. Realizzazione dei micro fori

Le lavorazioni di realizzazione dei micro pits sono state effettuate in collaborazione con Ingegneria dei Materiali di Padova, utilizzando una tecnica litografia a contatto con irradiazione UV che prevede un solo step, senza successivo attacco chimico. Questa procedura comporta un notevole risparmio di tempi e costi. Il film di resist è stato applicato sulla superficie degli inserti tramite spin – coating, ossia deposizione di una quantità in eccesso del resist sulla superficie, e applicazione di una rotazione che ha la funzione di omogeneizzare quest'ultimo sulla superficie.



Figura 43 - Spin coating del resist

La maschera è stata realizzata con tecniche di deposizione di cromo su una lastra di vetro, che presenta le geometrie riportate nel paragrafo di riferimento, e viene posta a contatto con il resist. La maschera ha il compito di non far filtrare i raggi UV in modo da ottenere il pattern desiderato.



Figura 44 - Maschera per fotolitografia a contatto

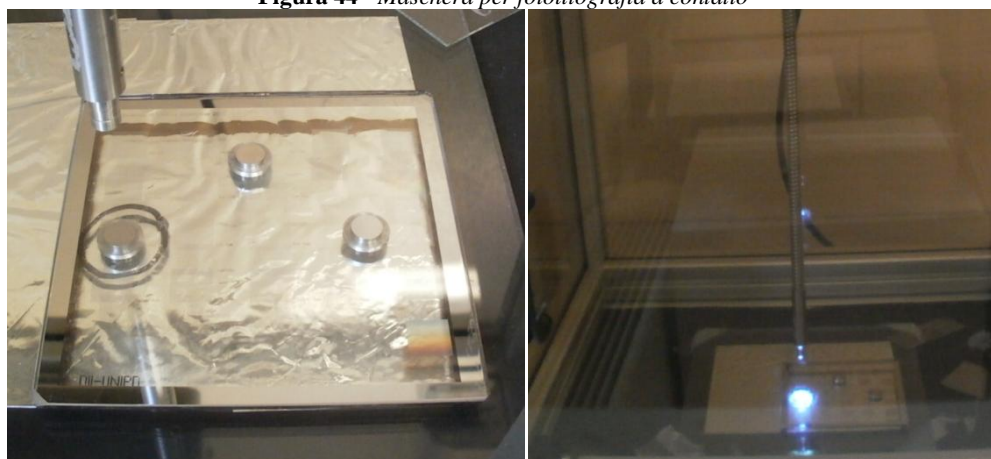


Figura 45 - Maschera a contatto col resist e irradiazione UV

Una volta eseguita la fotolitografia, il resist è stato sviluppato in una soluzione acida che ha il compito di asportare il resist nelle zone in cui non è stato reticolato dalla sorgente UV, viene poi effettuato un trattamento termico, mantenendo l'inserto ad almeno 100°C per un ora di tempo.



Figura 46 - Risultato della fotolitografia

Hybrid Sol-Gel resist

Si tratta di una nuova classe di materiali dielettrici utilizzata in applicazioni fotoniche, questi materiali combinano proprietà dei polimeri, ad esempio eccellente stampabilità, a proprietà tipiche dei materiali vetrosi, ad esempio stabilità chimica, durezza e trasparenza ai raggi UV. Molto interessante è la loro versatilità, è infatti possibile aggiustare le loro proprietà incorporando ossidi di metallo (Ge, Ti, Zr, Al, ecc.) nella matrice principale a base silicea [19].

Sono stati utilizzati due tipi di hybrid sol-gel resist, composti dai seguenti elementi:

- GGe: 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) con un anello epossidico + Germanio tetraossido (TEOG) da sviluppare in idrossido di sodio
- TMSPM-Zr: 3-metacriloxipropiltrimetoxisilano (TMSPM) + Zirconio butossido (ZrBut) da sviluppare in acetone ed etanolo.

Al fine di determinare i valori dei parametri di processo per realizzare al meglio i micro pits, sono state effettuate diverse prove, variando il numero di giri dello spin coating, la distanza e il tempo di esposizione ai raggi UV, il tipo di sviluppatore acido, il tempo e la temperatura del trattamento termico.

3.5. Ottimizzazione dei parametri

La deposizione del resist denominato TSMPPM-Zr è stata ottimizzata con i seguenti valori dei parametri di processo:

Tabella 2 - Parametri ottimizzati nella realizzazione degli inserti

Velocità di spin coating	2000-3000 rpm
Durata spin coating	30 s
Distanza lampada UV dal provino	3 cm
Tempo di esposizione ai raggi UV	10 s
UV dose	4 J/cm ²
Acido di sviluppo dei fori	Acetone:Etanolo = 1:100
Temperatura di trattamento termico	100°C
Durata trattamento termico	1 h

In ogni inserto sono state effettuate con il microscopio a forza atomica AFM tre misurazioni in tre zone differenti, nella zona che sarà posizionata in corrispondenza del gate (Side 1), al centro (Center), e nella zona più distante dal gate (Side 2), come illustrato in Figura 47.

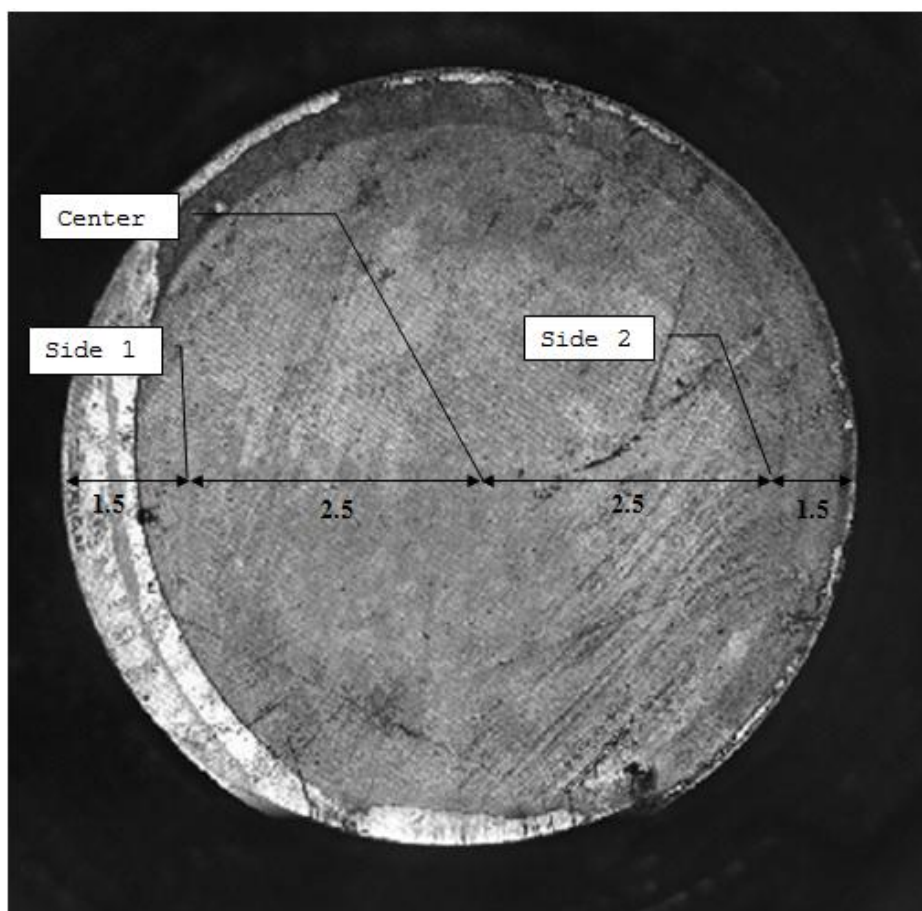


Figura 47 – Zone di misurazione degli inserti, quote espresse in mm.

In ogni zona sono stati rilevati cinque profondità dei micro pits, delle quali è stata calcolata media, deviazione standard e l'aspect ratio tra profondità e diametro, così da poter valutare l'uniformità dei micro fori.

Tutti gli inserti sono stati denominati in con un numero identificativo, proprio dell'inserto, e due numeri relativi alla geometria, il diametro e l'interasse.

Geometria Ø4 - I10

Con questa geometria sono stati realizzati due inserti, di cui si riportano le misurazioni effettuate con il microscopio a forza atomica (AFM):



Figura 48 - A sinistra il microscopio a forza atomica, a destra un immagine ingrandita del tastatore e della superficie

Tutte le misurazione sono state effettuate a contatto con un tastatore “DME DS 95-xxx DC Probe” dalle seguenti caratteristiche:

Tabella 3 - Caratteristiche del tastatore AFM

Cantilever	Length: 445 - 455 μm
	Width: 45 - 55 μm
	Thickness: 1.5 - 2.5 μm
Tip	Height: 10 - 15 μm
	Curvature radius: < 10nm
Force constant	0.07 - 0.4 N/m
Resonance frequency	9 - 17 kHz

- Insert3_4-10

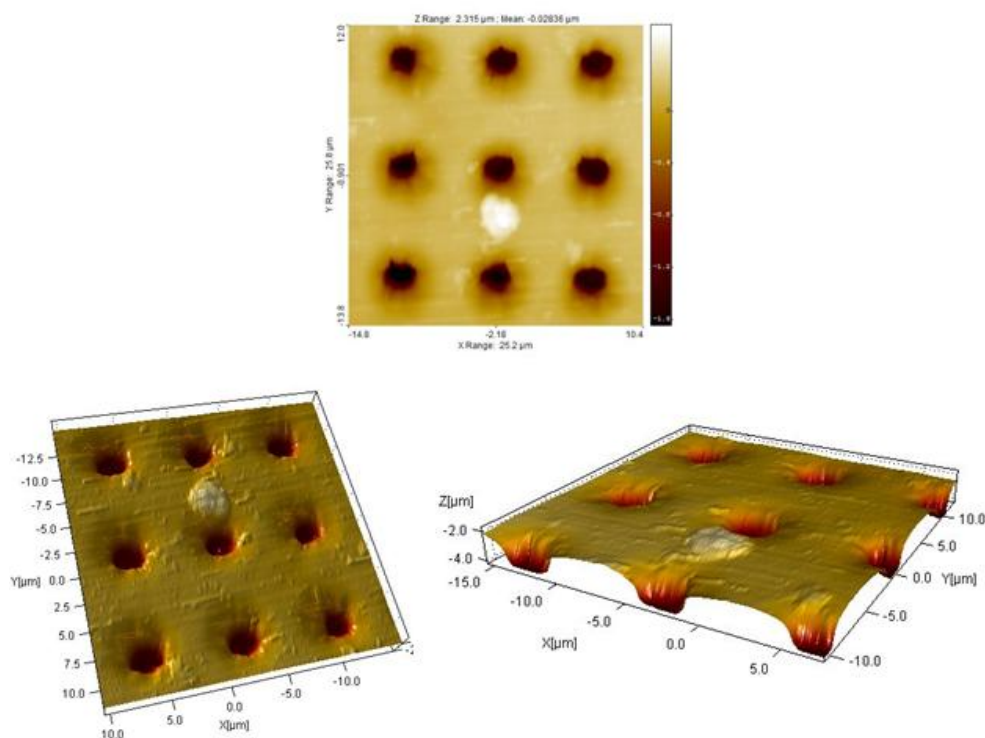


Figura 49 - Misurazione AFM, insert3_4-10

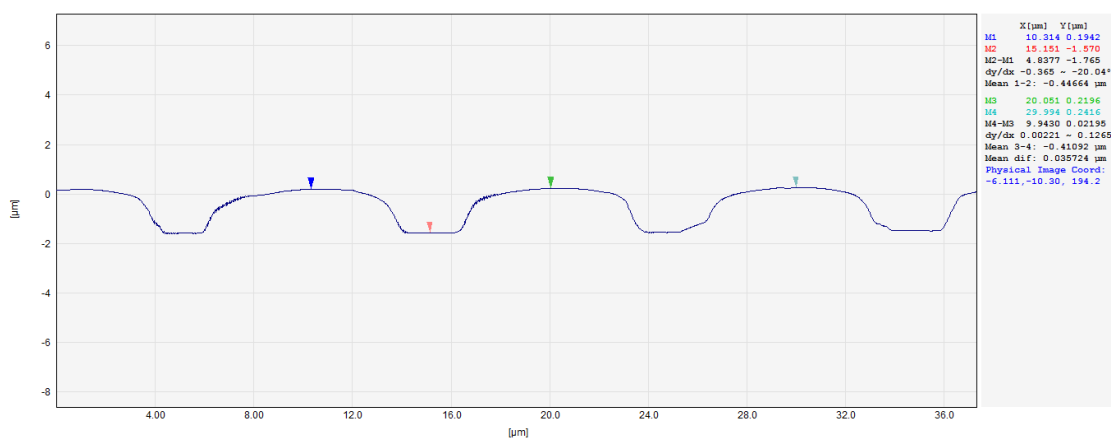


Grafico 1 - Misurazione di profondità e interasse, Insert3_4-10

Tabella 4 - Risultati delle misurazioni AFM espresse in µm, Insert3_4-10

	Side 1	Center	Side 2	Interasse
	1.792	1.800	1.701	10.031
	1.818	1.894	1.651	10.051
	1.888	1.893	1.614	10.047
	1.860	1.857	1.690	9.969
	1.853	1.834	1.691	10.215
Media	1.789±0.094			10.063±0.091
Aspect Ratio	0.477			

- Insert2_4-10

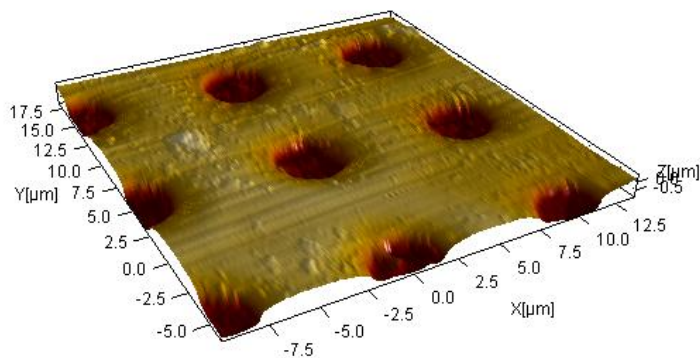


Figura 50 - Misuraione AFM, insert2_4-10

Tabella 5 - Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm , Insert2_4-10

	Side 1	Center	Side 2	Interasse
	1.081	0.973	0.963	10.074
	0.992	0.915	0.954	9.998
	0.942	0.992	0.976	9.923
	1.020	0.974	0.996	10.082
	1.032	1.013	1.027	10.023
Media	0.990±0.041			10.020±0.065
Aspect Ratio	0.248			

Geometria Ø3 – I9

- Insert3_3-9

Tabella 6 - Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm , Insert3_3-9

	Side 1	Center	Side 2	Interasse
	1.366	1.568	1.491	9.029
	1.297	1.52	1.376	9.054
	1.151	1.476	1.391	9.013
	1.134	1.5	1.357	9.064
	1.268	1.469	1.439	8.953
Media	1.387±0.129			9.023±0.044
Aspect Ratio	0.462			

- Insert7_3-9

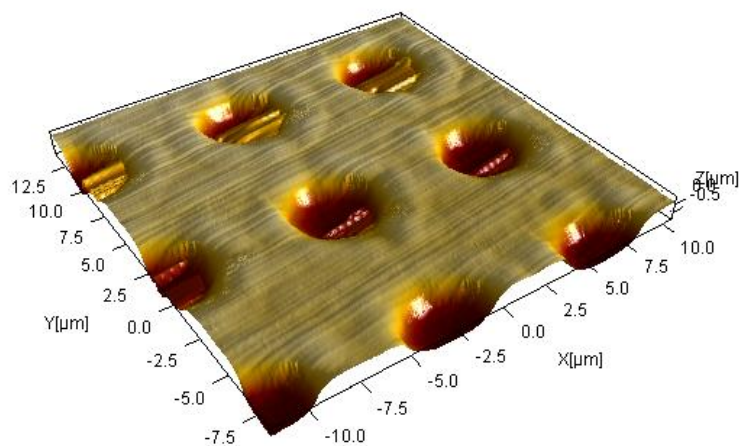


Figura 51 - Misurazione AFM, insert7_3-9

Tabella 7 - Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm , Insert7_3-9

	Side 1	Center	Side 2	Interasse
	1.508	1.518	1.525	8.954
	1.5	1.592	1.499	9.026
	1.487	1.579	1.499	9.097
	1.549	1.574	1.531	9.024
	1.491	1.506	1.518	8.96
Media	1.525±0.033			9.012±0.058
Aspect Ratio	0.508			

Geometria Ø2 – I8

- Insert1_2-8

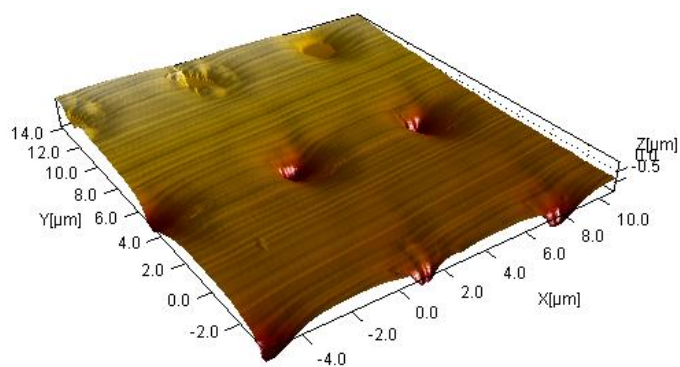


Figura 52 - Misurazione AFM, insert1_2-8

Tabella 8 - Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm , Insert1_2-8

	Side 1	Center	Side 2	Interasse
	0.836	0.828	0.969	7.921
	0.885	1.097	1.006	8.006
	1.144	0.707	0.925	7.966
	1.237	1.053	0.984	8.007
	1.195	1.103	0.945	8.049
Media	0.990 \pm 0.147			7.999 \pm 0.048
Aspect Ratio	0.495			

- Insert6_2-8

Tabella 9 - Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm , Insert1_2-8

	Side 1	Center	Side 2	Interasse
	1.01	1.078	1.041	8.095
	0.902	0.913	1.02	8.006
	1.008	0.895	0.99	7.966
	1.035	0.98	1.163	8.095
	1.087	1.07	0.885	8.049
Media	1.005 \pm 0.080			8.042 \pm 0.056
Aspect Ratio	0.502			

3.6. Considerazioni

La fotolitografia a contatto descritta in questo capitolo è una tecnica litografica molto economica, rapida e semplice da realizzare, ma è poco efficiente per quanto riguarda uniformità della lavorazione e limitata per quanto riguarda l'aspect ratio dei micro fori. Come si può notare infatti l'aspect ratio tra profondità e diametro è piuttosto basso, intorno a 0,5.

Capitolo 4

MICRO STAMPAGGIO A INIEZIONE

4.1. Simulazione del processo di iniezione

È buona norma simulare il processo di iniezione per avere a disposizione dati sulla bontà dello stampo, sui parametri di processo da impostare inizialmente sulla macchina, ma soprattutto per ottimizzare il processo. Il software di riferimento per lo stampaggio a iniezione è Autodesk Moldflow®.

La simulazione è stata effettuata senza la presenza dei pillars, perché la loro modellazione richiede risorse di calcolo molto grandi. È stato quindi modellata la cavità nel software di simulazione, in quanto sono già note tutte le geometrie, ed è stata creata una mesh di tipo “dual domain”, eseguendo poi una analisi della bontà della mesh.

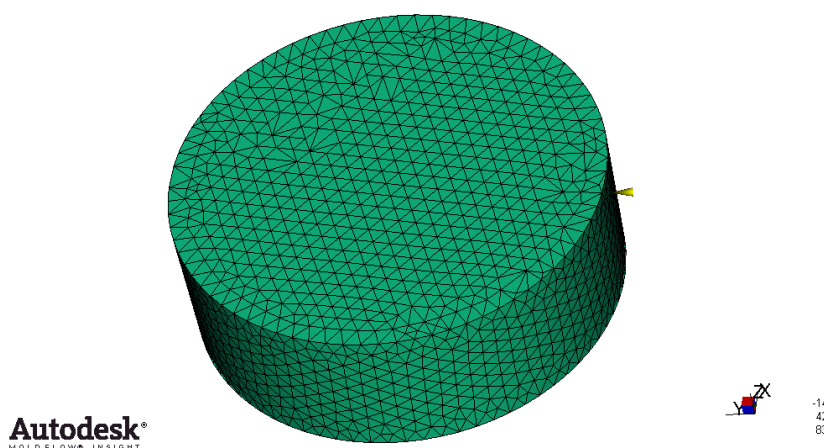


Figura 53 - Creazione della mesh

Tabella 10 - Diagnostica della mesh

Entity counts-----	
Surface triangles	3898
Nodes	1951
Connectivity regions	1
Mesh volume	0.0534 cm ³
Mesh area	0.899826 cm ²
Surface triangle aspect ratio-----	
Minimum aspect ratio	1.155
Maximum aspect ratio	6.008
Average aspect ratio	1.344

Molding window analysis

Un buon punto di partenza per ogni simulazione è l'analisi della finestra di stampaggio, con la quale si ottengono le variazioni dei principali parametri di processo che consentono di ottenere un buon componente. I dati di input di questa simulazione sono:

- Geometria
- Punto di iniezione
- Materiale: BASF Polystyrol 143 E (PS)
- Process settings: in prima battuta si possono utilizzare le condizione di default

I risultati di questa simulazione sono una serie di grafici:

Quality vs Injection Time: fornisce un grafico sulla qualità del componente in base alle variazioni dei parametri T_{melt} , T_{mold} e t_{inj} all'interno della finestra di stampaggio consigliata per il materiale scelto. Il grafico ha un punto di massimo, che corrisponde alla qualità massima del componente. È necessario scegliere un buon compromesso dei valori di T_{melt} e T_{mold} , preferibilmente intorno a valori intermedi della finestra, ma senza diminuire eccessivamente la qualità. In corrispondenza di questo punto si legge il t_{inj} .

- T_{melt} : 230°C
- T_{mold} : 50°C
- ➔ nel punto di massimo leggo il t_{inj} : 0.087 s

Pressure vs Injection time: si inseriscono i valori determinati dal grafico di qualità e si legge la pressione di iniezione.

- T_{melt} : 230°C
- T_{mold} : 50°C
- t_{inj} : 0.087 s
- ➔ leggo la pressione di iniezione P_{inj} : 0.75 MPa

Temperature at flow front vs Injection time: si inseriscono i valori determinati dal grafico di qualità, in questo modo la temperatura del fronte di avanzamento è uguale alla temperatura del fuso nel punto in cui si ha il tempo di iniezione che corrisponde alla massima qualità. Determinando sul grafico la temperatura di 10°C e 20°C inferiore alla temperatura del fuso si possono definire i limiti della finestra di stampaggio, perché questa temperatura è uno dei fattori più limitanti.

- T_{melt} : 230°C
- T_{mold} : 50°C
- t_{inj} : 0.087 s
 - ➔ leggo il t_{inj} alla temperatura del fronte di avanzamento di 220°C : 0.71 s
 - ➔ leggo la temperatura del fronte di avanzamento con $T_{melt}=210°C$: 1.49 s

Tabella 11 – Flow front temperature

Process Condition	Melt Temperature	Mold Temperature	Injection Time
Raccomandato in summary file	240° C	70°C	0.0872 s
New raccomandato basato su analisi di qualità	230°C	50°C	0.087 s
New raccomandato con 10°C di caduta di temperatura del fronte di avanzamento	230°C	50°C	0.71 s
New raccomandato con 20°C di caduta di temperatura del fronte di avanzamento	230°C	50°C	1.49 s

Cooling time vs Injection time

- T_{melt} : 230°C
- T_{mold} : 50°C
- t_{inj} : 0.087 s
 - ➔ leggo il tempo di raffreddamento: 15 s

Shear stress maximum vs Injection time: è necessario controllare che lo shear stress non superi il valore massimo sostenibile dal materiale per non rischiare di degradarlo.

- T_{melt} : 230°C
- T_{mold} : 50°C
- t_{inj} : 0.087 s
 - ➔ leggo il valore massimo di shear stress: 0.097 MPa < 0.25 MPa

Fill and pack analysis

Una volta modellato il runner è possibile utilizzare i parametri dell'analisi precedente per eseguire l'analisi di riempimento e compattazione. Lo scopo di questa analisi è verificare che

ci sia riempimento della cavità nel tempo richiesto, e che il profilo di compattazione conferisca pressioni e contrazioni costanti al componente, per far sì che questo non si deformi una volta estratto dallo stampo. I parametri di input sono:

- T_{melt} : 230°C
- T_{mold} : 50°C
- t_{inj} : 0.087 s
- Tempo di raffreddamento: 15 s
- Profilo di compattazione espresso in percentuale rispetto alla pressione di riempimento: inizialmente si sceglie un profilo di compattazione ampio e costante, che sarà poi modificato di conseguenza

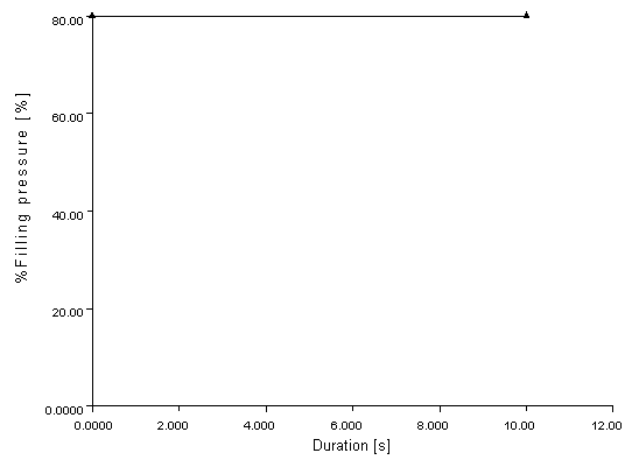


Grafico 2 - Profilo di compattazione iniziale

Analizzando i risultati si può notare che il profilo di compattazione può essere migliorato, in quanto dopo circa 3 s il gate si congela. Pertanto è possibile impostare un nuovo profilo di compattazione ed eseguire nuovamente la simulazione.

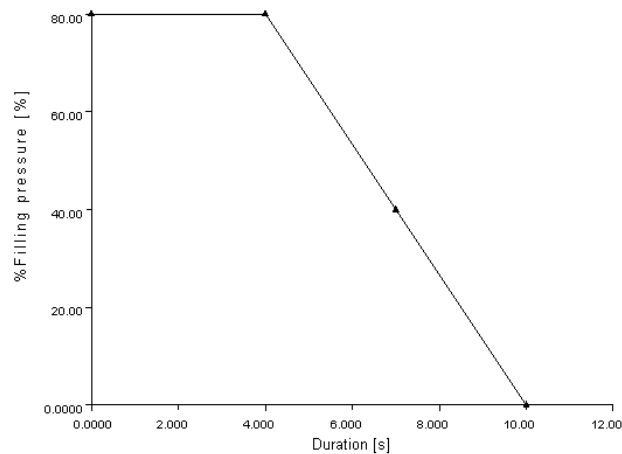


Grafico 3 - Profilo di compattazione migliorato

Come si può notare le pressioni e i ritiri volumetrici sono pressoché costanti in tutta la cavità.

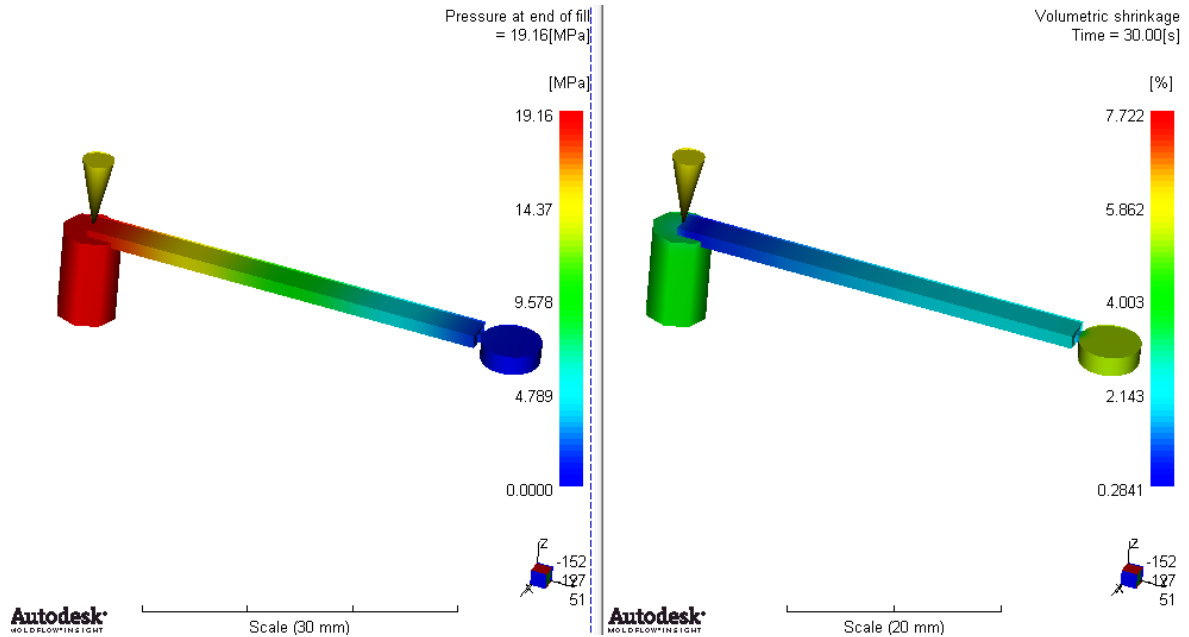


Figura 54 – Pressione e ritiri volumetrici

Cooling Analysis

Per eseguire questa analisi è necessario modellare i canali di raffreddamento e lo stampo. I dati di input sono:

- Temperatura e tipologia del liquido di raffreddamento: acqua a 25°C in moto turbolento
- T_{mold} : 50°C
- T_{melt} : 230°C
- Tempo di apertura dello stampo: 5 s
- Somma del tempo di iniezione, compattazione e raffreddamento: 30 s

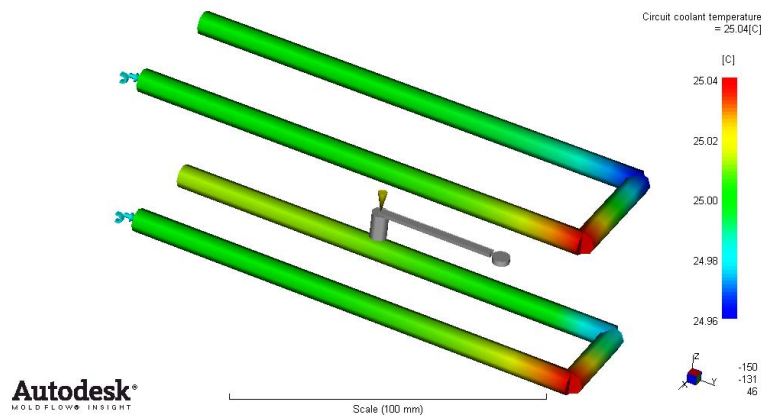


Figura 55 - Temperature nel circuito di raffreddamento

Questa analisi serve a verificare se il circuito di raffreddamento è ben dimensionato, occorre verificare che non ci sia più di un grado di differenza tra la massima e la minima temperatura del circuito.

Warpage Analysis

Questa analisi valuta le deformazioni che subisce il componente una volta estratto dallo stampo. È importante non tanto il valore assoluto delle deformazioni, ma la sua uniformità su tutto il componente, onde evitare distorsioni della geometria. C'è la possibilità di isolare le varie cause di distorsione, ciò è molto importante per capire dove intervenire nel caso queste siano importanti. Le tre maggiori cause di distorsione sono i ritiri, il raffreddamento e l'orientazione del polimero. Se le distorsioni sono inaccettabili bisogna intervenire rispettivamente su profilo di compattazione, disposizione dei canali di raffreddamento e velocità di iniezione.

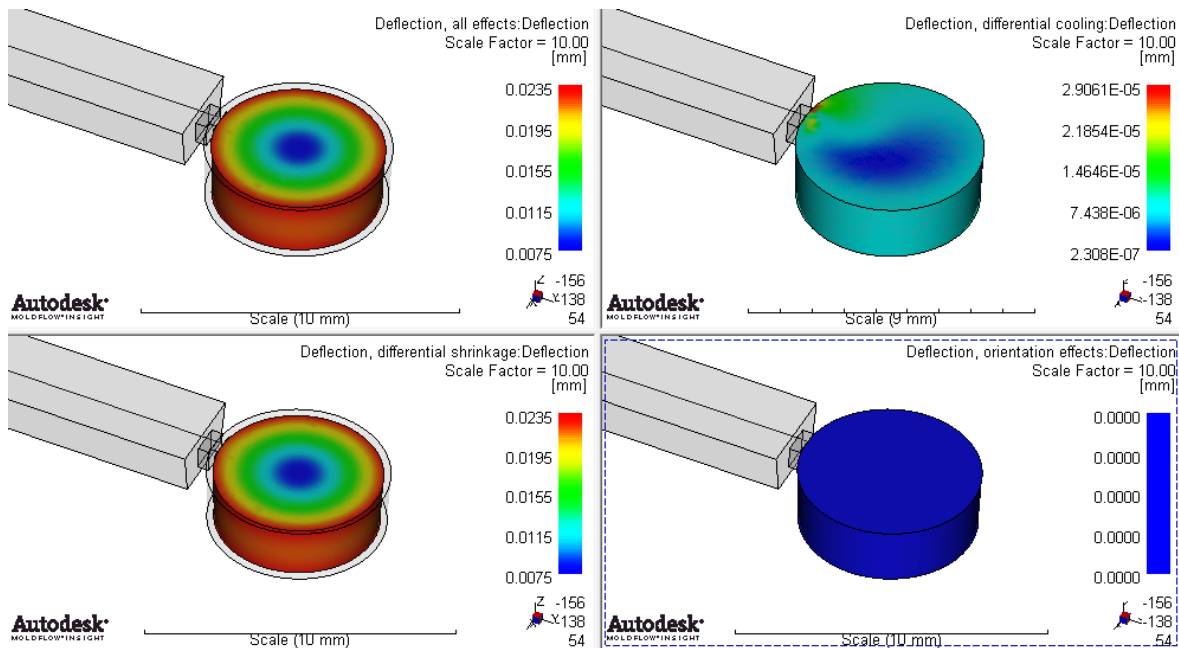


Figura 56 - Cause di deformazione del componente

Come possiamo notare le deformazioni che subisce il componente sono causate solamente dal ritiro volumetrico, ma sono uniformi in tutta la cavità, pertanto non sono necessari interventi sulle simulazioni precedenti.

Tabella 12 - Tabella dei risultati

Location	Variabile	Value
Select Material	Material Abbreviation	PS
	Material Manufacturer:	BASF
	Material Trade Name:	Polystirol 143E
	Shear stress limite:	0.25 MPa
Process Settings	Mold Temperature	50 °C
	Melt Temperature	230°C
	Injection Time	0.087 s
	Switch over	Automatic
	Pack Profile: % Filling pressure vs time	0 80 4 80 3 40 3 0
	Cooling Time	15 s
Screen Output	V/P Switchover time	0.09 s
	End of fill time	0.10 s
	End of pack time	10.09 s
	End of cooling time	30 s
	Maximum Pressure	19.06 MPa
	Pack Pressure	15.25 MPa
	Clamp force Maximun	0.17 t

4.2. Prove di stampaggio

La pressa per il microstampaggio a disposizione è la Wittman Battenfeld Micropower 15, della quale sono riassunti in Tabella 13 le principali caratteristiche:

Tabella 13 - Principali caratteristiche della Wittman Battenfeld Micropower 15

Forza di chiusura	150 kN (15 ton)
Altezza minima stampo	100 mm
Altezza massima stampo	300 mm
Diametro vite di plastificazione	14 mm
Diametro pistone di iniezione	5 mm
Velocità massima di iniezione	750 mm/s
Pressione massima di iniezione	3000 bar



Figura 57 - Wittman Battenfeld Micropower 15

Con lo scopo di verificare il corretto funzionamento dello stampo e la resistenza del resist applicato sono stati stampati alcuni pezzi di prova, utilizzando l'Insert3_4-10. Sono stati stampati 100 pezzi, e misurate le tre zone di interesse per fare un confronto con le misurazioni già effettuate prima di stampare. I parametri di macchina utilizzati sono stati scelti sulla base della simulazione e dai dati di macchina Micropower:

- Tempo di iniezione: 0.0872 s
- Volume da riempire: 476,7 mm³
- Portata volumetrica: $Q = \frac{Volume}{Tempo} = \frac{476.7}{0.0872} = 5466.7 \frac{mm^3}{s}$
- Area del pistone di iniezione: 19.635 mm²
- Velocità di iniezione del pistone: $V_{inj} = \frac{Q}{Area} = \frac{5466.7}{19.635} = 278 \frac{mm}{s}$
- Pressione di impaccamento: P_{pack} = 152 bar
- Temperatura stampo: T _{mold} = 50°C

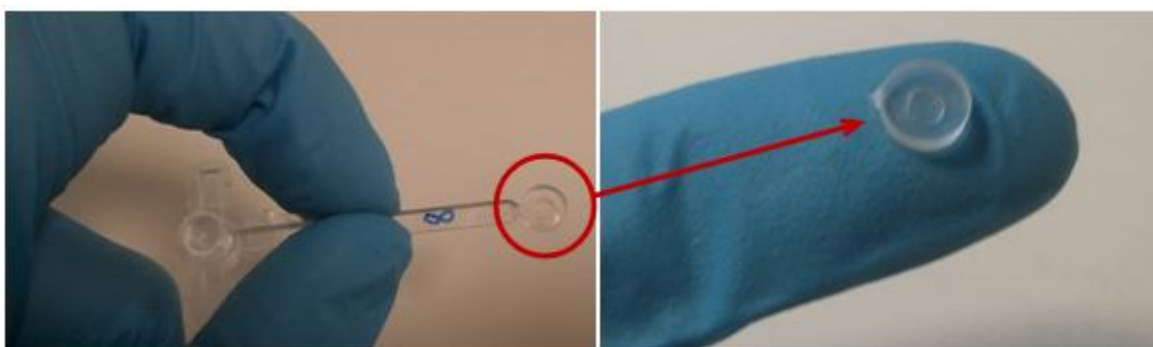


Figura 58 - Stampaggio di prova: a sinistra il componente più la materozza, a destra senza materozza

Tabella 14 - Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm , Insert3_4-10 prima di stampare

	Side 1	Center	Side 2
	1.792	1.800	1.701
	1.818	1.894	1.651
	1.888	1.893	1.614
	1.860	1.857	1.690
	1.853	1.834	1.691
Media	1.789±0.094		

Tabella 15 - Risultati delle misurazioni AFM espresse in μm , Insert3_4-10 dopo 100 pezzi stampati

	Side 1	Center	Side 2
	1.743	1.793	1.67
	1.767	1.766	1.612
	1.706	1.757	1.685
	1.617	1.787	1.669
	1.655	1.777	1.701
Media	1.714±0.061		

Come possiamo notare dai valori medi delle profondità nelle tre zone non c'è usura rilevante del resist nell'inserto.

Capitolo 5

OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI DI PROCESSO

La simulazione del processo non è un punto di arrivo, bensì è il punto di partenza dal quale ottimizzare il processo. Occorre quindi programmare degli esperimenti per determinare nella realtà le condizioni ottimali da impostare nella pressa a iniezione Micropower.

5.1. Analisi dei parametri ottimali di processo su geometria Ø4 - I10

Esistono numerosi fattori che possono influenzare la qualità di un componente realizzato per stampaggio a iniezione. Utilizzando i principi del design of experiment, sono stati effettuati i seguenti passaggi:

1. **Definire i fattori** controllabili, e non controllabili, detti anche fattori di rumore. Tipico esempio di un fattore controllabile è la temperatura del fuso, un esempio di fattore di rumore è la temperatura dell'ambiente. Non essendo possibile per questione di tempo investigare i numerosi fattori controllabili e non, ci si concentrerà su tre parametri che l'esperienza e la letteratura dicono essere determinanti nello stampaggio di micro features: la velocità di iniezione ($V_{injection}$), la pressione di compattazione (P_{pack}) e la temperatura dello stampo (T_{mold}).
2. **Scegliere la risposta.** Nel nostro caso si misurerà l'altezza dei pillars in tre zone diverse, (le stesse già misurate negli inserti) così da capire quali parametri massimizzano l'altezza dei pillars, misurata come media tra le tre zone (Altezza Media Pillars).
3. **Scegliere i livelli** per ciascun fattore. Dalla simulazione del processo di stampaggio e dai dati macchina Micropower sono stati ricavati i seguenti valori:
 - Tempo di iniezione: 0.0872 s
 - Volume da riempire: 476,7 mm³
 - Portata volumetrica: $Q = \frac{Volume}{Tempo} = \frac{476.7}{0.0872} = 5466.7 \frac{mm^3}{s}$
 - Area del pistone di iniezione: 19.635 mm²
 - Velocità di iniezione del pistone: $V_{inj} = \frac{Q}{Area} = \frac{5466.7}{19.635} = 278 \frac{mm}{s}$
 - Pressione di impaccamento: $P_{pack} = 152$ bar
 - Temperatura stampo: $T_{mold} = 50^{\circ}C$

Da questi dati è possibile fare la scelta dei livelli:

Tabella 16 - Scelta dei livelli dei fattori

Livello	V_inj [mm/s]	T_mold[°C]	P_pack [bar]
-	250	50	100
+	500	90	200

- Numero di replicazioni.** Per ciascun trattamento è necessario scegliere quante replicazioni effettuare. Per non appesantire la successiva fase di misurazione è stato scelto il numero minimo di replicazioni: due per ogni trattamento.
- Costruire il piano fattoriale.** È stato scelto un piano fattoriale 2^3 centrato con facce centrate. In questo modo è possibile valutare se è necessario utilizzare una superficie di risposta del secondo ordine.

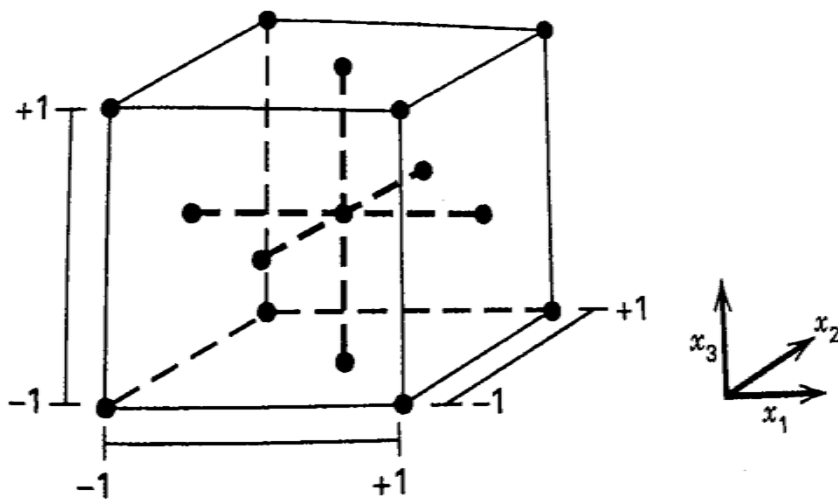


Figura 59 - Piano fattoriale composito a facce centrate

- Svolgere le prove.** Per minimizzare gli errori tempo dipendenti è necessario svolgere le prove in maniera random. Dato che variare la temperatura dello stampo è estremamente oneroso in termini di tempo le prove sono state eseguite a temperature stampo crescenti. Ad ogni cambio di temperatura sono state eseguite 20 stampe, con lo scopo di uniformare la temperatura sullo stampo, così da portare a regime il processo. Mentre ad ogni cambio di pressione e velocità sono state effettuate solamente 5 stampe. Pertanto il totale di pezzi stampati è di circa 200.

Misurazione dell'altezza dei pillars

Date le piccole dimensioni dei pillars, è necessario capire qual è lo strumento adatto a tale scopo. Pertanto è stato fatto un confronto tra quanto misurato con il microscopio a forza atomica e il microscopio ottico cofocale. Per questo confronto è stata scelta la prova numero 29, stampato con $V_{injection}=500$ mm/s, $P_{pack}=200$ bar, $T_{mold}=90^{\circ}C$, le misurazioni sono state eseguite nella zona centrale del pezzo:

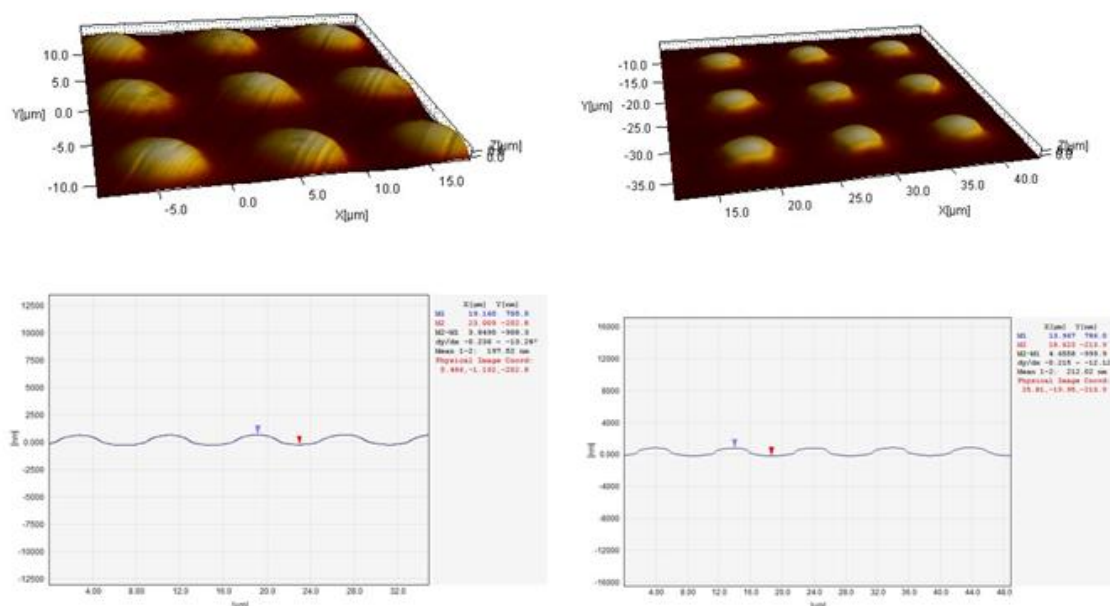


Figura 60 - A sinistra la misurazione con AFM, a destra la misurazione con microscopio cofocale

Tabella 17 - Confronto tra le misurazioni AFM e Confocali espresse in μm , geometria $\varnothing 4 - I10$

Prova numero 29	Misurazione AFM	Misurazione Confocale	
	1.04	1.026	
	0.992	0.961	
	0.993	1.041	
	1.036	1.001	
	1.02	1.004	
Media	1.016±0.023	1.007±0.030	
Differenza	0.00960	Differenza %	0.9

Dato che le misurazioni con entrambi gli strumenti sono confrontabili, tutte le misurazioni successive sui pezzi stampati e con questo tipo di geometria ($\varnothing 4 - I10$) sono state effettuate con il microscopio confocale, in quanto sono molto più semplici e rapide da eseguire. Quando si cambierà tipo di geometria sarà necessario effettuare un ulteriore controllo di sicurezza.



Figura 61 - Microscopio confocale

Tutte le replicazioni sono state misurate in corrispondenza delle tre zone misurate negli inserti. Per ogni zona sono state prese in considerazione 5 pillars, per un totale di 15 pillars per ogni replicazione. Delle quindici misurazioni è stata calcolata la media ed inserita nella Tabella 18.

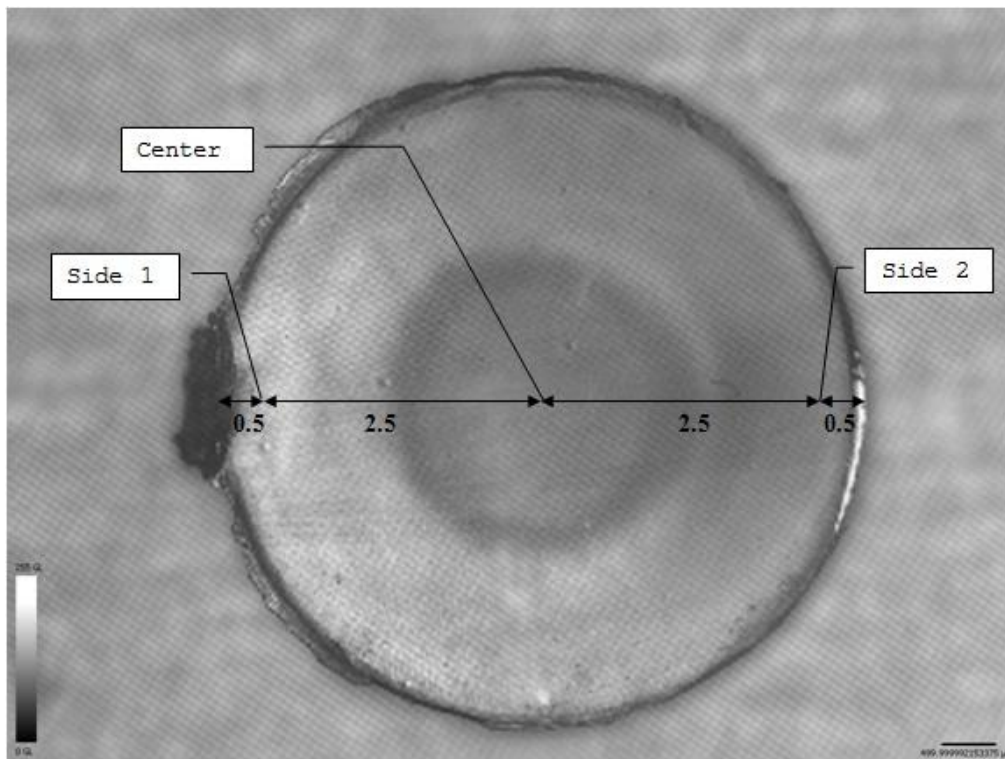


Figura 62 - Zone di misurazione nei pezzi stampati, quote espresse in mm.

Tabella 18 - Inserimento dei valori nel piano fattoriale

N°	V_inj [mm/s]	P_pack [bar]	T_mold [°C]	Altezza media pillars [µm]
1	200	100	50	0.237
2	200	100	50	0.272
3	500	100	50	0.340
4	500	100	50	0.264
5	350	150	50	0.241
6	350	150	50	0.223
7	200	200	50	0.299
8	200	200	50	0.304
9	500	200	50	0.325
10	500	200	50	0.319
11	350	100	70	0.246
12	350	100	70	0.253
13	200	150	70	0.300
14	200	150	70	0.303
15	350	150	70	0.343
16	350	150	70	0.336
17	500	150	70	0.351
18	500	150	70	0.335
19	350	200	70	0.403
20	350	200	70	0.451
21	200	100	90	0.554
22	200	100	90	0.571
23	500	100	90	0.601
24	500	100	90	0.627
25	350	150	90	0.762
26	350	150	90	0.740
27	200	200	90	0.852
28	200	200	90	0.922
29	500	200	90	1.001
30	500	200	90	0.974

5.2. Analisi del piano fattoriale

I dati sono stati elaborati con Minitab®, con il quale è possibile creare il piano fattoriale, e una volta inseriti i valori fornisce i coefficienti del modello di regressione, l'analisi della varianza e il test del lack of fit.

Analisi della risposta Altezza pillars

Estimated Regression Coefficients for Altezza pillars

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0.319720	0.009886	32.341	0.000
V_injection	0.026222	0.005816	4.508	0.000
P_pack	0.094042	0.005816	16.168	0.000
T_mold	0.238988	0.005816	41.089	0.000
V_injection*V_injection	0.007625	0.011470	0.665	0.514
P_pack*P_pack	0.023425	0.011470	2.042	0.055
T_mold*T_mold	0.176858	0.011470	15.419	0.000
V_injection*P_pack	0.002723	0.006503	0.419	0.680
V_injection*T_mold	0.010577	0.006503	1.627	0.119
P_pack*T_mold	0.078952	0.006503	12.141	0.000

Come si può notare dal p-value tutti i fattori sono significativi, il fattore più significativo è T_{mold} , seguito in ordine da P_{pack} e V_{inj} .

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	1.67739	1.67739	0.186377	275.46	0.000
Linear	3	1.33294	1.33294	0.444312	656.67	0.000
Square	3	0.24281	0.24281	0.080937	119.62	0.000
Interaction	3	0.10164	0.10164	0.033881	50.07	0.000
Residual Error	20	0.01353	0.01353	0.000677		
Lack-of-Fit	5	0.00495	0.00495	0.000989	1.73	0.189
Pure Error	15	0.00859	0.00859	0.000572		
Total	29	1.69092				

Dall'analisi della varianza possiamo dire che tutti i termini sono significativi, i fattori principali, i termini di secondo ordine, e le interazioni. Il test del lack of fit ha dato esito positivo, pertanto il modello con cui è stata approssimata la risposta è accettabile.

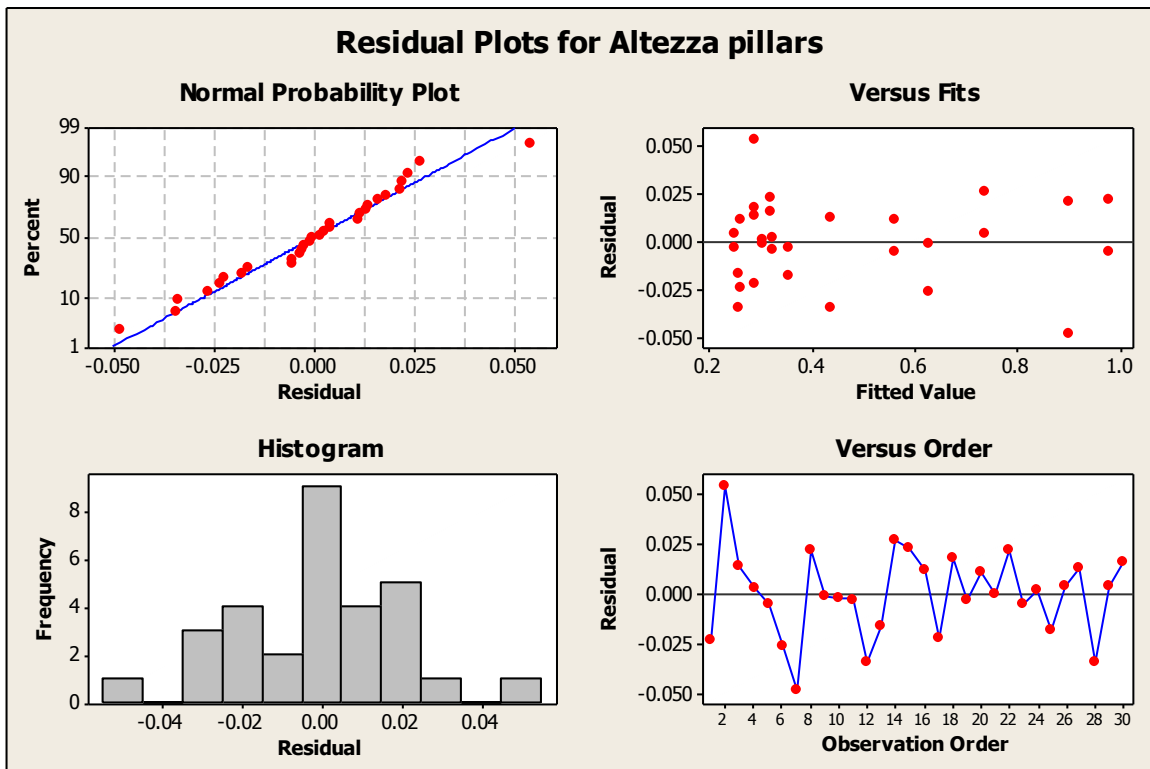


Grafico 4 - Grafici dei residui per la risposta altezza dei pillars

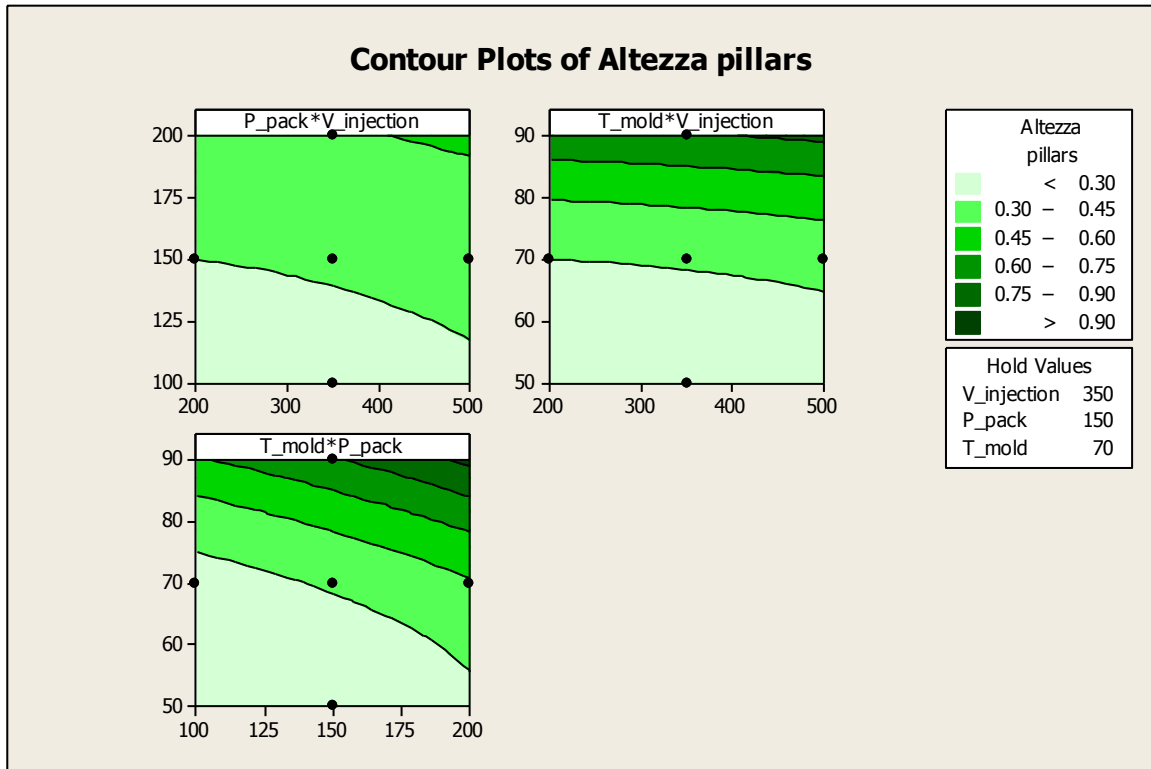


Grafico 5 - Superfici di risposta per l'altezza dei pillars

Come si può notare dalle superfici di risposta si ha maggior replicabilità delle micro features a livelli alti dei fattori. La replicabilità della micro features non è completa: nelle zone vicino al gate il polimero esita a replicare lo stampo.

Per dare un valore di confronto sulla replicabilità possiamo calcolare la differenza percentuale tra le profondità medie dei fori e le altezze medie dei pillars con la seguente formula:

$$diff\% = \frac{\bar{x}_{fori} - \bar{x}_{pillars}}{\bar{x}_{fori}} * 100$$

In cui \bar{x}_{fori} è la media delle profondità dei fori dello stampo, e $\bar{x}_{pillars}$ è la media delle altezze dei pillars a livelli alti dei fattori.

$$\bar{x}_{fori} = 1.789 \mu\text{m} \quad \bar{x}_{pillars} = 1.001 \mu\text{m}$$

$$R = \frac{1.789 - 1.001}{1.789} * 100 = 44\%$$

Ricerca della regione di ottimo

Dato che all'interno della regione studiata non vi è presenza di un punto di ottimo è consigliabile indagare ciò che accade al di fuori, andando quindi a studiare una nuova regione con un altro piano fattoriale.

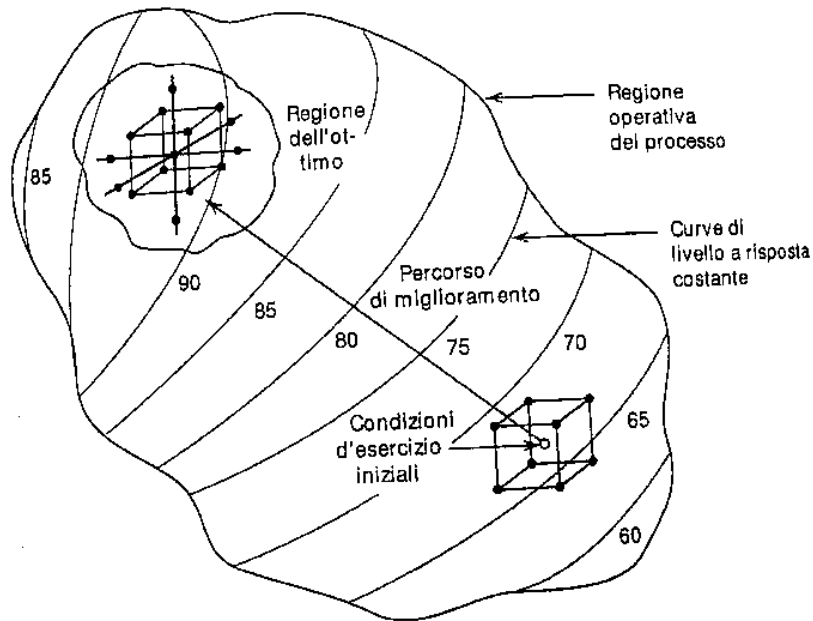


Figura 63 - Ricerca della regione dell'ottimo con i piani fattoriali

Per determinare la nuova regione da investigare bisogna determinare la direzione del miglioramento, se l'obiettivo è massimizzare la risposta occorre seguire il percorso di ascesa più rapida, mentre se l'obiettivo è minimizzare la risposta bisogna scendere il più rapidamente possibile.

Per quanto riguarda l'altezza dei pillars l'equazione della superficie di risposta è:

$$\begin{aligned}
 h = & 0.319720 + 0.02622 \cdot V_{inj} + 0.094042 \cdot P_{pack} + 0.238988 \cdot T_{mold} + \\
 & + 0.023425 \cdot P_{pack}^2 + 0.176858 \cdot T_{mold}^2 + 0.007625 \cdot V_{inj}^2 + \\
 & + 0.078952 \cdot P_{pack} \cdot T_{mold} + 0.002723 \cdot V_{inj} \cdot P_{pack} + 0.010577 \cdot V_{inj} \cdot T_{mold}
 \end{aligned}$$

Per determinare la direzione di massima pendenza è sufficiente calcolare le derivate parziali nel punto di massima pendenza, queste valgono:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial h}{\partial V_{inj}}(1,1,1) &= 0.02622 + 0.1525 \cdot V_{inj} + 0.002723 \cdot P_{pack} + 0.010577 \cdot T_{mold} = \\
 &= 0.0520
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial h}{\partial P_{pack}}(1,1,1) &= 0.094042 + 0.04685 \cdot P_{pack} + 0.078952 \cdot T_{mold} + 0.002723 \cdot V_{inj} = \\
 &= 0.223
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial h}{\partial T_{mold}}(1,1,1) &= 0.238988 + 0.353716 \cdot T_{mold} + 0.078952 \cdot P_{pack} + 0.010577 \cdot V_{inj} = \\
 &= 0.682
 \end{aligned}$$

Una retta passante per un punto (X_0, Y_0, Z_0) , nel nostro caso il punto $(1,1,1)$; e parallela alla direzione (a,b,c) , nel nostro caso $(0.0520, 0.223, 0.682)$; ha equazione:

$$\frac{X - X_0}{a} = \frac{Y - Y_0}{b} = \frac{Z - Z_0}{c} \rightarrow \frac{X - 1}{0.0520} = \frac{Y - 1}{0.223} = \frac{Z - 1}{0.682}$$

Sostanzialmente le direzioni di massima pendenza sono rappresentate dalle seguenti rette:

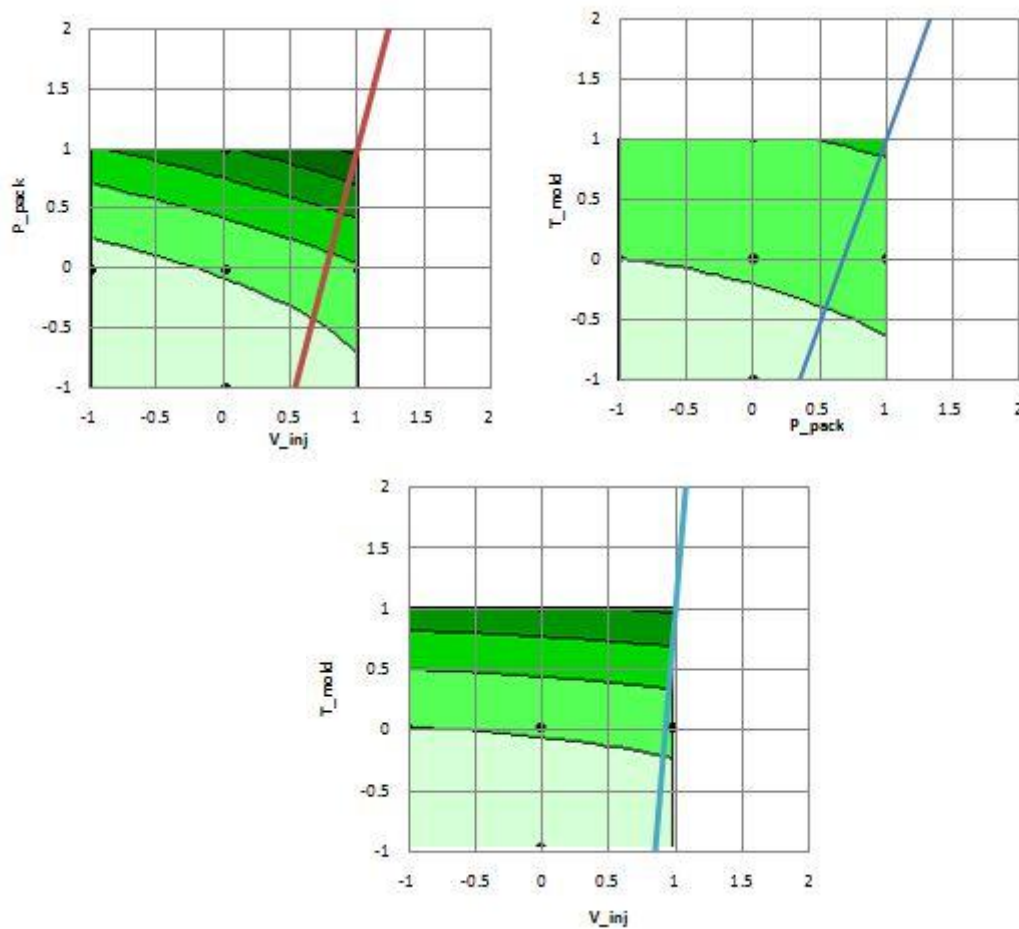


Grafico 6 - Rette di massima pendenza sovrapposte alle superfici di risposta

La temperatura stampo a livello alto è di 90°C , questo è un valore limite per il circuito ad acqua dello stampo di cui dispone la Micropower. Per poter alzare la temperatura all'interno della cavità è necessario inserire resistenze elettriche nello stampo, ma non essendo possibile realizzare questo sistema in tempi brevi, nella analisi seguente si andranno a studiare i fattori P_{pack} e V_{inj} , mantenendo il valore di T_{mold} costante e pari a 90°C , perché questo assicura riempimento di tutti i micro pits nelle tre zone.

5.3. Studio dei parametri P_{pack} e $V_{injection}$

Per studiare due fattori è sufficiente un piano fattoriale 2^2 con un punto centrale, prendendo le prove già fatte:

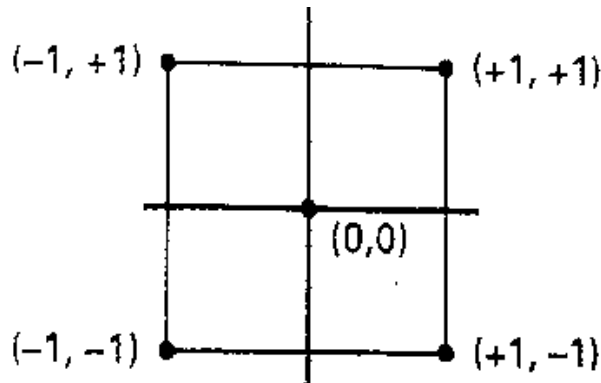


Figura 64 - Piano fattoriale 2^2 con punto centrale

Tabella 19 – Inserimento dei valori nel piano fattoriale

N°	V_inj [mm/s]	P_pack [bar]	Altezza media pillars [µm]
21	200	100	0.554
22	200	100	0.571
23	500	100	0.601
24	500	100	0.627
25	350	150	0.762
26	350	150	0.740
27	200	200	0.852
28	200	200	0.922
29	500	200	1.001
30	500	200	0.974

I risultati per la risposta altezza pillars sono i seguenti:

Estimated Effects and Coefficients for Altezza Pillars (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		0.76274	0.009434	80.85	0.000
V_injection	0.07628	0.03814	0.009434	4.04	0.010
P_pack	0.34878	0.17439	0.009434	18.49	0.000
V_injection*P_pack	0.02452	0.01226	0.009434	1.30	0.250
Ct Pt		-0.01168	0.021094	-0.55	0.604

Analysis of Variance for Altezza Pillars (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	2	0.254938	0.254938	0.127469	179.04	0.000
2-Way Interactions	1	0.001202	0.001202	0.001202	1.69	0.250
Curvature	1	0.000218	0.000218	0.000218	0.31	0.604
Residual Error	5	0.003560	0.003560	0.000712		
Pure Error	5	0.003560	0.003560	0.000712		
Total	9	0.259918				

Sia P_{pack} che V_{inj} sono significativi, e il modello utilizzato è accettabile per approssimare la risposta.

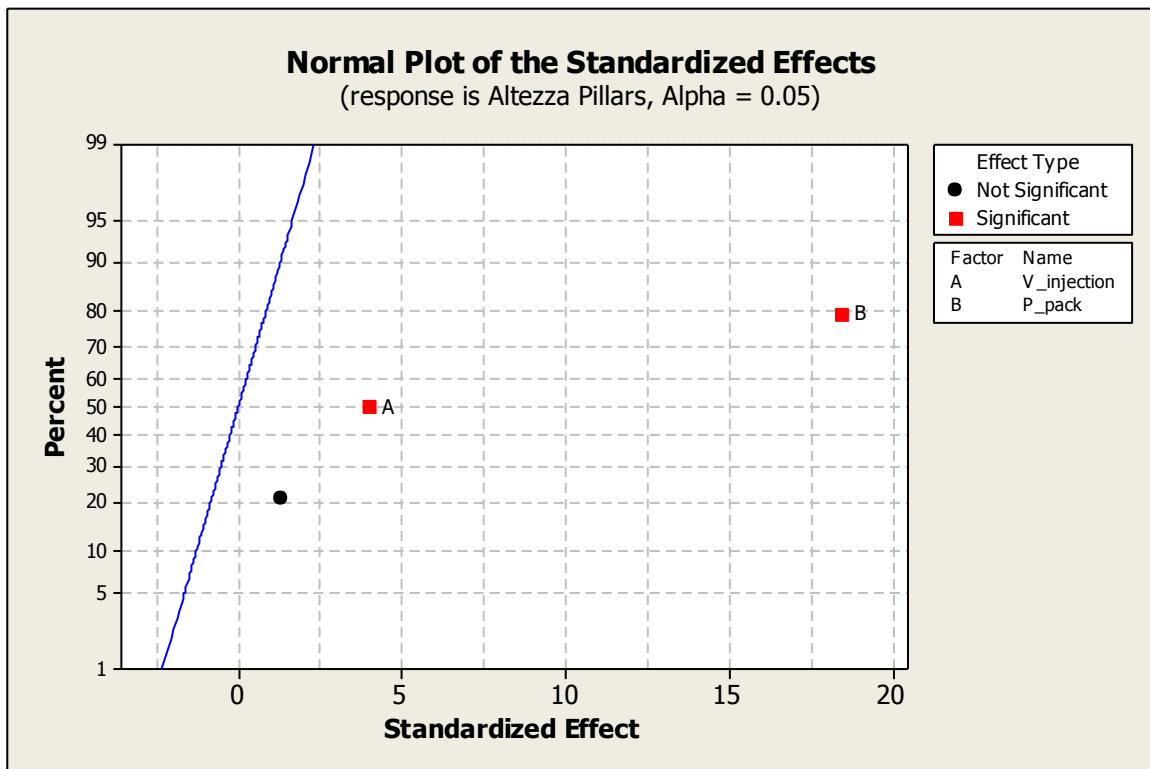


Grafico 7 - Stime degli effetti

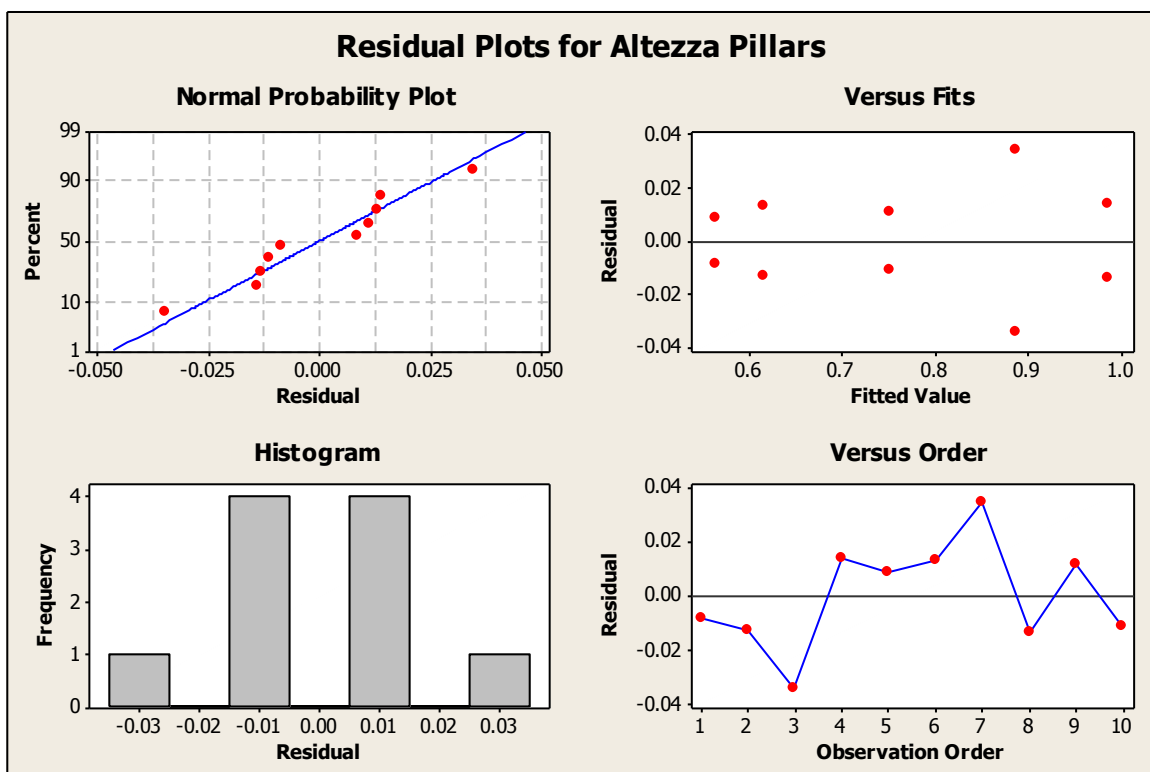


Grafico 8 - Grafici dei residui per la risposta altezza dei pillars

L'equazione della superficie di risposta è:

$$h = 0.76274 + 0.03814 \cdot V_{inj} + 0.17439 \cdot P_{pack} + 0.01226 \cdot V_{inj} \cdot P_{pack}$$

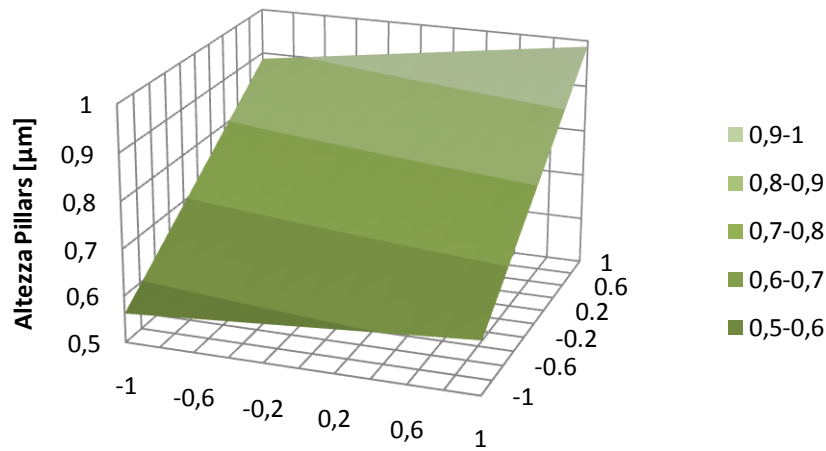


Grafico 9 - Superficie di risposta per altezza dei pillars

Per determinare la direzione di salita più rapida è sufficiente calcolare le derivate parziali nel punto $(X_0, Y_0) = (1, 1)$:

$$\frac{\partial h}{\partial V_{inj}}(1,1) = 0.03814 + 0.01226 \cdot P_{pack} = 0.0504$$

$$\frac{\partial h}{\partial P_{pack}}(1,1) = 0.17439 + 0.01226 \cdot V_{inj} = 0.1867$$

Una retta passante per un punto (X_0, Y_0) , nel nostro caso il punto $(1,1)$; e parallela alla direzione (a,b) , nel nostro caso $(0.0504, 0.1867)$; ha equazione:

$$\frac{X - 1}{0.0504} = \frac{Y - 1}{0.1867}$$

La direzione di massima pendenza è rappresentata dalla seguente retta:

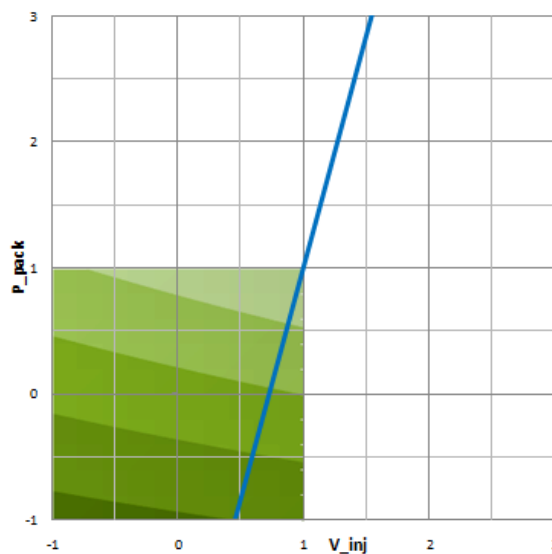


Grafico 10 - Retta di massima pendenza sovrapposta alla superficie di risposta

Dato che il limite massimo della velocità di iniezione della Micropower è di 750 mm/s, il nuovo piano fattoriale esplorerà la regione evidenziata in rosso:

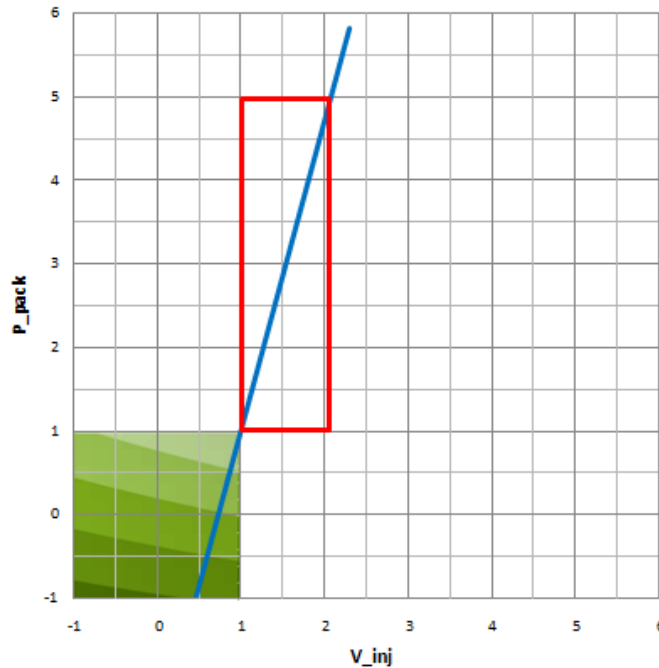


Grafico 11 – In rosso la nuova regione di esplorazione dei test

Tabella 20 - Scelta dei livelli dei fattori

Livello	V_i [mm/s]	P_i [bar]
-	500	200
+	700	400

Ed è stato creato un nuovo piano fattoriale 2^2 con un punto centrale, sono state eseguite tutte le prove e analizzati i risultati:

Tabella 21 - Nuovo piano fattoriale 2^2 con un punto centrale

N°	V_{inj} [mm/s]	P_{pack} [bar]	Altezza media pillars [μm]	Deviazione altezza pillars [μm]
1	500	200	0.971	0.332
2	500	200	0.966	0.318
3	700	200	0.966	0.218
4	700	200	1.030	0.199
5	600	300	0.986	0.386
6	600	300	1.078	0.415
7	500	400	1.094	0.428
8	500	400	1.204	0.327
9	700	400	1.237	0.442
10	700	400	1.282	0.386

Estimated Effects and Coefficients for Altezza pillars (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		1.09369	0.01830	59.77	0.000
V_injection	0.07002	0.03501	0.01830	1.91	0.114
P_pack	0.22105	0.11053	0.01830	6.04	0.002
V_injection*P_pack	0.04042	0.02021	0.01830	1.10	0.320
Ct Pt		-0.06203	0.04092	-1.52	0.190

Analysis of Variance for Altezza pillars (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	2	0.107531	0.107531	0.053765	20.07	0.004
2-Way Interactions	1	0.003267	0.003267	0.003267	1.22	0.320
Curvature	1	0.006155	0.006155	0.006155	2.30	0.190
Residual Error	5	0.013395	0.013395	0.002679		
Pure Error	5	0.013395	0.013395	0.002679		
Total	9	0.130348				

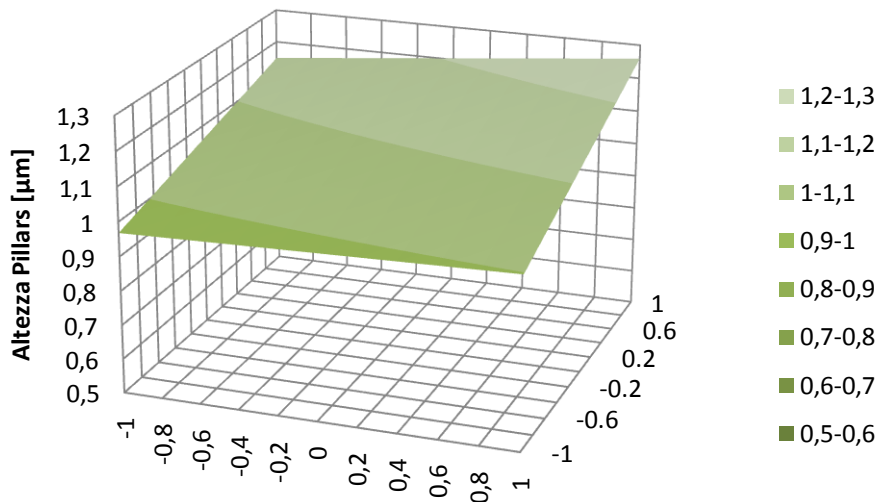


Grafico 12 - Superficie di risposta

Possiamo notare che la superficie di risposta è piuttosto piatta ma non presenta punto di massimo. Non è però possibile aumentare ulteriormente il valore di velocità di iniezione.

Pertanto i parametri ottimali di processo sono $T_{\text{mold}} = 90^\circ$ sono $P_{\text{pack}} = 400$ bar e $V_{\text{inj}} = 700$ mm/s.

Con questi valori dei parametri la differenza percentuale tra fori e pillars è di:

$$\text{diff}\% = \frac{\bar{x}_{\text{fori}} - \bar{x}_{\text{pillars}}}{\bar{x}_{\text{fori}}} * 100 = \frac{1.789 - 1.2595}{1.789} * 100 = 29\%$$

Rispetto al precedente piano fattoriale, c'è stato una diminuzione della differenza di 15 punti percentuali.

5.4. Replicazione dei micro pillars

La completa replicazione di features micrometriche è difficile da ottenere, soprattutto se queste hanno dimensioni molto ridotte e aspect ratio elevati, a causa del rapido calo di temperatura che subisce la pelle del polimero questo non riesce più a fluire nelle micro cavità. Per i materiali termoplastici amorfi (PMMA, PC, PS) la temperatura al di sotto della quale non fluisce è la temperatura di transizione vetrosa T_g , per i semicristallini è la temperatura di fusione T_m . Per ovviare a questi problemi la velocità di iniezione deve essere elevata, così come la temperatura dello stampo.

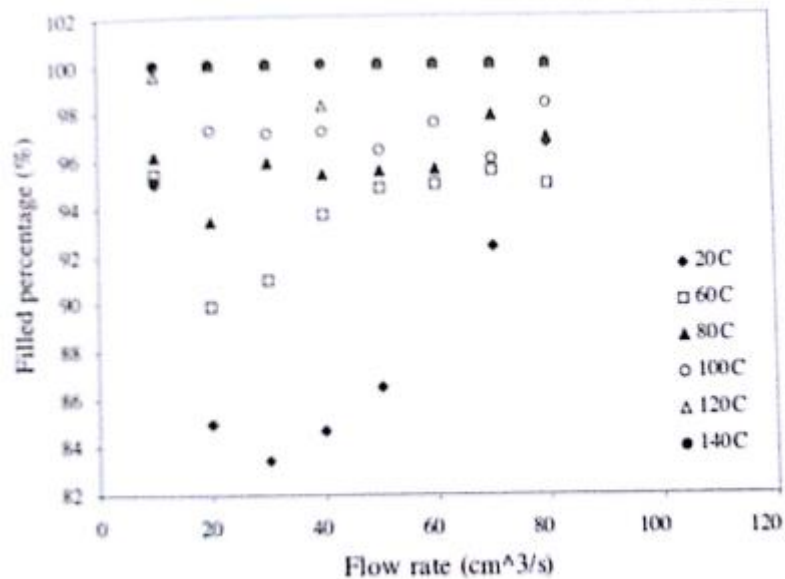


Figura 65 - Percentuale di riempimento di microstrutture in HDPE, in funzione della velocità e a diverse temperature dello stampo

Gli studi effettuati da vari gruppi di ricerca negli ultimi anni hanno riscontrato che su micro canali con spessori intorno ai 100 μm e aspect ratio fino a 20 non è necessario un processo vario termico, mentre se si diminuiscono le dimensioni o si aumenta l'aspect ratio il processo tradizionale è poco performante [21].

Durante le misurazioni dei pezzi stampati è stato riscontrato un problema di riempimento dei micro pits nella zona vicino al gate (Side1) e nella zona centrale (Center), si riporta come esempio il test numero 10 (Tabella 21):

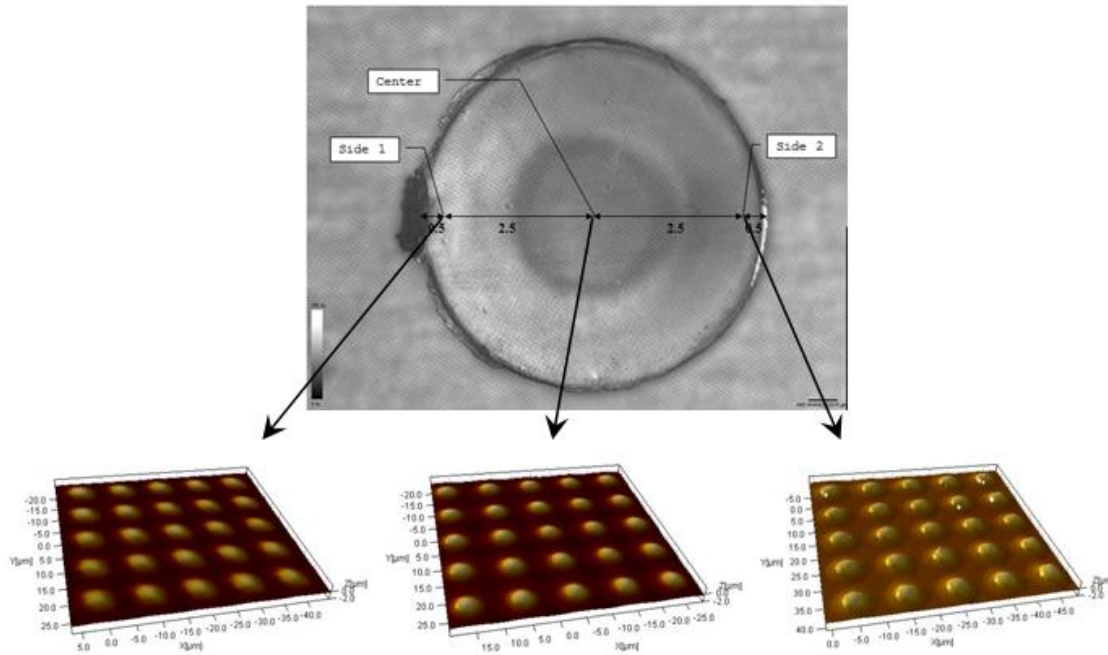


Figura 66 - Replicazione dei micro pillars

Le medie e le deviazioni delle altezze dei pillars nelle tre zone valgono:

$$\bar{x}_{side1} = 0.707 \pm 0.065 \mu\text{m} \quad \bar{x}_{center} = 1.438 \pm 0.037 \mu\text{m} \quad \bar{x}_{side2} = 1.634 \pm 0.030 \mu\text{m}$$

Nelle tre zone la differenza percentuale tra fori e pillars è rispettivamente di:

$$diff\%_{side1} = \frac{1.789 - 0.707}{1.789} * 100 = 60\% \quad diff\%_{center} = \frac{1.789 - 1.438}{1.789} * 100 = 19\%$$

$$diff\%_{side2} = \frac{1.789 - 1.634}{1.789} * 100 = 1\%$$

Come possiamo notare nella zona side2, distante dal gate c'è completa replicazione dei pillars. La mancanza di replicazione nelle cavità più vicine al gate può essere dovuto a:

- Mancata fuoriuscita dell'aria dallo stampo: l'aria rimane intrappolata nelle micro cavità e non consente la replicazione.
- Esitazione: il polimero quando entra nella cavità incontra maggior resistenza nel riempimento dei micro fori nella zona adiacente al gate, pertanto fluisce nel resto della cavità dove incontra minor resistenza. Nel frattempo, nella zona vicino al gate il polimero si raffredda, aumenta la sua viscosità e si solidifica; nella zona distante dal gate il polimero si raffredda successivamente e riesce a replicare i microfori con l'aiuto della pressione di compattazione.

Per capire quale dei due fenomeni è quello predominante, si può procedere con una analisi della varianza, determinando se la variazione di V_{inj} ha effetto significativo sulla risposta, che è la deviazione standard dell'altezza dei pillars. Se la risposta è affermativa significa che il fenomeno predominante è l'esitazione del polimero, infatti il miglior modo per contrastare questo fenomeno è aumentare la velocità di iniezione, così da contrastare il raffreddamento prematuro del materiale.

Sono stati scelti tre livelli per V_{inj} : 200 – 500 – 700 mm/s con due replicazioni per ogni livello; P_{pack} e T_{mold} sono stati mantenuti costanti e pari rispettivamente a 200 bar e 90°C. La deviazione dell'altezza dei pillars è stata calcolata con la seguente formula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x_i = altezza singolo pillar, \bar{x} = media dell'altezza dei pillars, n = numero di altezze prese in considerazione, nel nostro caso 15.

Tabella 22 - Deviazione altezza del pillars per tre livelli di velocità

N°	V_{inj} [mm/s]	Deviazione altezza pillars [μ m]
1	200	0.436
2	200	0.424
3	500	0.332
4	500	0.317
5	700	0.217
6	700	0.199

Con il software Minitab è possibile effettuare l'ANOVA, che ha fornito i seguenti risultati:

Source	DF	SS	MS	F	P
V	2	0.049186	0.024593	210.06	0.001
Error	3	0.000351	0.000117		
Total	5	0.049538			

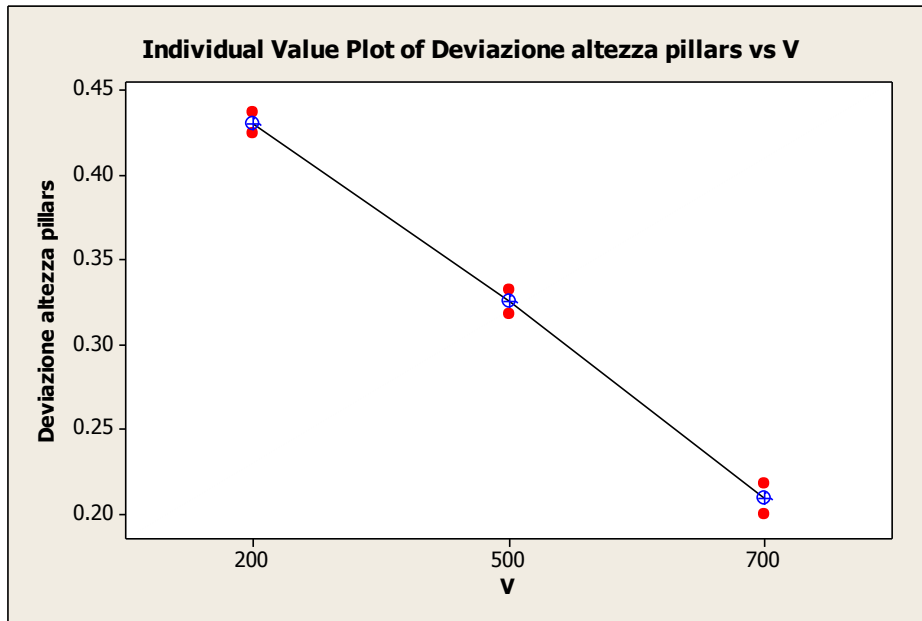


Grafico 13 – Diagramma a barre della deviazione standard dei pillars rispetto la velocità di iniezione

Come si può notare la velocità di iniezione è assolutamente significativa: aumentando la velocità diminuisce la deviazione standard dei pillars.

5.5. Stampaggio geometria Ø3 – I9

Con i parametri ottimali trovati sono stati stampati alcuni pezzi usando la geometria Ø3 – I9 con l’insert3_3-9. Come già verificato le misurazioni effettuate con l’AFM e il microscopio confocale coincidono.

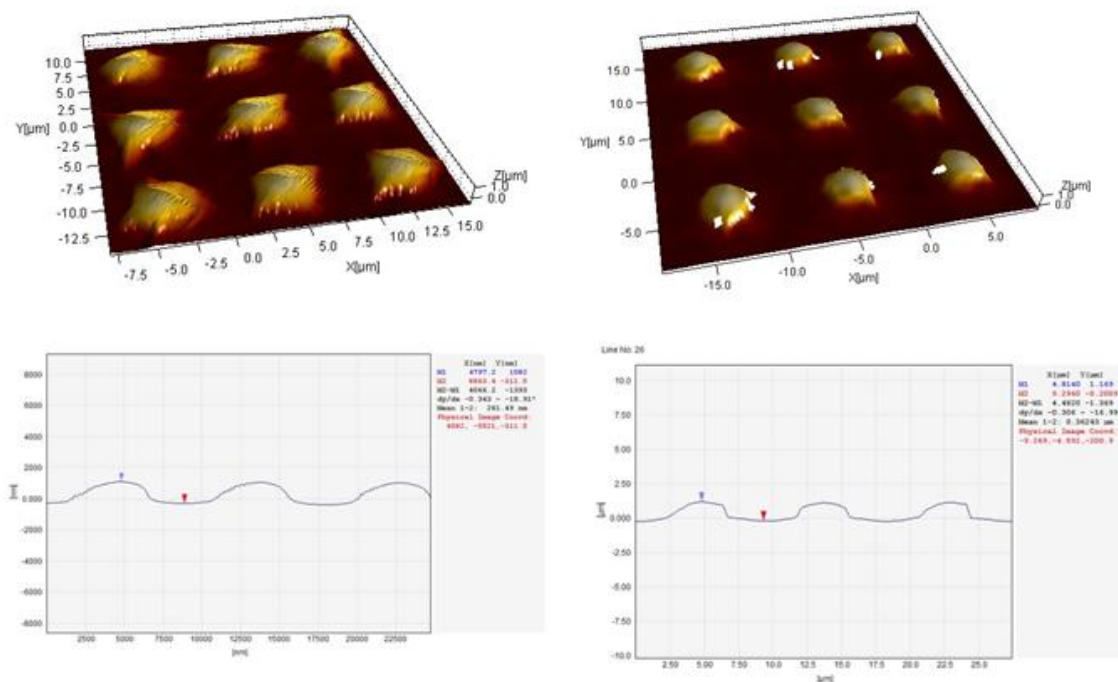


Figura 67 - A sinistra la misurazione con AFM, a destra la misurazione con microscopio cofocale

Tabella 23 - Confronto tra le misurazioni AFM e Confocali espresse in μm, geometria Ø3 – I9

	Misurazione AFM	Misurazione Confocale
	1.366	1.342
	1.373	1.403
	1.346	1.357
	1.363	1.359
	1.349	1.367
Media	1.359±0.012	1.366±0.023
Differenza	0.00620	Differenza % 0.4

5.6. Stampaggio geometria Ø2 – I8

Con l’insert1_2-8 e i parametri ottimali sono stati stampati alcuni pezzi con geometria Ø2 – I8. Anche in questo caso c’è concordanza tra le misure effettuate con l’AFM e il microscopio confocale.

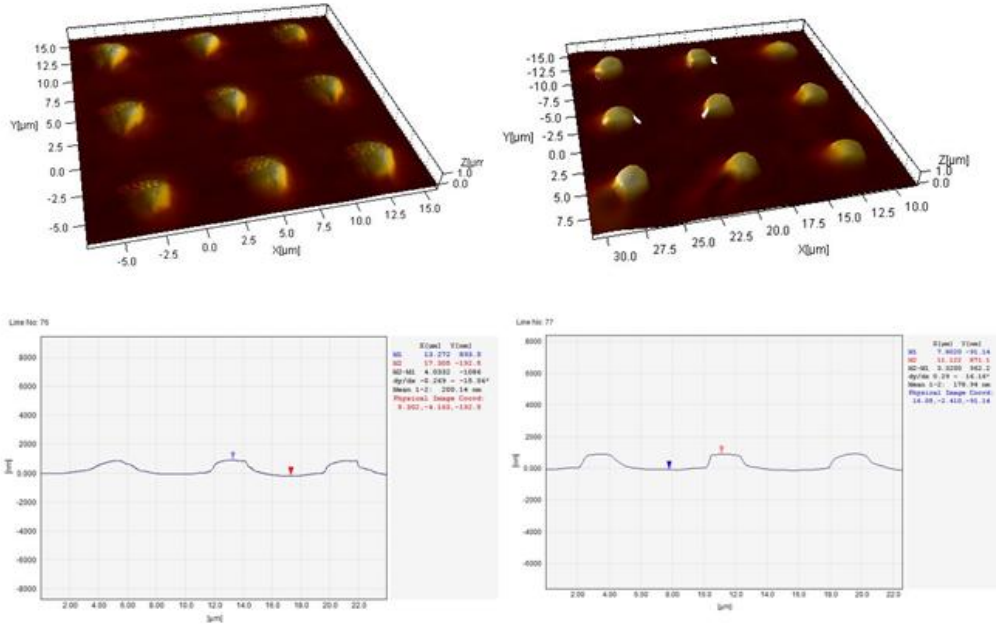


Figura 68 - A sinistra la misurazione con AFM, a destra la misurazione con microscopio cofocale

Tabella 24 - Confronto tra le misurazioni AFM e Confocali espresse in µm, geometria Ø2 – I8

	Misurazione AFM	Misurazione Confocale
	0.864	0.919
	0.928	0.948
	0.954	0.993
	1.009	0.931
	0.908	0.839
Media	0.932±0.054	0.926±0.056
Differenza	0.00660	Differenza % 0.7

5.7. Stampaggio per la crescita cellulare

Trovati i parametri ottimali di processo, sono stati stampati i supporti su cui far crescere le cellule. La piastra per la coltura cellulare dispone di 96 cavità, pertanto sono stati stampati circa 100 supporti per ogni geometria, e altri 100 supporti che non presentano micro pillars. Questi ultimi serviranno come confronto, per capire se c’è un effettivo miglioramento in termini di adesione, crescita e differenziazione cellulare.

Per questa fase di stampaggio sono stati scelti gli inserti che presentano le caratteristiche migliori di uniformità dei micro fori:

Insert2_4-10

Diametro 4 μm – Interasse 10 μm (Ø4 – I10)

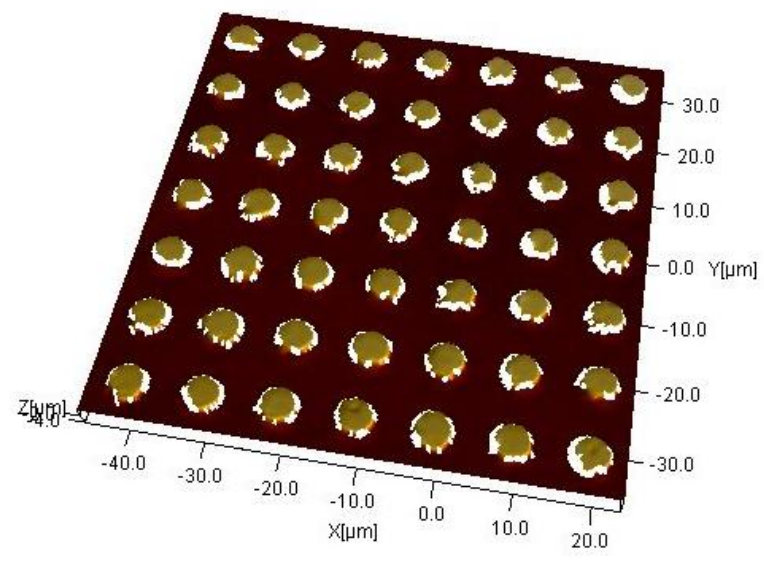
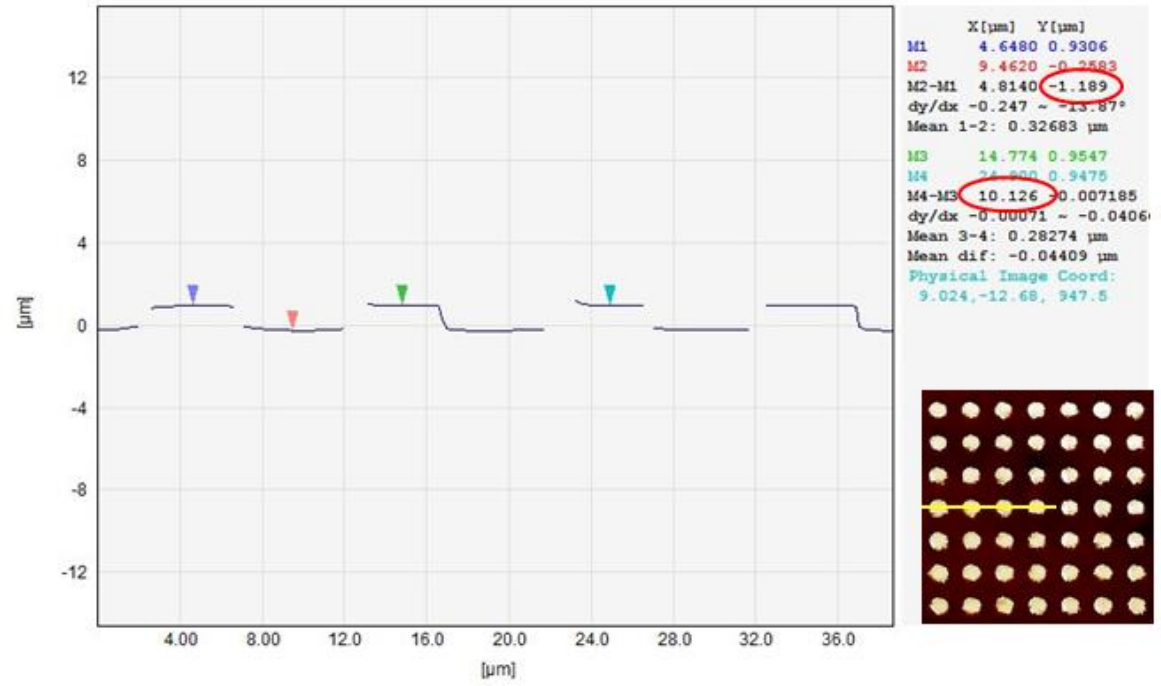


Figura 69 - Misurazione confocale geometria 4-10

$$\bar{x}_{pillars} = 0.852 \pm 0.175 \mu m \quad Aspect Ratio = 0.213$$

$$diff\% = \frac{\bar{x}_{fori} - \bar{x}_{pillars}}{\bar{x}_{fori}} * 100 = \frac{0.990 - 0.852}{0.990} * 100 = 13\%$$

Insert7_3-9

Diametro 3 μm – Interasse 9 μm (Ø3 – I9) – Aspect ratio 0.5

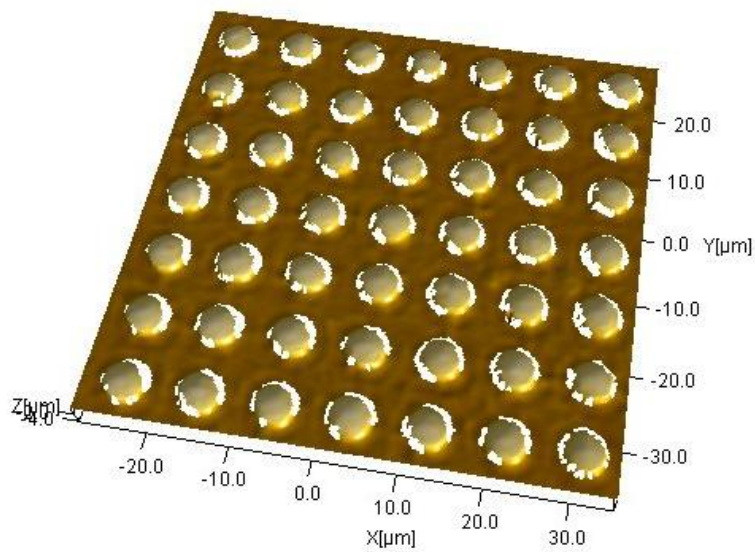
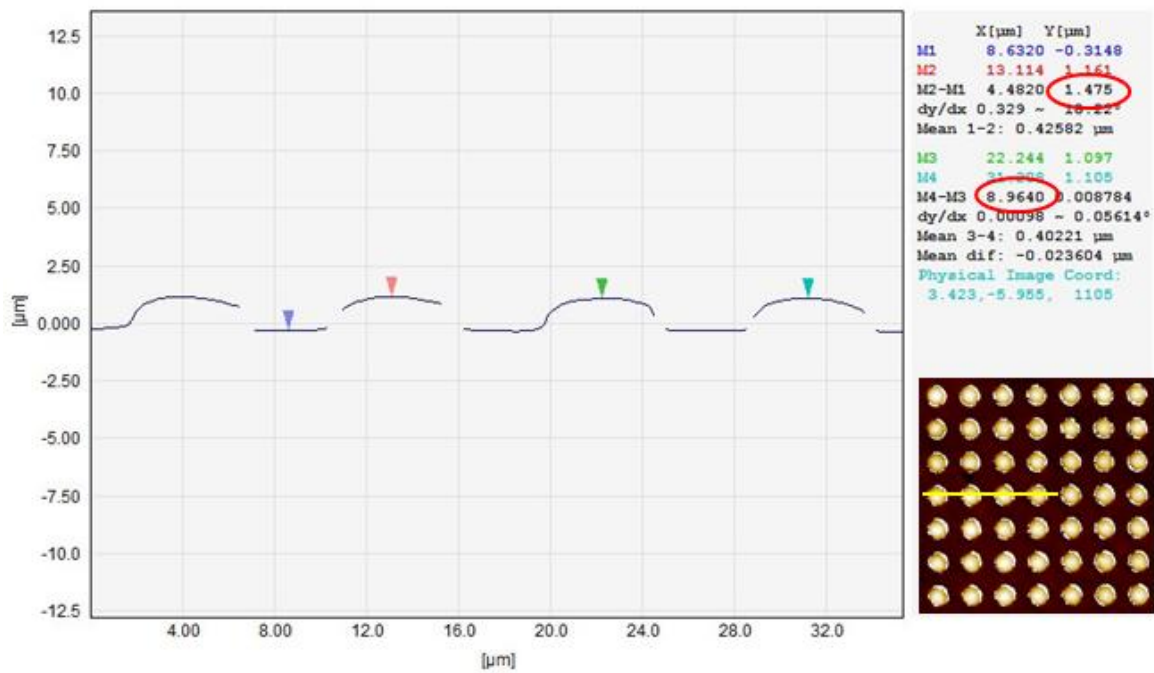


Figura 70 - Misurazione confocale geometria 3-9

$$\bar{x}_{pillars} = 1.252 \pm 0.280 \mu\text{m} \quad \text{Aspect Ratio} = 0.417$$

$$diff\% = \frac{\bar{x}_{fori} - \bar{x}_{pillars}}{\bar{x}_{fori}} * 100 = \frac{1.525 - 1.252}{1.525} * 100 = 20\%$$

Insert1_2-8

Diametro 2 μm – Interasse 8 μm (Ø2 – I8) – Aspect ratio 0.5

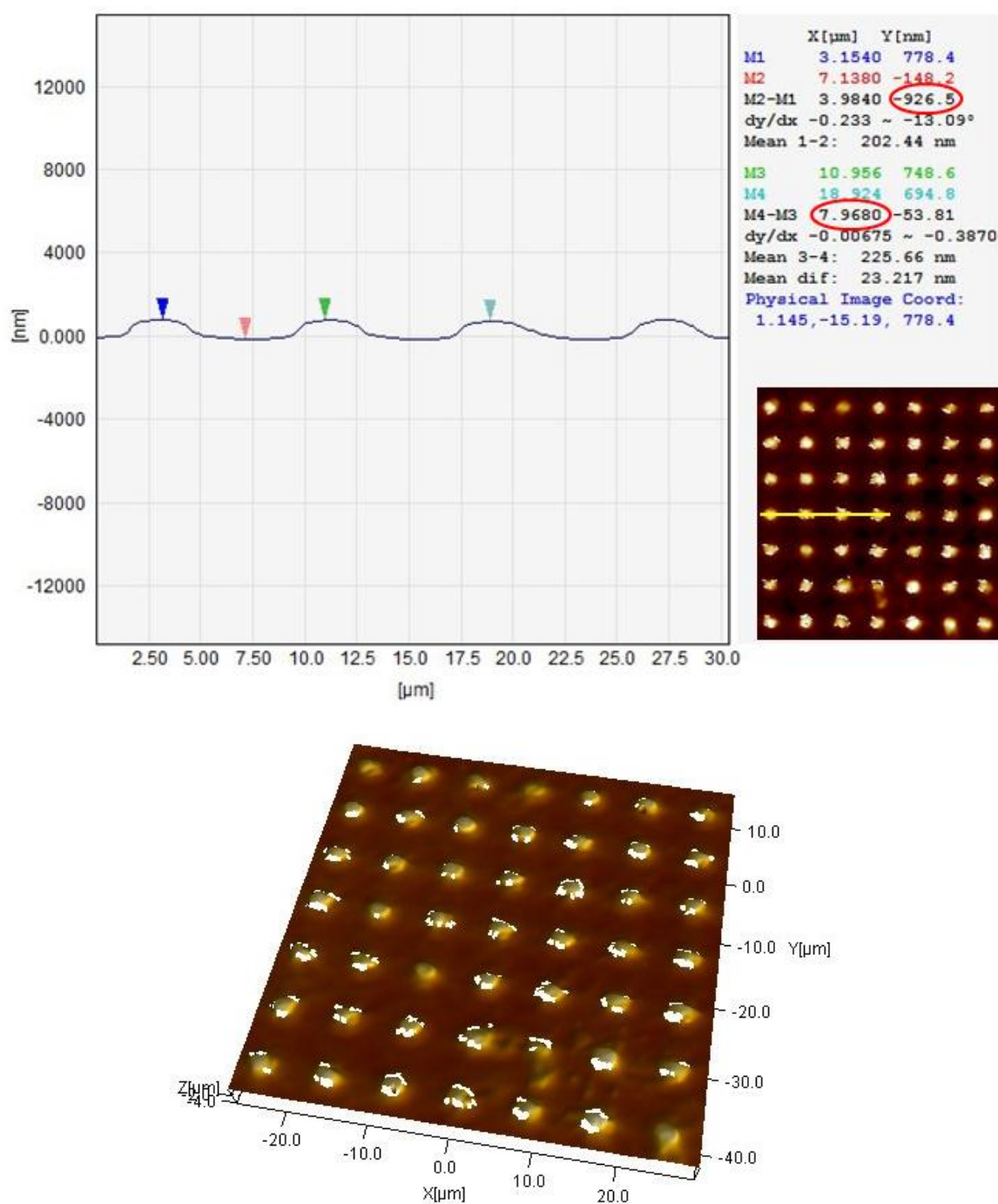


Figura 71 - Misurazione confocale geometria 2-8

$$\bar{x}_{pillars} = 0.792 \pm 0.296 \mu\text{m} \quad \text{Aspect Ratio} = 0.396$$

$$diff\% = \frac{\bar{x}_{fori} - \bar{x}_{pillars}}{\bar{x}_{fori}} * 100 = \frac{0.990 - 0.792}{0.990} * 100 = 26\%$$

5.8. Microscopia a scansione

Dato che il resist e il polistirene sono materiali isolanti, è necessario depositare un sottilissimo strato metallico sulla superficie per poterli osservare al SEM.

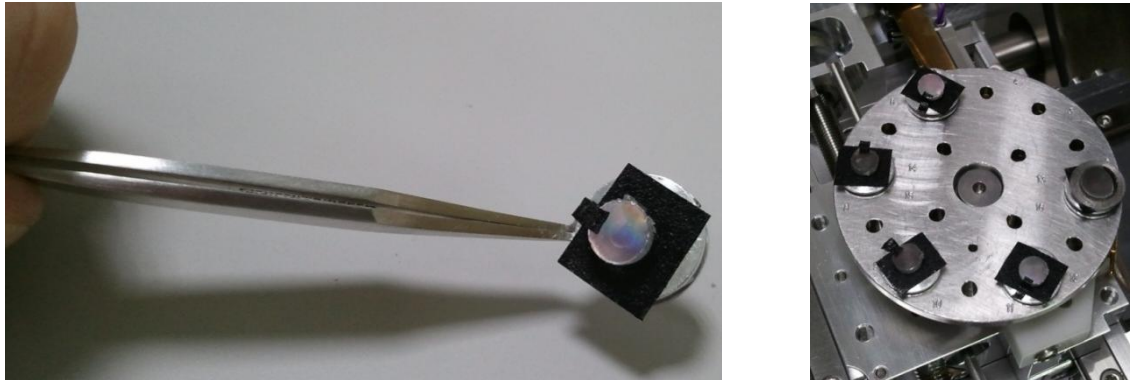


Figura 72 - Preparazione dei provini per il SEM



Figura 73 - Microscopio elettronico a scansione

La microscopia a scansione ha confermato quanto rilevato dall'AFM. C'è effettiva presenza dei micro fori sullo stampo e dei micro pillars.

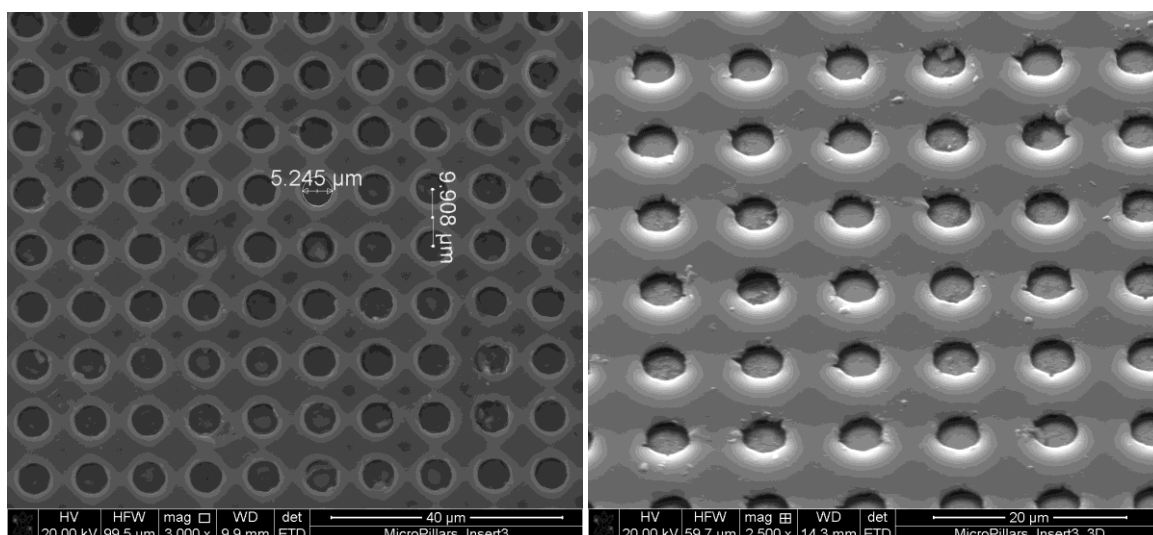


Figura 74 - Rilevazioni al SEM dei micro fori, Insert3_4-10

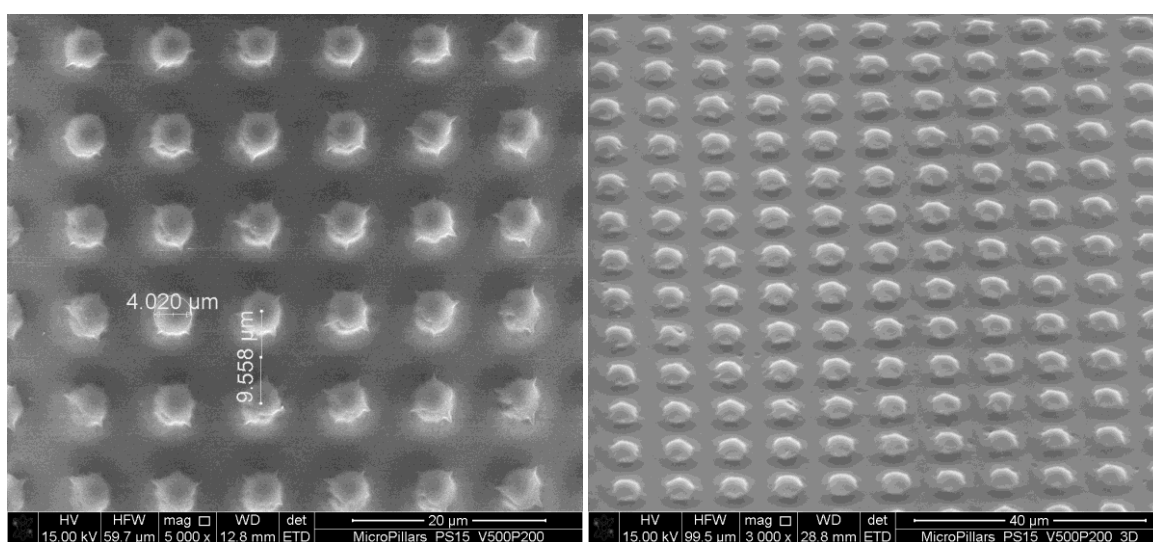


Figura 75 - Rilevazione al SEM dei micro pillars

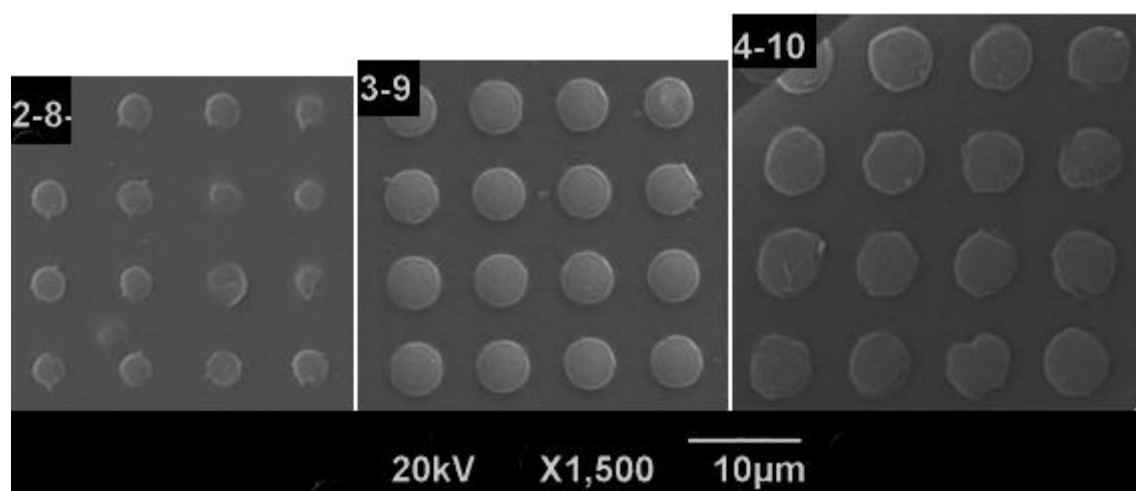


Figura 76 – Le tre geometrie utilizzate

Capitolo 6

COLTURA CELLULARE IN VITRO

La coltura cellulare è stata effettuata presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche di Padova. Dato che le cellule staminali mesenchimali umane hanno un costo elevato, come primo tentativo è stata utilizzata la linea cellulare MC3T3E1, preosteoblastica murina, acquistata da DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Le cellule sono state scongelate e seminate su piastra a una densità di 10^4 cell/cm² in accordo con il protocollo fornito dalla ditta. Sono state mantenute in coltura in terreno proliferativo alpha MEM (Sigma Aldrich) supplementato con 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich), e 1% penicillina e streptomina (Penstrep, Euroclone). Raggiunta una confluenza dell'80% le cellule sono state staccate con una soluzione di tripsina/EDTA. La sospensione così ottenuta è stata centrifugata e il pellet risospeso e seminato fino ad ottenere un numero di cellule adeguato per effettuare i saggi.

A tal fine, le cellule (5000 cell/pozzetto) sono state seminate in piastre a 96 pozzetti contenenti i supporti modificati con i micro pillars. Come controllo, sono stati utilizzati supporti di polistirene non modificati in superficie. Dopo 24, 72 ore e 7 giorni dalla semina, sono stati eseguiti i saggi di vitalità cellulare con MTS e le colture sono state osservate al microscopio elettronico a scansione.

6.1. MTS - test

Questo saggio colorimetrico utilizza un composto tetrazolico [3- (4,5-dimetiltiazol-2yl)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfifenil)-2H tetrazolio], noto come MTS o reagente di Owen, per valutare l'attività metabolica delle cellule in coltura. Il composto tetrazolico MTS viene bio-ridotto all'interno delle cellule formando un prodotto colorato, detto formazano, solubile nel terreno di coltura. La conversione è permessa dalle deidrogenasi presenti nelle cellule metabolicamente attive. La determinazione quantitativa di formazano è stata effettuata tramite lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 490 nm, che è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.

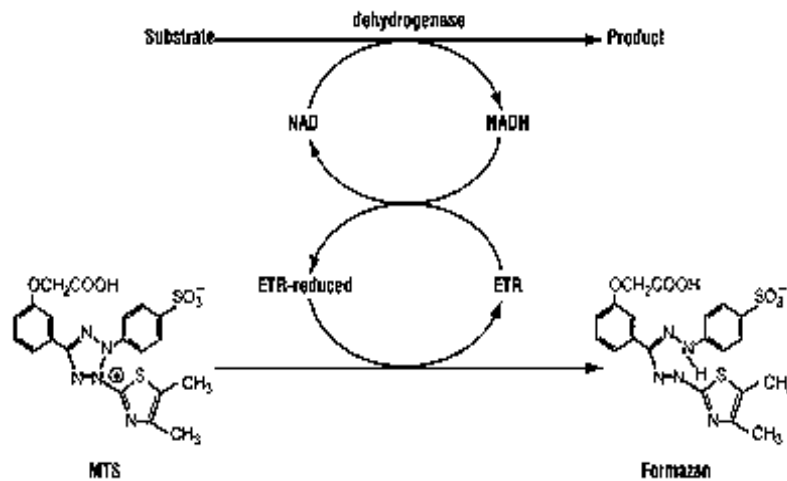


Figura 77 - Funzionamento del test MTS

Nello specifico, dopo l'incubazione a 37°C per i tempi sopra ricordati, è stato rimosso il terreno ed effettuato un lavaggio con tampone fosfato (PBS) per eliminare eventuali cellule morte o non adese. Infine, in ogni pozzetto è stato aggiunto del terreno fresco (100µl) addizionato con MTS (5 mg/ml) al 10%. Dopo un'incubazione di 4 ore per permettere alle cellule di metabolizzare il composto, è stata eseguita la lettura dei valori di assorbanza a 490 nm con Microplate autoreader EL 13. I risultati sono espressi come densità ottica \pm deviazione standard.

6.2. Microscopia elettronica a scansione (SEM)

I campioni che devono essere osservati al SEM per la determinazione della morfologia e della microstruttura devono essere trattati in modo opportuno. Ad esempio i campioni devono essere anidri, o comunque l'acqua in essi contenuta non deve essere rilasciata nel momento in cui il campione viene portato in vuoto. I campioni al termine dei relativi tempi di coltura (24, 72 ore e 7 giorni), sono stati lavati con PBS e fissati con formalina tamponata al 4% per 24h. I campioni sono stati lavati con PBS e disidratati tramite passaggi di 5 minuti in scala ascendente di etanolo alle seguenti percentuali: 10, 20, 40, 50, 70, 80, 90, 95 e 100. Successivamente, sono stati fissati su un supporto tramite nastro biadesivo conduttivo e argento, metallizzati con oro e osservati al microscopio elettronico a scansione JEOL modello JSM-6490.

6.3. Risultati

Per verificare la capacità dei supporti di sostenere l'adesione e la crescita cellulare, è stata utilizzata la linea cellulare preosteoblastica MC3T3-E1, ottenuta dalla teca cranica di topi C57BL/6. Tali cellule sono in grado, se stimolate in modo opportuno, di differenziare in osteoblasti ed osteociti e, per tal motivo, vengono ampiamente utilizzate in saggi *in vitro* per valutare le proprietà osteogeniche di biomateriali e di fattori di differenziazione.

Nel Grafico 14 sono riportati i risultati preliminari dei saggi di crescita effettuati sui supporti modificati in superficie con micro pillar di varie dimensioni. Le colture su polistirene non modificato sono state considerate come controllo. A 24 ore dalla semina, si osserva una minore adesione cellulare nei supporti con micro pillar rispetto ai controlli, come confermato anche dall'analisi morfologica effettuata al SEM (figura x). Tuttavia, a 7 giorni dalla semina, le colture sui campioni 2_4-10 e 7_3-10 hanno raggiunto livelli di crescita cellulare paragonabili a quelli dei controlli. E' interessante notare che le colture sul campione 1_2-8, caratterizzato da micropillar di dimensioni minori a più elevata densità, presentano valori di assorbanza maggiori rispetto al controllo.

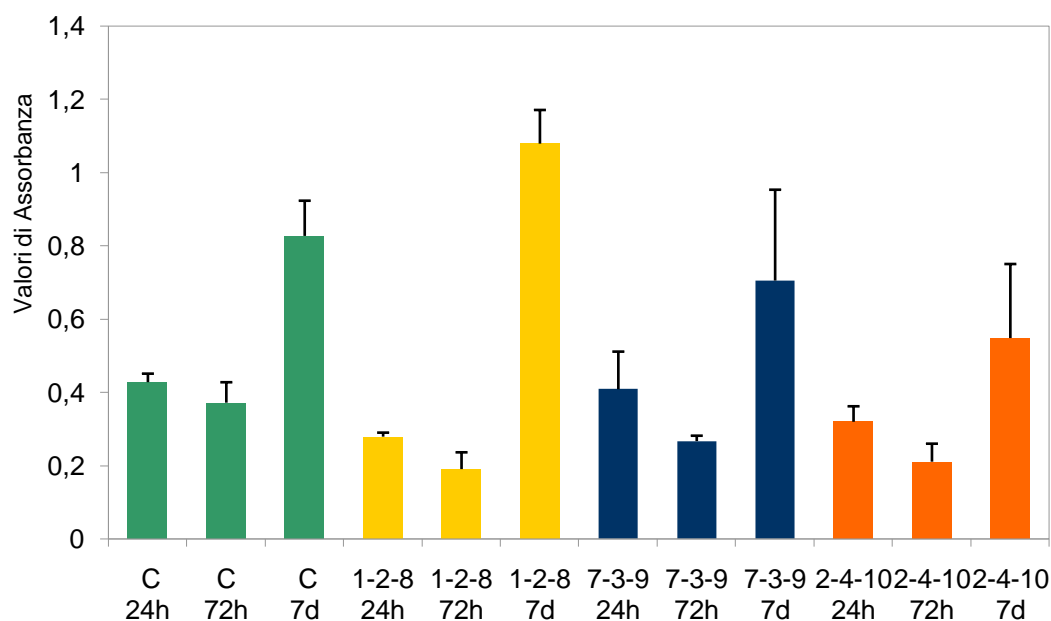


Grafico 14 – Crescita di cellule MC3T3E1 sui supporti a 24, 72 ore e 7 giorni dalla semina. I risultati sono espressi come densità ottica \pm deviazione standard

Come si può osservare nella Figura 78, a 7 giorni dalla semina le colture su ciascuna tipologia di supporto raggiungevano la confluenza. Tuttavia, sono evidenti delle differenze tra colture di controllo e quelle su micro pillar. Infatti, nelle prime le cellule stratificano e appaiono di piccole dimensioni con nucleo prominente, indice di un'intensa attività proliferativa. Al contrario, nelle seconde le cellule si dispongono a formare un monostrato sottile e presentano dimensioni maggiori. Quest'ultima osservazione suggerisce che le cellule coltivate su superfici con micro pillar siano indirizzate verso il differenziamento in forme mature (osteoblasti/osteociti). Per verificare tale ipotesi, sono in corso esperimenti su colture a 3/4 settimane.

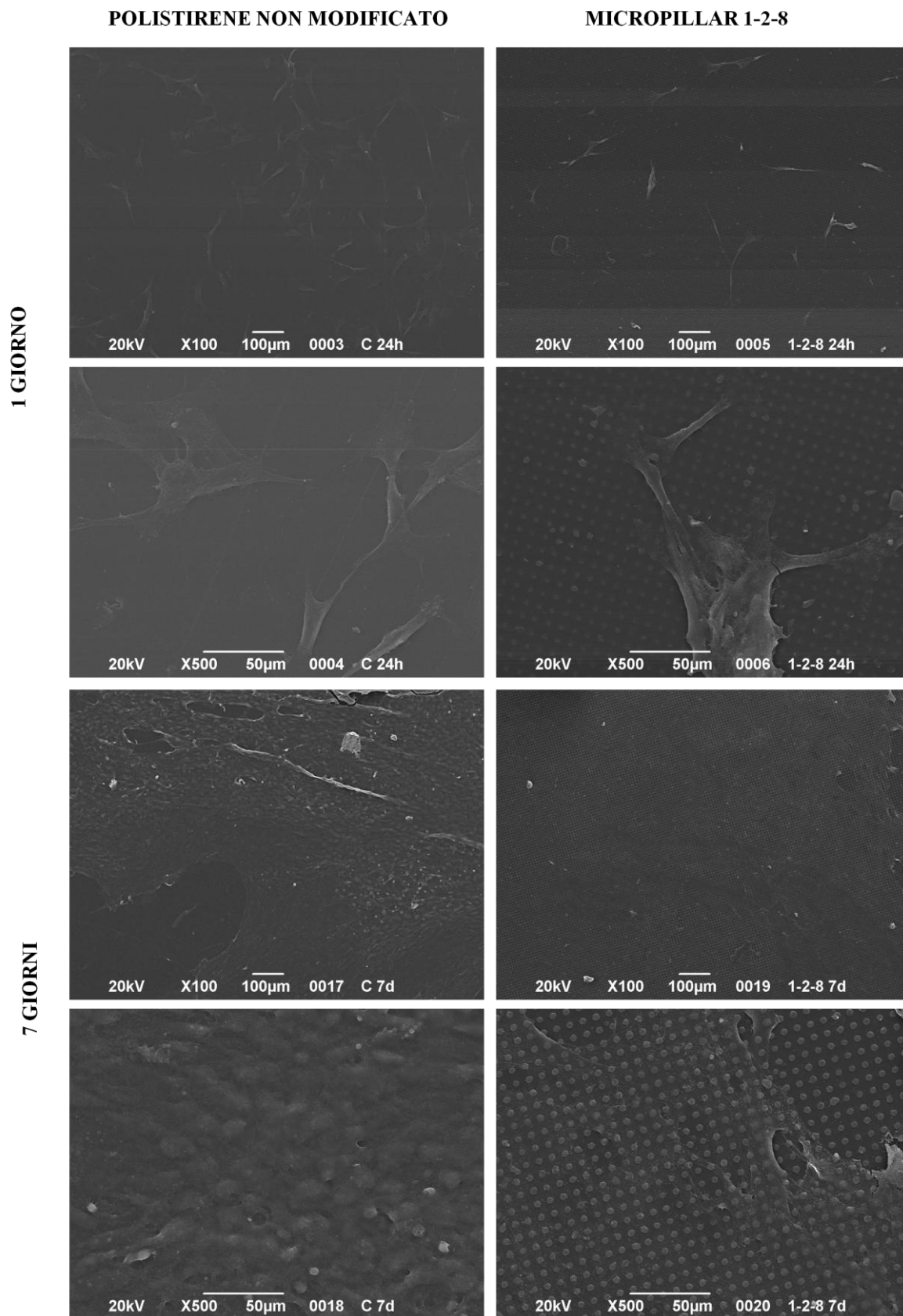


Figura 78 - Microscopia elettronica a scansione di colture di cellule MC3T3E1 sui supporti di controllo e su supporti con micropillar

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

In questo lavoro sono stati realizzati tramite stampaggio a iniezione delle superfici micro strutturate per la coltura in vitro di cellule staminali. Sono stati realizzati dei pattern quadratici con micro pillars cilindrici sui vertici, in tre configurazioni differenti:

- Diametro 4 μm – Interasse 10 μm ($\text{Ø}4 - \text{I}10$) – Aspect ratio 0.2
- Diametro 3 μm – Interasse 9 μm ($\text{Ø}3 - \text{I}9$) – Aspect ratio 0.4
- Diametro 2 μm – Interasse 8 μm ($\text{Ø}2 - \text{I}8$) – Aspect ratio 0.4

I risultati di crescita cellulare hanno rivelato che la diminuzione delle dimensioni dei pillars e l'aumento della loro densità ha effetti positivi sull'adesione, sulla crescita e sulla differenziazione cellulare. L'evoluzione natura ledi questo lavoro è quindi la realizzazione di superfici nano strutturate. Gli stampi per effettuare lo stampaggio di nano strutture non può essere realizzato con una fotolitografia UV, a causa della lunghezza d'onda della sorgente luminosa che limita la risoluzione. È necessaria una litografia elettronica (EBL).

Durante le prove sperimentali è stato riscontrato che la replicazione completa di features micrometriche è difficile da ottenere a causa del rapido calo di temperatura che subisce il polimero appena entra in contatto con lo stampo. Per migliorare la replicabilità è necessario realizzare un processo vario termico, cioè un sistema che consenta di variare la temperatura dello stampo durante il processo. La temperatura dello stampo durante la fase di iniezione dovrà essere al di sopra della T_g del polistirene, pari a circa 100°C , mentre una volta completato il riempimento la temperatura deve calare al di sotto di T_g per consentire l'estrazione del pezzo dallo stampo. Inoltre inserire una pompa che generi vuoto nello stampo può facilitare il riempimento, perché elimina l'aria presente all'interno delle micro cavità.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio prima di tutto Giovanni Lucchetta, relatore di questo lavoro, soprattutto per i consigli e gli insegnamenti nell'ultimo anno di corso a Rovigo.

Ringrazio Marco Sorgato per la e per il grande aiuto nella realizzazione delle prove sperimentali e nella stesura di questo lavoro.

Desidero anche ringraziare tutto il gruppo di ricerca del laboratorio Te.Si., per la simpatica compagnia e per i suggerimenti e consigli ricevuti nel corso della mia permanenza in tale laboratorio.

Ringrazio Franco, tecnico di laboratorio dell'ITIS di Rovigo per la sua disponibilità nel risolvere problemi di carattere pratico nella modifica dello stampo.

Ringrazio la Prof. Giovanna Brusatin, Erika Zanchetta e Gioia Della Giustina per la realizzazione delle micro lavorazioni sugli inserti.

Ringrazio la Prof. Maria Teresa Conconi ed Enrica per aver svolto il primo test di coltura cellulare nonostante il breve tempo a disposizione.

Infine, desidero ringraziare con affetto i miei genitori per avermi sempre sostenuto nel mio percorso universitario, e Francesca per l'enorme aiuto morale che sempre mi regala.

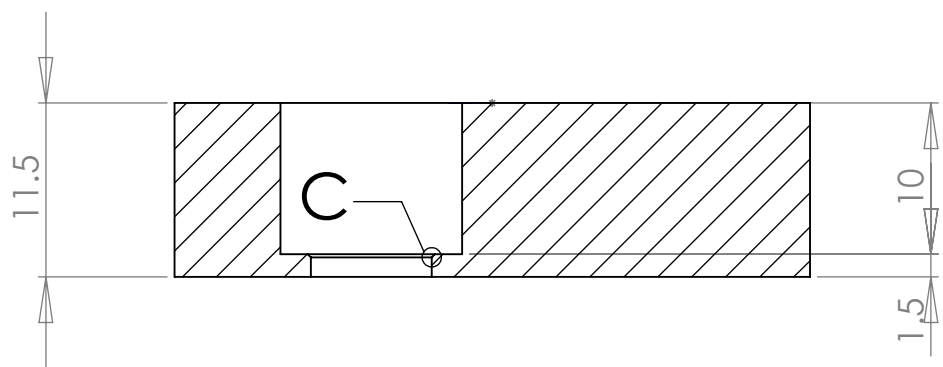
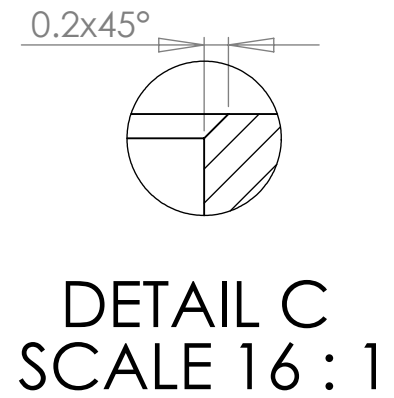
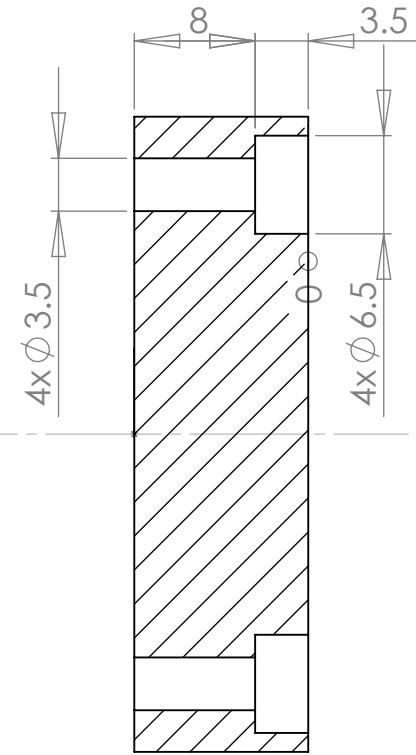
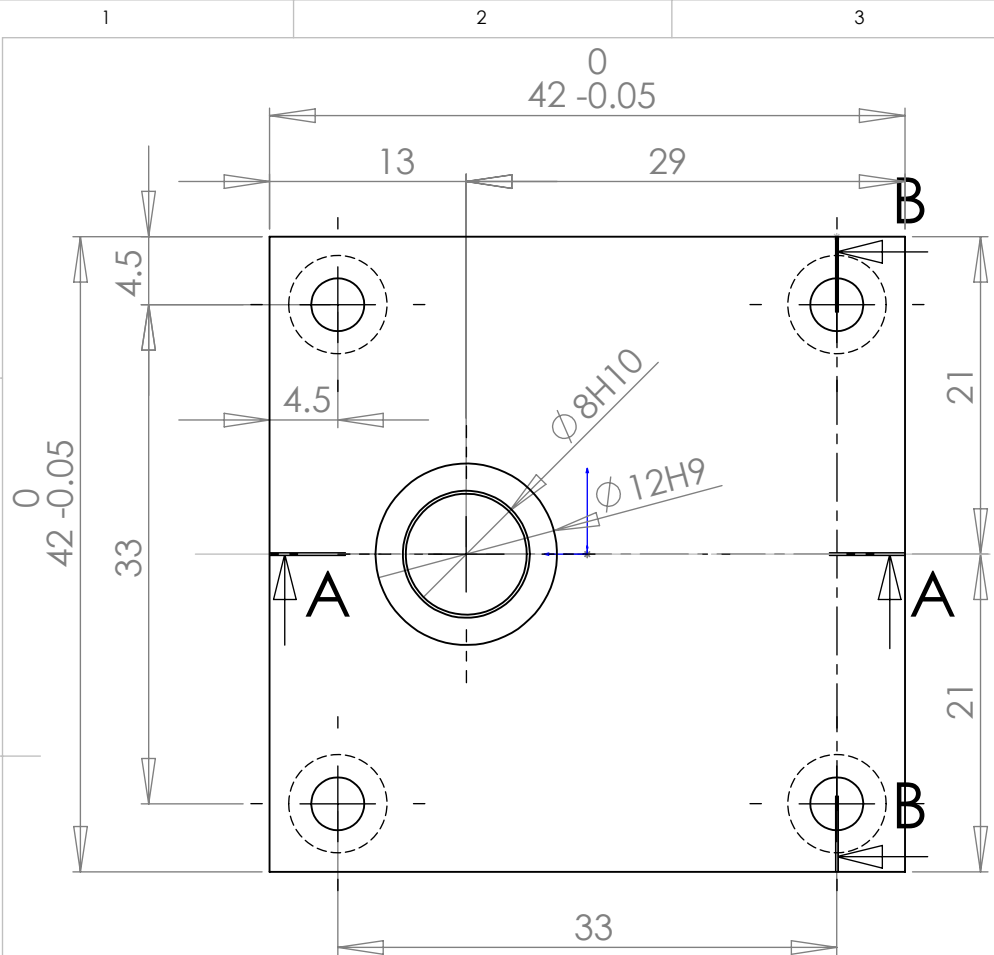
BIBLIOGRAFIA

- 1 Lijie Zhang, Thomas J. Webster. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* 4, 66–80 (2009).
- 2 Rajeswari Ravichandran, Susan Liao, Clarisse CH Ng, Casey K Chan, Michael Raghunath. Effects of nanotopography on stem cell phenotypes. *World J Stem Cells* 31; 1(1): 55-66 (2009).
- 3 E. Martinez, E.Engel, J.A.Planell, J.Samitier. Effects of artificial micro and nano structured surfaces on cell behaviour. *Annals of Anatomy* 191, 126–135 (2009).
- 4 Alireza Dolatshahi-Pirouz, Mehdi Nikkhah, Kristian Kolind, Mehmet R. Dokmeci and Ali Khademhosseini. Micro- and Nanoengineering Approaches to Control Stem Cell-Biomaterial Interactions. *J. Funct. Biomater*, 2, 88-106 (2011).
- 5 Zhen Pan, Ce Yan, Rong Peng, Yingchun Zhao, Yao He, Jiandong Ding. Control of cell nucleus shapes via micropillar patterns. *Biomaterials* 33, 1730-1735 (2012).
- 6 Kristian Kolind, Alireza Dolatshahi-Pirouz, Jette Lovmand, Finn Skou Pedersen, Morten Foss. A combinatorial screening of human fibroblast responses on micro-structured. *Biomaterials* 31, 9182-9191 (2010).
- 7 Seunghan Oh, Chiara Daraio, Li-Han Chen, Thomas R. Pisanic, Rita R. Finones, Sungho Jin. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *Wiley InterScience* (www.interscience.wiley.com) (2006).
- 8 Matthew J. Dalby, Nicolaj Gadegaard, Rahul Tare, Abhay Andar, Mathis O. Riehle, Pawel Herzig, Chris D. W. Wilkinson, Richard O. C. Oreffo. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Publishing Group* (2007).
- 9 Israd H. Jaafar, Mohamed A. Ammar, Sabrina S. Jedlicka, John P. Coulter. Micro and nanomolded surface structures for the proactive stimulation of human mesenchymal stem cell differentiation.

- 10 Adam J. Engler, Shamik Sen, H. Lee Sweeney, Dennis E. Discher. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689 (2006).
- 11 Karla S. Brammer, Chulmin Choi, Christine J. Frandsen, Seunghan Oh, Sungho Jin. Hydrophobic nanopillars initiate mesenchymal stem cell aggregation. *Acta Biomaterialia* 7, 683–690 (2011).
- 12 Guido Tosello, Hans Nørgaard. Chapter 6: Micro-Injection-Molding. *Micro Manufacturing Engineering And Technology* (2010), 90-113.
- 13 C. Griffiths, B. Sha, S. Dimov, M.S. Packianather. Investigation of micro-injection moulding: Factors affecting the replication quality. *Journal of Materials Processing Technology* 183 (2007) 284–296.
- 14 Kurt W. Koelling, Guojun Xu, Liyong Yu, L. James Lee. Experimental and Numerical Studies of Injection Molding With Microfeatures. *POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE* (2005).
- 15 Yeong-Eun YOO, Tae-Hoon KIM, Tae-Jin JE, Doo-Sun CHOI, Chang-Wan KIM, Sun-Kyung KIM. Injection molding of micro patterned PMMA plate. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 21 (2011).
- 16 Y.E. Yoo, T.H. Kim, D.S. Choi, S.M. Hyun, H.J. Lee, K.H. Lee, S.K. Kim, B.H. Kim, Y.H. Seo, H.G. Lee, J.S. Lee. Injection molding of a nanostructured plate and measurement of its surface properties. *Current Applied Physics* (2008).
- 17 Huang-Ya Lin, Ching-Ho Chang, Wen-Bin Young. Experimental and analytical study on filling of nano structures in micro injection molding. *International Communications in Heat and Mass Transfer* (2010).
- 18 Niels Bent Larsen, Henrik Pranov, Henrik Koblitz Rasmussen, Nikolaj Gadegaard. On the Injection Molding of Nanostructured Polymer Surfaces. *POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE* (2006).
- 19 Rebecca McMurray, Matthew J Dalby and Nikolaj Gadegaard. Nanopatterned Surfaces for Biomedical Applications. *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*.

-
- 20 Michael Kohler, Wolfgang Fritzsche. Nanotechnology - An introduction to nanostructuring techniques. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* (2004).
- 21 Sun-Kyu Hwang, Soo-Hwan Jeong, Hee-Young Hwang, Ok-Joo Lee, Kun-Hong Lee. Fabrication of Highly Ordered Pore Array in Anodic Aluminum Oxide. *Korean o r. Chem. Eng.*, 19(3), 467473 (2002).
- 22 Leach, Richard. *Optical Measurement of Surface Topography*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- 23 Jon Petzing, Jeremy Coupland, Richard Leach. The Measurement of Rough Surface Topography using Coherence Scanning Interferometry. *Measurement Good Practice Guide No.116* (2010).
- 24 Mironov, Victor L. *Fondamenti di microscopia a scansione di sonda*. 2004.
- 25 Montanari, R. Tecniche sperimentali per la caratterizzazione dei materiali. *AIM* (2005), 63-84.
- 26 Simone Dal Zilio, Gioia Della Giustina, Giovanna Brusatin, Massimo Tormen. Microlens arrays on large area UV transparent hybrid sol-gel materials for optical tools. *Microelectronic Engineering* 87 (2010) 1143–1146 (2009).
- 27 Greener, Jehuda, Wimberger-Friedl, Reinhold. Precision injection molding - Process, material and applications. *Hanser* (2006).

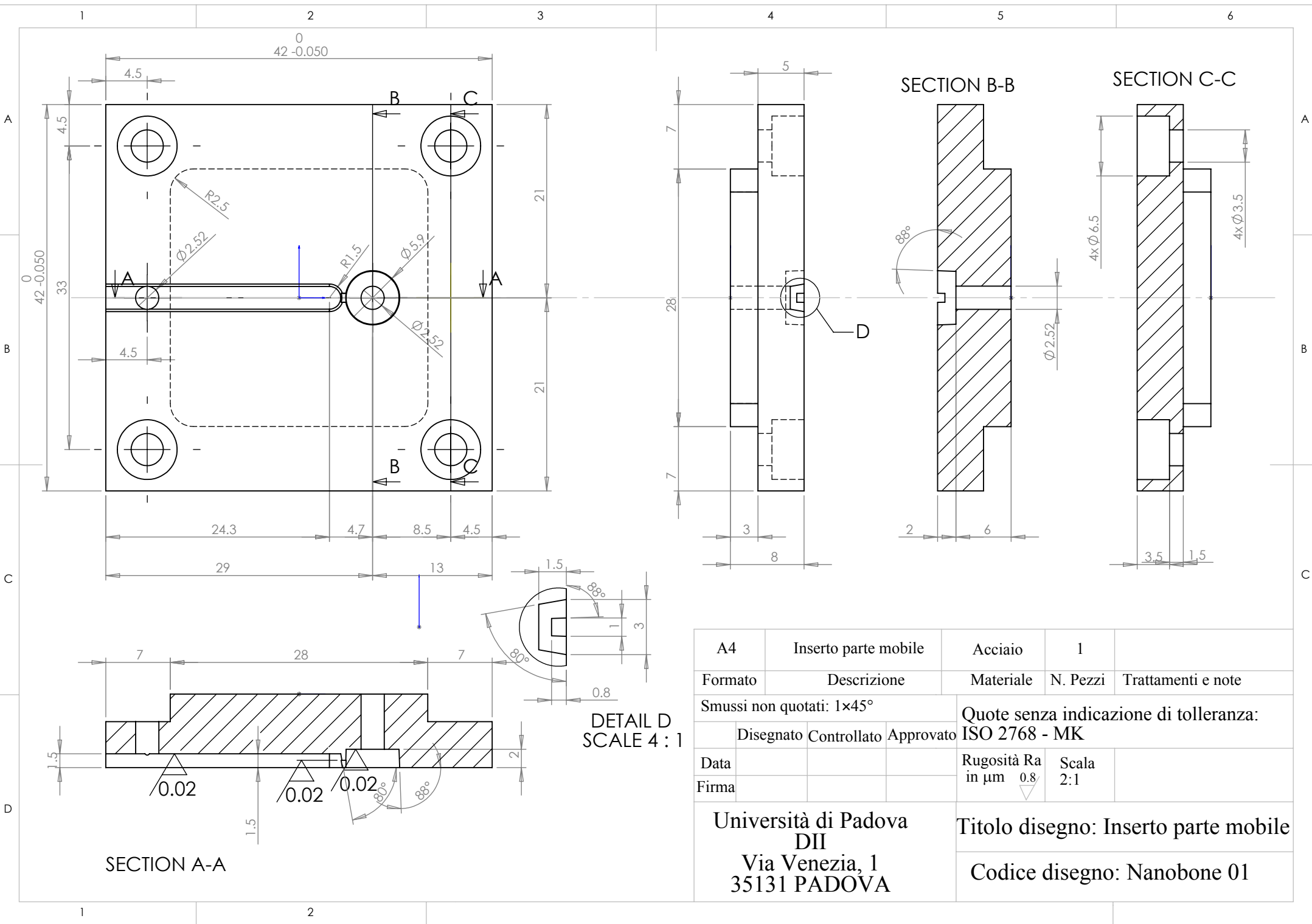
DISEGNI TECNICI



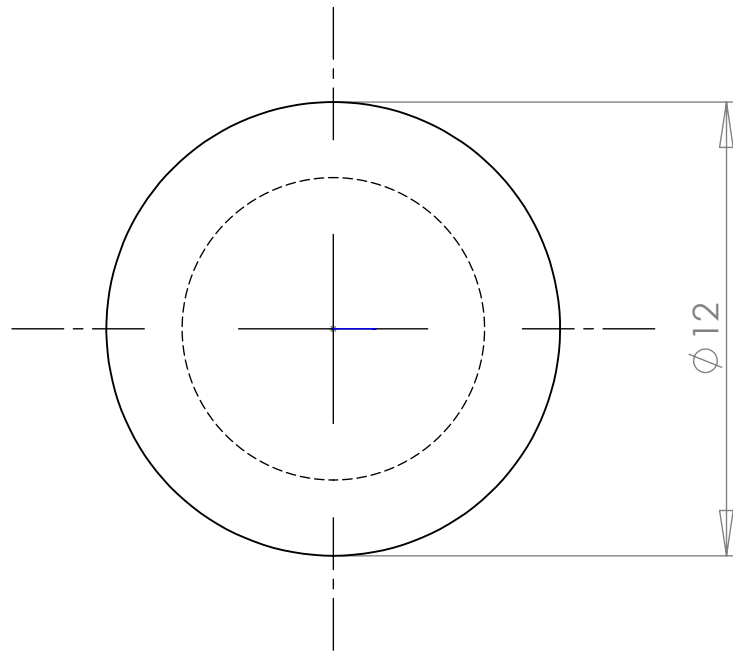
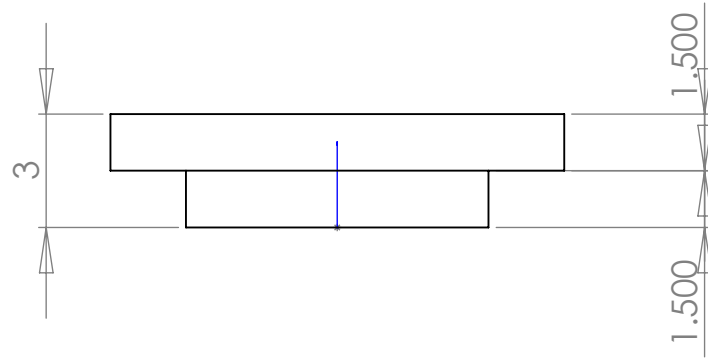
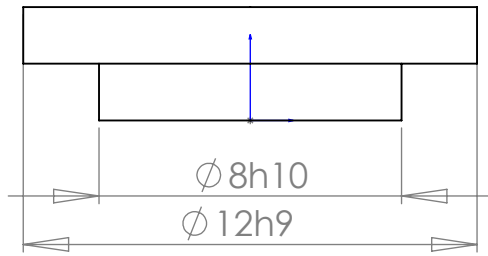
SECTION A-A

SECTION B-B

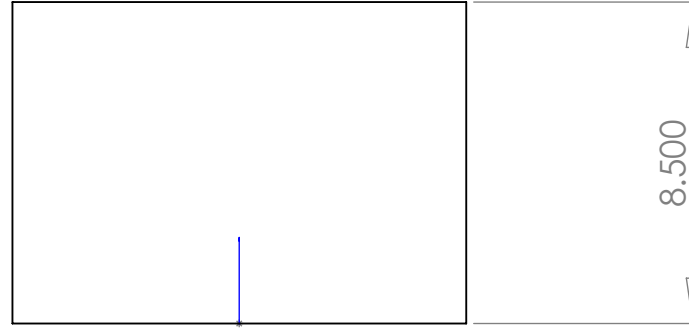
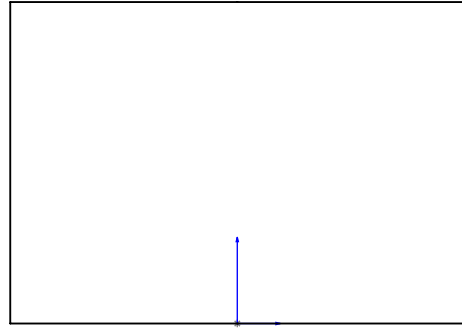
A4	Inserto parte fissa	Acciaio	1	
Formato	Descrizione	Materiale	N. Pezzi	Trattamenti e note
Smussi non quotati: $1 \times 45^\circ$		Quote senza indicazione di tolleranza: ISO 2768 - MK		
Data	Disegnato	Controllato	Approvato	Rugosità Ra in μm 0.8
Firma				Scala 1:1
Università di Padova DII Via Venezia, 1 35131 PADOVA		Titolo disegno: Inserto parte fissa		
		Codice disegno: Nanobone 02		



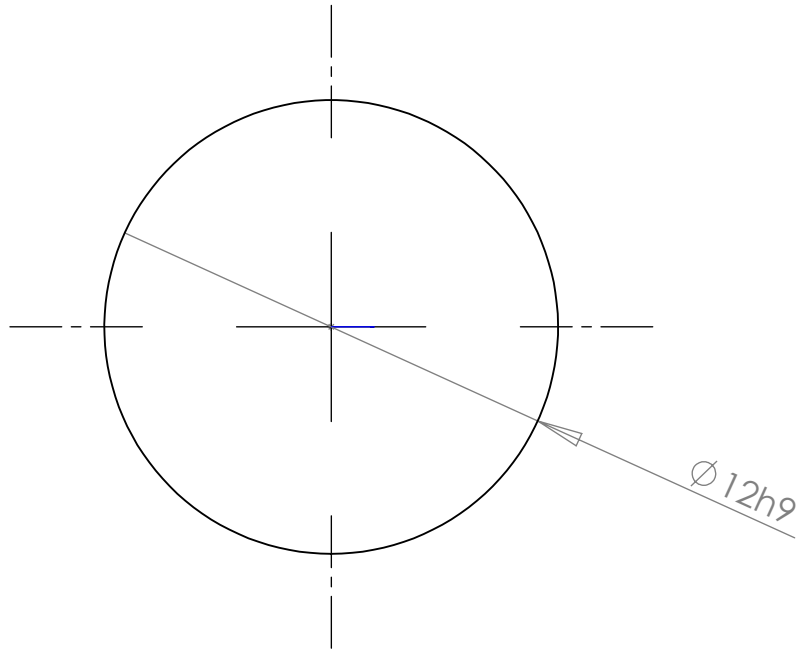
A4	Inserto parte mobile	Acciaio	1	
Formato	Descrizione	Materiale	N. Pezzi	Trattamenti e note
Smussi non quotati: 1×45°		Quote senza indicazione di tolleranza:		
	Disegnato	Controllato	Approvato	ISO 2768 - MK
Data				Rugosità Ra in µm 0.8
Firma				Scala 2:1
Università di Padova DII Via Venezia, 1 35131 PADOVA		Titolo disegno: Inserto parte mobile		
		Codice disegno: Nanobone 01		



A4	Inserto parte mobile	Acciaio	1	
Formato	Descrizione	Materiale	N. Pezzi	Trattamenti e note
Smussi non quotati: $1 \times 45^\circ$		Quote senza indicazione di tolleranza: ISO 2768 - MK		
	Disegnato	Controllato	Approvato	
Data			Rugosità Ra in μm 0.8	Scala 5:1
Firma				
Università di Padova DII Via Venezia, 1 35131 PADOVA		Titolo disegno: Inserto		
		Codice disegno: Nanobone 03		

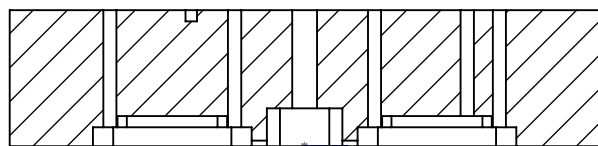
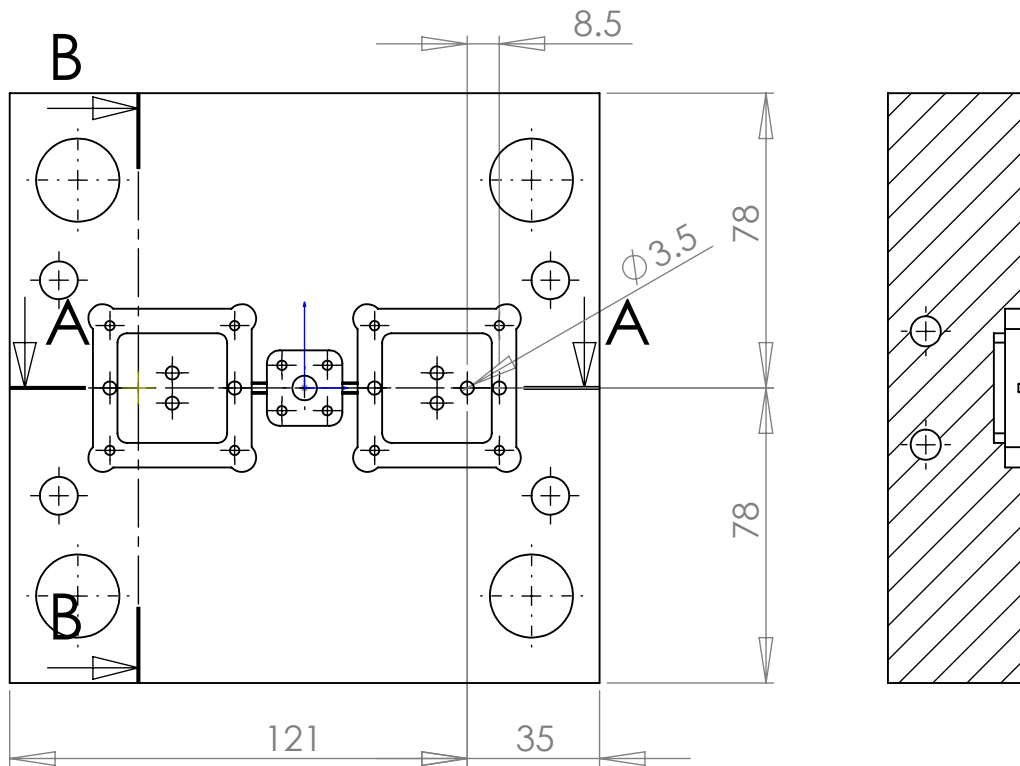


8.500



Ø 12h9

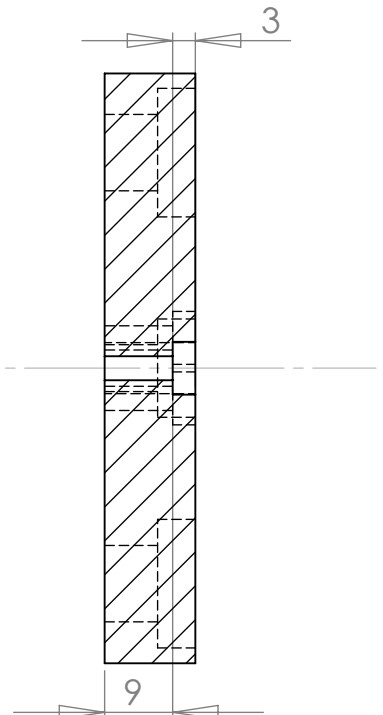
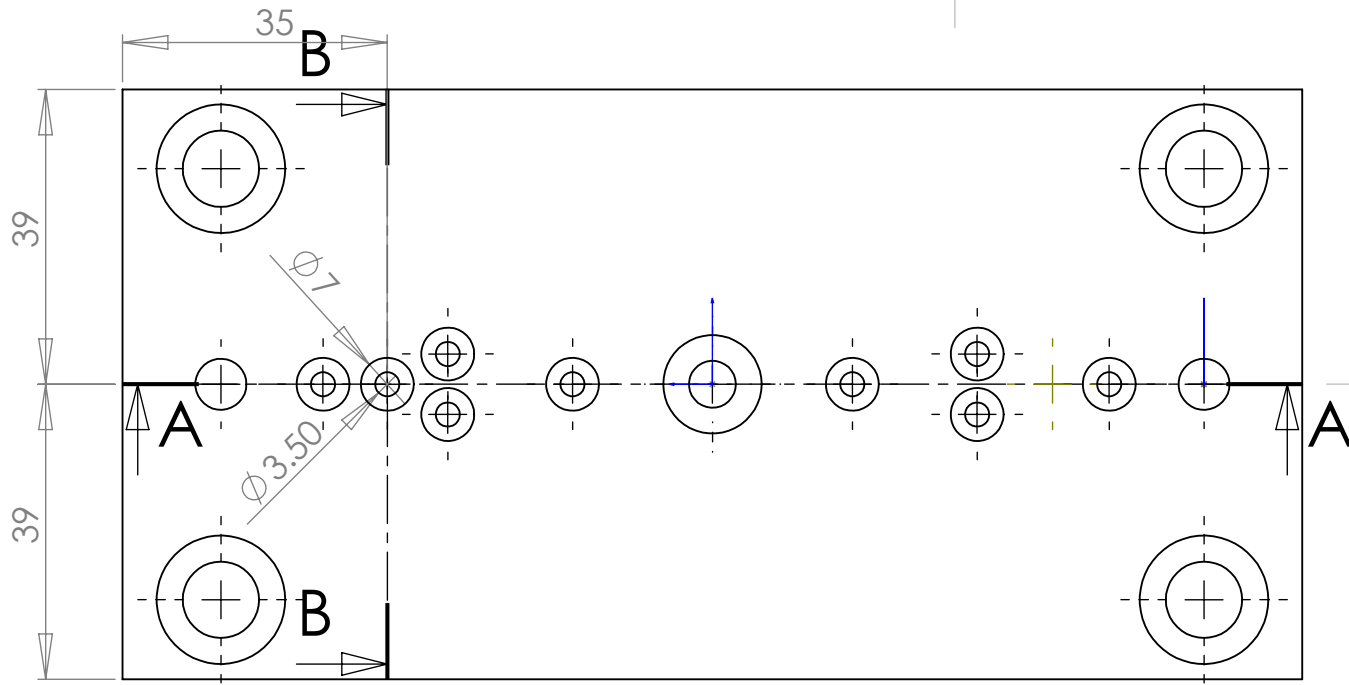
A4	Inserto parte mobile	Acciaio	1	
Formato	Descrizione	Materiale	N. Pezzi	Trattamenti e note
Smussi non quotati: 1×45°		Quote senza indicazione di tolleranza: ISO 2768 - MK		
	Disegnato	Controllato	Approvato	
Data				Rugosità Ra in µm 0.8
Firma				Scala 5:1
Università di Padova DII Via Venezia, 1 35131 PADOVA		Titolo disegno: inserto		
		Codice disegno: Nanobone 04		



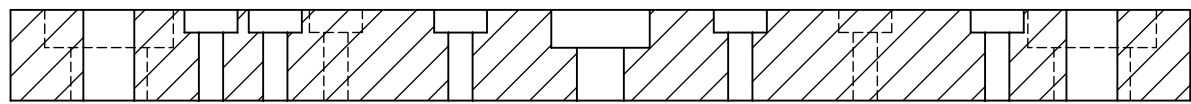
SECTION A-A

SECTION B-B

A4	Inserto parte mobile	Acciaio	1	
Formato	Descrizione	Materiale	N. Pezzi	Trattamenti e note
Smussi non quotati: 1×45°		Quote senza indicazione di tolleranza: ISO 2768 - MK		
	Disegnato	Controllato	Approvato	
Data			Rugosità Ra in μm 0.8	Scala 1:2
Firma				
Università di Padova DII Via Venezia, 1 35131 PADOVA			Titolo disegno: Modifica stampo mobile	
			Codice disegno: Nanobone 05	



SECTION B-B
SCALE 1 : 1



SECTION A-A
SCALE 1 : 1

A4	Inserito parte mobile		Acciaio	1	
Formato	Descrizione		Materiale	N. Pezzi	Trattamenti e note
Smussi non quotati: $1 \times 45^\circ$			Quote senza indicazione di tolleranza: ISO 2768 - MK		
	Disegnato	Controllato	Approvato	Rugosità Ra in μm 0.8	Scala 1:1
Data					
Firma					
Università di Padova DII Via Venezia, 1 35131 PADOVA			Titolo disegno: Modifica piastra superiore		
			Codice disegno: Nanobone 06		

