



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Generazione e caratterizzazione di gocce in una
piattaforma opto-microfluidica di LiNbO_3 in
configurazione di co-flow

Relatore

Prof. Cinzia Sada

Correlatore

Dr. Riccardo Zamboni

Laureando

Damiano Sgarbossa

Anno Accademico 2017/2018

Sommario

Gli obiettivi del seguente lavoro di tesi sono la caratterizzazione e lo studio del metodo di produzione di gocce detto *co-flowing streams* che fa uso di una giunzione microfluidica di tipo cross-junction integrata in una piattaforma opto-microfluidica costruita utilizzando un substrato di LiNbO_3 . Sono stati raccolti dati sperimentali per diversi regimi di produzione di gocce per poi confrontare questi ultimi con leggi di scala già presenti in letteratura al fine di attestare l'affidabilità del metodo di misura; si sono poi confrontati due diversi sistemi di misura usati per studiare le gocce generate: un sistema ottico integrato nella piattaforma tramite una guida di luce di cui poi viene analizzato il segnale in tensione dovuto all'interferenza fra la goccia passante nel canale e il fascio luminoso che attraversa la guida e un sistema di imaging che studia le immagini delle gocce che attraversano il canale, raccolte da una telecamera posta al di sotto della piattaforma. Sono state ricavate delle relazioni che permettono di calibrare l'apparato in modo da ottenere parametri fondamentali, come la lunghezza e il Numero Capillare delle gocce, utilizzando soltanto le grandezze ricavate dal sistema di misura ottico senza dover necessariamente utilizzare un sistema di imaging. Un risultato molto promettente che è stato ottenuto è la formulazione di una nuova legge di scala che lega la frequenza di generazione delle gocce al Numero Capillare di queste ultime (e dunque alla loro velocità) mediante una proporzionalità diretta. In ultimo si sono studiati anche alcuni possibili sviluppi futuri della caratterizzazione del sistema, come ad esempio l'identificazione della transizione fra due diversi regimi di produzione attraverso i soli parametri ottici e la descrizione dell'asimmetria della goccia tramite particolari indicatori di forma.

Abstract

The objectives of the following thesis are the characterization and study of the droplets production method called *co-flowing streams* which uses of a microfluidic junction called cross-junction, integrated in an opto-microfluidic platform constructed using a LiNbO_3 substrate. Experimental data were collected for different droplet production regimes, to then compare the latter with scale laws already present in the literature in order to certify the reliability of the measurement method; then we compared two different measurement systems used to study the generated droplets: an optical system integrated into the platform by using a light guide whose voltage signal is then analyzed to catch the interference between the drop passing through the channel and the light beam that goes through the guide and an imaging system that studies the images of the drops that cross the canal, collected by a camera placed below the platform. Relations have been obtained that allow to calibrate the apparatus in order to obtain fundamental parameters, such as the length and the Capillary Number of the droplets, using only the quantities obtained from the optical measuring system without necessarily having to use an imaging system. A very promising result that has been obtained is the formulation of a new scale law that links the frequency of drop generation to the Capillary Number of the latter (and therefore to their speed) through direct proportionality. Lastly, some possible future developments of the system characterization were studied, such as the identification of the transition between two different production regimes through optical parameters only and the description of the asymmetry of the droplet through particular shape indicators.

INDICE

Introduzione	1
1 Microfluidica a gocce usando la configurazione cross-junction	4
1.1 Produzione di gocce	4
1.2 Formazione di gocce in cross-junction e parametri descrittivi	5
2 Setup sperimentale	8
2.1 Dispositivo opto-microfluidico	8
2.1.1 Cenni sulla fabbricazione del dispositivo	9
2.2 Setup ottico	10
2.3 Misure Effettuate	11
3 Presentazione e discussione dei risultati	18
3.1 Confronto con generazione di gocce standard	18
3.1.1 Misure di lunghezze in microfluidica	19
3.1.2 Commenti di confronto fra i due metodi	21
3.2 Verifica delle leggi di scala note in letteratura	23
3.3 Leggi di scala: nuove applicazioni	25
3.3.1 Nuove leggi di scala	25
3.3.2 Misura geometrica di transizione	27
3.3.3 Misure di asimmetria della goccia	29
3.4 Conclusioni e prospettive future	30
A Software utilizzati nell'analisi dati	32
A.1 Segnale ottico	32
A.2 Tracking	33
Bibliografia	36

INTRODUZIONE

L'opto-microfluidica consiste nell'integrazione di componenti microfluidiche e microfotoniche all'interno della stessa piattaforma nella quale fluidi e luce sono fatti interagire fra loro. Questa combinazione offre nuove opportunità per un'ampia varietà di applicazioni: fra le più interessanti vi sono i biosensori, essi infatti, efficaci e compatti, combinano l'alta sensibilità dei dispositivi di micro-fotonica alle diverse proprietà delle piccole quantità di fluido inserite al loro interno.

La microfluidica è stata sviluppata originariamente per la stampa a getto d'inchiostro e in seguito è stata utilizzata per la biotecnologia e la chimica micro-analitica. Infatti, in microfluidica, i volumi dei reagenti possono essere fortemente ridotti, passando da millilitri o microlitri fino a nanolitri o femtolitri in modo che il tempo di reazione scenda drasticamente.

Grazie ai grandi progressi ottenuti nelle tecniche di manipolazione dei fluidi nella scala dei micrometri, si sono potuti realizzare sofisticati networks microfluidici, includendo tutti i tipi di dispositivi (come pompe, valvole, mixers e microcanali), con i quali manipolare, muovere e controllare i fluidi all'interno di un chip compatto. In tali basi, la tecnologia del lab-on-a-chip ha avuto un forte successo, grazie al fatto che permette di condurre svariate analisi e diagnosi biologiche parallelamente all'interno di piattaforme microfluidiche miniaturizzate. Fra tutte le caratteristiche necessarie per l'integrazione optofluidica, la compattezza e la messa a punto sono state considerate fondamentali per poter raggiungere un alto grado di funzionalità e integrazione su larga scala.

Sono stati ideati un gran numero di dispositivi optofluidici altamente adattabili in modo da portare nuovi strumenti nelle applicazioni dell'ottica integrata, come attenuatori, laser e sorgenti luminose optofluidiche, filtri, interruttori ottici e interferometri. In gran parte dei casi i dispositivi proposti sfruttano configurazioni ibride e sono stati progettati per permettere solamente analisi specifiche come ad esempio lo spostamento di un

bersaglio in una precisa direzione con la possibilità di tracciare quest'ultimo attraverso tecniche di imaging. In questi casi, il circuito microfluidico è stato realizzato generalmente con particolari materiali flessibili e facilmente modellabili (polimeri PDMS o PMMS) mentre invece le componenti ottiche vengono realizzate mediante fibre ottiche esterne integrate o realizzate in un substrato solido (vetro, silicone ...) al quale il circuito microfluidico è legato tramite tecnologie non riconfigurabili [2].

Inoltre, quando vengono utilizzate configurazioni ibride, la stabilità e il preciso allineamento delle diverse componenti sono sempre un problema, specialmente per la riproducibilità delle misure. Solo recentemente è stato proposto il primo dispositivo optofluidico monolitico, perfettamente allineato, robusto e portatile, adatto all'analisi medica, nel quale sia i circuiti microfluidici che le guide d'onda ottiche sono fabbricate simultaneamente in un substrato di vetro mediante la tecnica FLM (Femtosecond Laser Micromachining) [1]. Nonostante i principali vantaggi della tecnologia FLM siano la possibilità di creare simultaneamente sia le guide d'onda che i canali microfluidici e anche la sua estrema manovrabilità nelle tre dimensioni che permette la fabbricazione di canali microfluidici con giunzioni a Y o a X di forma variabile, anche in questo caso, le caratteristiche del dispositivo, una volta scelte, rimangono fissate. Ciò si è rivelato vero anche per i dispositivi "droplet-based", ovvero quelli che si focalizzano nella creazione di volumi discreti (gocce) usando fasi immiscibili fra loro.

Grazie alla possibilità di modificarne la scala e di compiere diversi processi in parallelo, infatti, anche la microfluidica a gocce è stata utilizzata in un ampio range di applicazioni che includono la sintesi di biomolecole, lo spostamento di farmaci, i test diagnostici e il "bio-sensing".

Sebbene i dispositivi a flusso continuo offrano un preciso controllo sulle caratteristiche del flusso, il loro aumento di dimensioni è problematico poiché la dimensione dei dispositivi è direttamente proporzionale al numero di processi che essi sono in grado di compiere in parallelo. La microfluidica a gocce invece ha la caratteristica di permettere un gran numero di reazioni senza dover necessariamente aumentare le dimensioni o la complessità del dispositivo utilizzato, ha anche una grande versatilità legata alla generazione e manipolazione di gocce discrete all'interno dei micro-dispositivi.

Nello scenario presentato, l'integrazione di un gran numero di stadi differenti, all'interno di un chip con un singolo substrato, è un punto chiave per promuovere nuovi approfondimenti riguardanti le varie applicazioni che necessitano di dispositivi portatili per aumentare la velocità dell'analisi e permettere l'investigazione di nuovi fenomeni o per progredire nell'analisi in tempo reale e nelle investigazioni dinamiche. Fra tutti i materiali usati, i cristalli di niobato di litio LiNbO_3 sono stati proposti per applicazioni microfluidiche fin da quando tale materiale si è dimostrato essere integrabile ad altri materiali polimerici e di permettere la creazione, altamente efficiente, di onde sonore di superficie (SAW) che permettono lo spostamento di gocce nel substrato in un modo altamente controllato. Inoltre sono state proposte alcune tecniche di confinamento di particelle dal punto di vista piroelettrico e fotogalvanico.

Sorprendentemente, tutte le applicazioni sopra menzionate sono state realizzate senza

creare un circuito microfluidico direttamente nei substrati di LiNbO_3 e senza integrare stadi di sensing ottico o complesse piattaforme multifunzionali, nonostante esso sia un materiale ampiamente sfruttato nell'industria fotonica e dell'ottica integrata. Difatti, il niobato di litio può ospitare guide d'onda ottiche di alta qualità, sono infatti disponibili commercialmente dispositivi complessi come "multiplexer", interruttori e modulatori ottici: la tecnica di in-diffusion del Titanio è sfruttata di routine assieme alla fotolitografia standard per la produzione di circuiti ottici. Questo lavoro cerca dunque di studiare la possibilità di realizzare una piattaforma opto-microfluidica capace di contare, rivelare e categorizzare le particelle disperse in un fluido, come possono essere ad esempio delle gocce o dei campioni biologici, utilizzando un nuovo approccio che sorpassa i limiti e i legami degli ingombranti sistemi di analisi basati su strumenti di imaging (come ad esempio i microscopi) e post data processing, oggi ampiamente standardizzati.

Gli scopi di questo lavoro di tesi sono, quindi, la caratterizzazione e lo studio del metodo di produzione di gocce detto *co-flowing streams*, che fa uso di una giunzione micro-fluidica di tipo cross-junction integrata nel dispositivo opto-microfluidico sopra descritto. Tale studio prevede il confronto con leggi di scala già esistenti in letteratura e la proposta di nuove e più precise leggi di scala o di calibrazione per il suddetto dispositivo. La tesi pertanto, oltre ad una descrizione teorica della cross-junction e alla descrizione del setup sperimentale presenti nei primi due capitoli, si può suddividere in quattro parti in cui vengono analizzati i dati sperimentali:

- Nella sezione 3.1 viene analizzato il legame presente fra la lunghezza effettiva della goccia, misurata tramite il sistema di imaging, e la lunghezza temporale di quest'ultima che si ottiene attraverso il sistema ottico integrato. Infine vengono confrontate le prestazioni dei due sistemi.
- Nella sezione 3.2 si verifica che i dati raccolti rispettino le leggi di scala già presenti in letteratura e usate per descrivere configurazioni analoghe.
- Nella sezione 3.3 viene proposta una nuova legge di scala per una descrizione del sistema basata su parametri ottici e vengono poi analizzate alcune nuove applicazioni come misure geometriche di transizione e di asimmetria della goccia.
- Nella sezione 3.4 infine sono presenti le conclusioni in cui sono presentati i risultati ottenuti e le prospettive future.

CAPITOLO

1

MICROFLUIDICA A GOCCE USANDO LA CONFIGURAZIONE CROSS-JUNCTION

1.1 Produzione di gocce

La formazione delle gocce nei dispositivi microfluidici è un fenomeno di mescolamento di due fasi immiscibili, affinché tale processo sia riproducibile è necessario controllare in modo accurato e preciso i relativi flussi. Si denota come fase continua, il liquido in cui sono formate le gocce e come fase dispersa quello di cui le gocce sono formate. Le due fasi vengono fatte interagire attraverso dei micro-canali per generare gocce tramite varie metodologie, divisibili in due categorie: attive e passive. Il metodo è detto attivo se sono presenti parti mobili o attivazioni esterne che interagiscono con i fluidi, mentre invece è detto passivo se tali elementi non sono utilizzati. Considerato l'ordine di grandezza delle dimensioni in cui si lavora in microfluidica, i generatori passivi sono molto meno complessi e delicati di quelli attivi, per questo motivo sono anche quelli più utilizzati.

Ciò che differenzia i vari generatori passivi è la geometria con cui i due canali vengono collegati, in modo da avere un'interazione tra i 2 liquidi. Si riportano in figura 1.1 alcuni degli esempi di geometrie di generatori passivi microfluidici di gocce più frequentemente adoperate: in sezione (a) è raffigurata la geometria di Co-flow streams, che consiste nello scorrimento parallelo tra i due liquidi; la tecnica del Flow focusing è mostrata in sezione (b), si basa sulla formazione di gocce tramite il passaggio dei fluidi attraverso

una strozzatura; in sezione (c), infine, è rappresentata la configurazione di T-junction, che consiste nell'avere una giunzione a T tra i canali delle 2 fasi. Inoltre nella figura sono presentati 3 esempi di regimi di lavoro: dripping, jetting e co-flow (rispettivamente da destra verso sinistra in figura) dei 3 sistemi di generazione gocce suddetti. Il primo consiste nella generazione di gocce in una zona vicina all'incontro tra i canali delle due fasi, nel secondo invece si ha il distacco della goccia da una coda di liquido della fase dispersa uscente dal canale della stessa, e infine il terzo consiste nel flusso parallelo dei 2 liquidi senza la produzione di gocce. La presenza di uno dei tre regimi è dovuta a molteplici parametri (ad esempio la geometria dei canali, le proprietà fisiche dei liquidi), una trattazione completa dell'argomento è presente in [3].

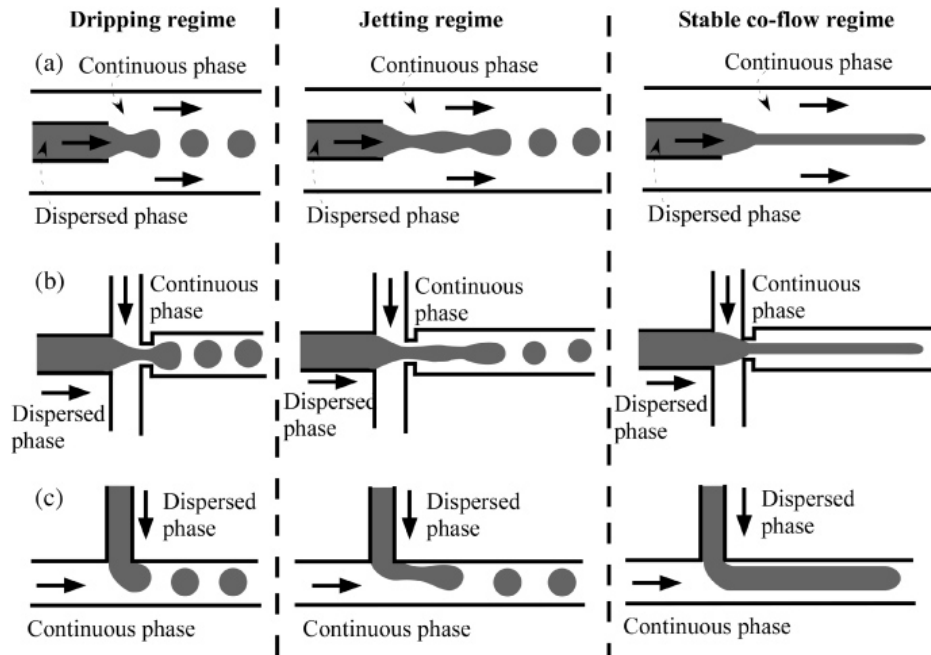


Figura 1.1: Schema in cui vengono raffigurati i metodi di generazione di gocce passivi: (a) Co-flow streams, (b) Flow focusing, (c) T-junction.

1.2 Formazione di gocce in cross-junction e parametri descrittivi

La configurazione utilizzata in questo lavoro di tesi è detta cross-junction, attraverso di essa è possibile creare delle gocce tramite co-flow (detto anche flow-focusing), tale metodo è caratterizzato dalla formazione di gocce tramite il flusso parallelo della fase dispersa e di quella continua. La descrizione di queste verrà fatta con il minor numero possibile di parametri geometrici (come le dimensioni del circuito o della giunzione microfluidica), infatti l'unico parametro utilizzato sarà la larghezza del canale $w_c \sim (200 \pm 1) \mu m$ (o alternativamente la sezione S del canale ottenuta conoscendo l'altezza $h_c \sim (98 \pm 2) \mu m$).

Come gran parte delle configurazioni utilizzate in microfluidica la fase dispersa viene introdotta attraverso un unico canale centrale, nel co-flow però, diversamente dagli altri casi, la fase continua viene introdotta attraverso la cross-junction, ovvero mediante due canali posti perpendicolarmente ai due lati di quello della fase continua, la geometria utilizzata inoltre è la più semplice possibile, non essendoci strozzature o orifizi nella giunzione, l'unico parametro geometrico necessario nella descrizione è la larghezza del canale.

Oltre alle grandezze geometriche possono essere introdotti altri 5 parametri per descrivere i fluidi che vengono utilizzati nella produzione di gocce: i valori dei flussi delle due fasi nei singoli canali Q_D e Q_C (dunque il flusso totale della fase continua sarà $2Q_C$), le viscosità dinamiche dei due fluidi μ_D e μ_C e infine la tensione superficiale fra le fasi σ , a partire da essi verranno introdotti anche altri 3 parametri adimensionali: il rapporto fra i flussi $\Phi = Q_D/2Q_C$, il rapporto di viscosità $\eta = \mu_D/\mu_C$ e il Numero Capillare Ca . Il Numero Capillare è un parametro particolare, esso infatti descrive l'effetto relativo delle forze viscosive che tendono a deformare l'interfaccia fra i due fluidi in contrapposizione alla tensione superficiale associata ad essi che invece tende a minimizzare la loro superficie. È immediato dunque comprendere il motivo per cui si è deciso di utilizzare tale parametro per la descrizione della formazione di gocce nell'apparato. Questo particolare parametro dunque può essere definito in vari modi:

$$\text{per la fase continua: } Ca_C = \frac{1}{S} \frac{\mu_C Q_C}{\sigma} \quad \text{per la fase dispersa: } Ca_D = \frac{1}{S} \frac{\mu_D Q_D}{\sigma}$$

Oppure, la definizione utilizzata nel caso studiato, molto più precisa delle precedenti poichè si riferisce direttamente alla goccia, sarà $Ca = \mu_C V_d / \sigma$ dove V_d è la velocità della singola goccia che può essere stimata a partire dai dati raccolti.

Esistono due principali regimi di produzione di gocce in configurazione di co-flowing streams e sono lo Squeezing e il Dripping (tali regimi sono descritti con maggior precisione in [5] e [7]). Nello Squeezing la fase dispersa si rompe e forma delle gocce direttamente nella giunzione o nelle sue immediate vicinanze con il menisco che si ritrae immediatamente all'indietro dopo il distacco di queste, in tale regime le gocce sono monodisperse e hanno le dimensioni legate a quelle del canale, solitamente sono più lunghe della larghezza del canale e non hanno una forma sferica poichè fortemente confinate dalle pareti di questo, le gocce formate mediante tale metodo inoltre vengono dette "plug". Nel regime di Dripping, invece, la fase dispersa si rompe più lontano dalla giunzione e il menisco non si ritrae all'indietro ma mantiene la propria forma allungata, le gocce prodotte sono generalmente uguali o più piccole delle dimensioni del canale e molto frequenti. Si può avere infine un regime ancora più estremo rispetto a quello di dripping, detto jetting, in cui la rottura della fase dispersa avviene molto lontano dalla giunzione, al termine di un sottile tubo di fase dispersa, detto "thread", che si allunga all'interno del canale uscente dalla giunzione anche per molte volte la larghezza di quest'ultimo.

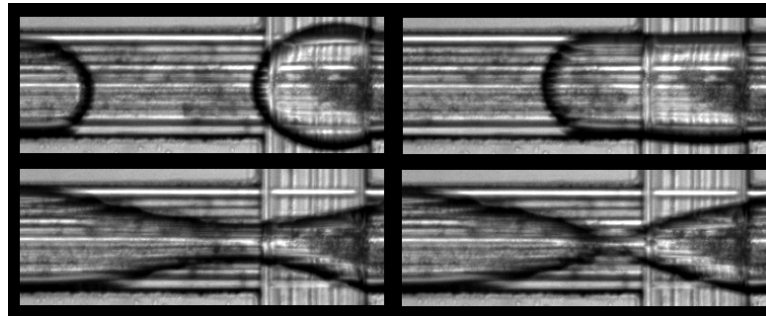
Si osserva infine che la separazione fra i due regimi non è ben definita ma, al variare

dei flussi o delle viscosità, si può passare da un regime all'altro in modo continuo.

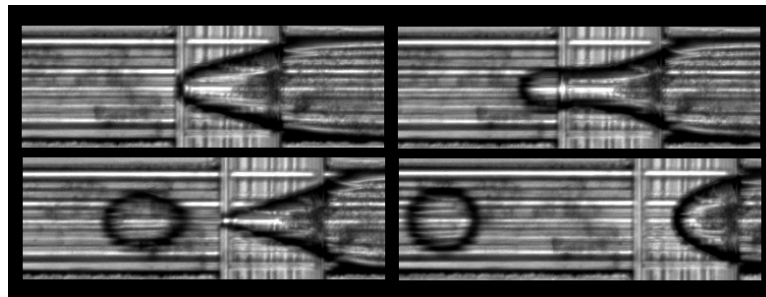
Si vuole ora descrivere il processo di formazione di una goccia di tipo "plug" nel regime di Squeezing, esso si suddivide in 3 stadi: inizialmente il flusso (thread) di fase dispersa attraversa la giunzione entrando completamente nel canale in uscita ostruendo il passaggio della fase continua, poi il flusso di fase continua proveniente dai due canali verticali causa la formazione di una strozzatura nel tubo di fase dispersa che si assottiglia con una certa velocità, infine la strozzatura che collega la goccia con il canale da cui proviene la fase dispersa collassa rapidamente e si ritrae all'indietro liberando la goccia.

Per tale tipologia di gocce si osserva spesso la formazione di gocce secondarie, dette "satellite", di forma sferica e dimensioni molto inferiori rispetto alla goccia originale, esse si creano in seguito alla rottura della strozzatura che collega la goccia con la fase dispersa ed hanno un comportamento caotico o in generale imprevedibile (si muovono avanti e indietro all'interno della fase dispersa fra due gocce consecutive).

Nella seguente figura 1.2 si possono osservare i diversi stadi della produzione di una goccia nella cross-junction in regime di Squeezing e di Dripping, l'ordine di lettura di questi ultimi è da sinistra verso destra e inizia dal fotogramma in alto a sinistra finendo con quello in basso a destra.



(a) *Squeezing.*



(b) *Dripping.*

Figura 1.2: Fotogrammi del menisco di fase dispersa durante la produzione di una goccia.

SETUP SPERIMENTALE

2.1 Dispositivo opto-microfluidico

Il dispositivo che è stato utilizzato nell'intero periodo di raccolta dati è un circuito microfluidico, di dimensioni $23 \times 18 \text{ mm}$, realizzato su di un cristallo di Niobato di Litio nel quale sono state integrate delle guide di luce ed è stato scavato il canale in cui scorre il fluido.

Il canale è caratterizzato da due parti principali: la prima è un tratto rettilineo che occupa quasi completamente il chip nel senso della lunghezza ed è attraversato perpendicolarmente dalle guide di luce, la seconda invece è formata dall'intersezione fra due canali ed è la zona nella quale vengono generate le gocce, può essere una giunzione a T che quindi produrrà gocce per cross-flowing oppure una giunzione a X che invece produrrà gocce per co-flowing o flow-focusing. La configurazione usata in questo caso sarà dunque quella della giunzione a X. Si osserva inoltre che all'entrata di ciascun canale sono fissati dei tubi in silicone che permettono di collegarsi con il sistema di pompaggio del fluido e al termine del canale con lo scarico. Il chip, per poter funzionare, deve essere rifornito costantemente di fluido. Per fare ciò sono utilizzate tre pompe microfluidiche che permettono il controllo del flusso del fluido iniettato, il sistema infatti permette di impostare un certo valore di flusso che viene mantenuto costante modificando la pressione attraverso un meccanismo di feedback in grado di misurare il flusso e apportare la necessaria correzione in pressione per stabilizzarlo al valore prescelto. Tale apparato inoltre si rifornisce da delle provette sigillate e riempite del fluido usato per la misura.

Le caratteristiche tecniche del sistema di pompaggio sono le seguenti:

- OB1 MK3 pressure driver pump con 3 canali a 0 – 8 *bar* e uno a 0 – 200 *mbar*, risoluzione dei sensori: 0.006%, stabilità: 0.005%, tempo di risposta: 9 *ms*;
- Flussimetri BFS Coriolis Bronkhorst messi in feedback con il controllore in pressione, flusso minimo: 1.6 $\mu\text{L}/\text{min}$, flusso massimo 3.3 mL/min , accuratezza 0.2%, tempo di risposta: 35 *ms*.
- Software ad hoc per il controllo delle pompe, dei flussimetri e del sistema di feedback, rilasciato dall'azienda produttrice.

Le guide d'onda che attraversano perpendicolarmente il canale invece sono create drogando localmente il substrato con titanio mediante diffusione termica. Hanno la funzione di confinare la luce al loro interno per riflessione totale interna, analogamente ad una fibra ottica. La luce che passa al loro interno pertanto ha lo scopo di illuminare le gocce nel canale per poi essere raccolta dalla guida d'onda allineata di fronte sull'altro lato e giungere ad un apparato adibito a misurarne l'intensità.

Si può osservare in figura 2.1 uno schema che rappresenta l'intero apparato utilizzato per la misura e per il funzionamento del circuito microfluidico:

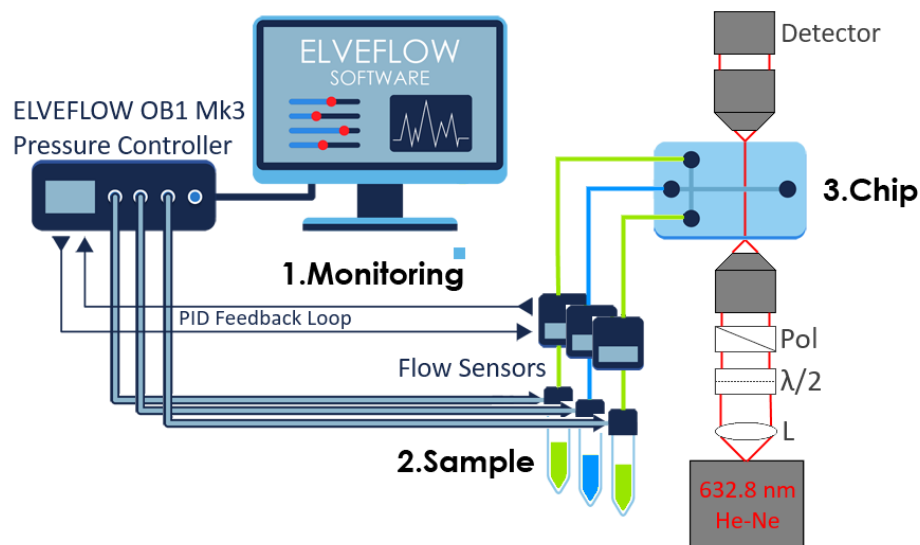


Figura 2.1: Apparato utilizzato

2.1.1 Cenni sulla fabbricazione del dispositivo

Sono stati compiuti già alcuni studi per la progettazione e la funzionalizzazione del canale microfluidico e la creazione delle guide d'onda sul substrato di LiNbO_3 , da parte del gruppo di ricerca di Padova, pertanto in questa sezione verranno solamente ricordati i passaggi principali necessari alla realizzazione del dispositivo.

La componente microfluidica del chip è formata da un canale scavato lungo la direzione cristallografica y del substrato, le sue dimensioni nominali sono $(200 \pm 1) \mu m$ di larghezza per $(98 \pm 2) \mu m$ di profondità. Per incidere nel materiale una scanalatura con tali caratteristiche perciò è necessario utilizzare una lama con qualità ottiche in modo che le pareti del canale siano lucide e abbastanza definite da permettere un accoppiamento ottimale con la guida di luce. Il canale realizzato deve poi essere sigillato con quella che sarà la parete superiore del suddetto, per farlo viene incollato un coperchio di vetro attraverso un fotopolimero (NOA68). Al termine del canale sono poi praticati sul coperchio dei fori di diametro pari a 2 mm che aprono ai cosiddetti pozzetti, su di essi sono poi fissati dei tubi in silicone MASTERFLEX usando una piccola quantità di PDMS, un polimero che viene fatto successivamente reticolare con un trattamento a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ per 2 ore. Da tali pozzetti verrà poi iniettato il fluido (inlet) oppure raccolto il fluido in uscita (output).

Per quanto riguarda invece la componente ottica, le guide d'onda sono state realizzate mediante il drogaggio con Titanio del Niobato di Litio mediante diffusione termica, perché tale tecnica è già stata ampiamente testata e garantisce un elevato grado di riproducibilità, ciò causa un incremento importante dell'indice di rifrazione, dell'ordine di $\sim 10^{-2}$, nella zona drogata che porta al conseguente confinamento guidato della luce laser che vi passa all'interno.

2.2 Setup ottico

Il circuito microfluidico è accoppiato in modo integrato ad una guida d'onda che trasporta la luce di un laser He-Ne al circuito microfluidico in modo da illuminare il fluido e raccogliere l'intensità trasmessa. La luce laser è accoppiata alla guida d'onda mediante la tecnica *Near Field* che è basata sull'accoppiamento ottico delle due, sia in entrata che in uscita dell'apparato microfluidico. Per realizzare le misure perciò è stato adibito l'apparato strumentale in figura 2.2 che comprende i componenti elencati in seguito.

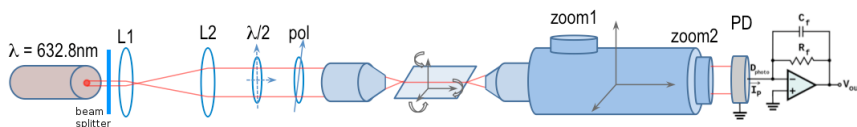


Figura 2.2: Segnale in tensione di una singola goccia

- Sorgente laser di He-Ne con lunghezza d'onda di 632.8 nm e una potenza nominale di 4 mW ;
- Beam Splitter che divide il fascio alla percentuale di intensità $24\% - 76\%$;
- Lente cofocale che permette di collimare il fascio;

- Lamina $\lambda/2$ e polarizzatore regolabile che permettono di selezionare la polarizzazione della sorgente in modo da eccitare entrambi i modi TE e TM della guida d'onda;
- Obiettivo $20\times$ che focalizza il fascio laser sulla superficie del campione garantendo un accoppiamento in guida a *butt-coupling*;
- il campione sul quale è integrato il dispositivo microfluidico attraverso un supporto che permette di ruotarlo e traslarlo in tutte direzioni attraverso dei micrometri con sensibilità pari a $1\ \mu m$ nelle tre direzioni;
- Microscopio posizionato orizzontalmente al termine della guida d'onda, dotato di un obiettivo $20\times$ e due livelli di zoom, sistemato su di un supporto mobile nelle 3 direzioni che permette l'accoppiamento del fascio uscente dalla guida d'onda con un rivelatore al termine del microscopio;
- PIN Diode (fotodiodo al silicio) per rivelazione di luce visibile che può essere posizionato sull'obiettivo del microscopio in modo tale da misurare l'intensità del fascio luminoso in uscita dalla guida;
- Oscilloscopio analogico, amplificatore a transimpedenza che amplifica e trasforma il segnale in corrente in segnale in voltaggio (guadagno 10^7) e FAST acquisition card che permettono di rielaborare il segnale del fotodiodo e fornirlo ad un pc dotato di un apposito software in grado di registrare e visualizzare il segnale in uscita dal circuito.
- Telecamera Basler acA800-510um di risoluzione $800 \times 600\ px$ e sensore CMOS.

Il setup descritto necessita perciò di una minuziosa procedura di accoppiamento in guida d'onda sia del segnale in entrata (laser) con la guida che del segnale in uscita dalla guida con l'obiettivo del microscopio.

2.3 Misure Effettuate

La procedura di misura può essere suddivisa in due fasi differenti, la prima è fase preliminare nella quale si prepara l'apparato per compiere le misure, mentre la seconda è la fase di misura vera e propria. A queste si aggiunge una fase iniziale nella quale viene misurata la tensione superficiale fra i fluidi utilizzati nelle misure seguenti.

Misura di tensione superficiale dei due fluidi utilizzati

Per l'analisi dei dati, i sistemi di misura forniscono tutte le grandezze necessarie eccetto due: la viscosità dinamica dell'acqua e la tensione superficiale, necessarie per la valutazione del Numero Capillare delle gocce. Mentre la viscosità dell'acqua è stata trovata nel database "Dortmund Data Bank" (fonte: http://www.ddbst.com/en/EED/PCP/VIS_C516.php) ed è pari a $\mu_D = (3.01 \pm 0.01)\ Pa \cdot s$, la tensione superficiale fra

la fase dispersa (ovvero acqua distillata Milli-Q) e quella continua (ovvero Esadecano con concentrazione al 3% di SPAN80) deve essere stimata sperimentalmente.

Per calcolare la tensione superficiale dunque si utilizza il cosiddetto *pendant drop method* che consiste nel seguente setup sperimentale: una siringa riempita del liquido a maggior densità (dunque la fase dispersa) immersa in un recipiente colmo del liquido a densità minore (dunque la fase continua), una sorgente luminosa alle loro spalle e una telecamera con con obiettivo telescopico. Si è in grado di far fuoriuscire un volume di liquido molto piccolo dalla siringa, grazie ad una strumentazione molto precisa, e dunque si creano delle gocce di acqua, immerse nell'olio, in procinto di staccarsi dall'ago che vengono fotografate. Le immagini delle gocce sono poi analizzate attraverso un plugin del software *ImageJ* che ricava un fit della superficie della goccia e sfruttando la fisica del sistema riesce a ricavarne la tensione superficiale; nello specifico il funzionamento di questo plugin è descritto nell'articolo [9].

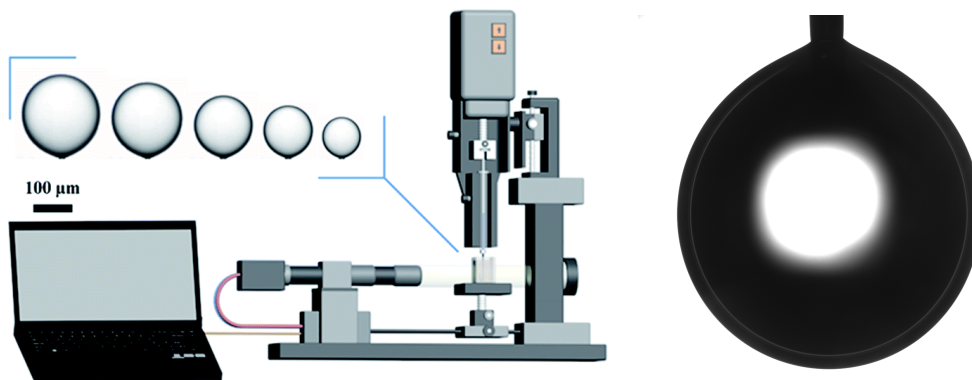


Figura 2.3: Setup utilizzato per la misura e immagine di una pendant drop di acqua Milli-Q in Esadecano con SPAN80 al 3%.

Andando a misurare la tensione superficiale per diverse concentrazioni di SPAN80 in esadecano, spaziando per più di due ordini di grandezza, si trova che la soluzione al 3% è ben al di sopra della concentrazione micellare critica (detta CMC) la quale è il punto in cui l'andamento lineare del grafico della tensione superficiale al variare della concentrazione cambia pendenza, tale andamento lo si nota in figura 2.4.

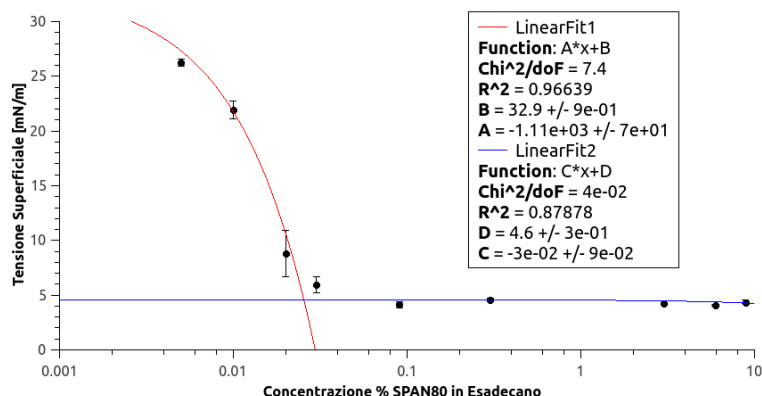


Figura 2.4: Grafico della tensione superficiale per varie concentrazioni di SPAN80 in esadecano (per poter distinguere bene i dati l'asse delle ascisse è in scala logaritmica, per questo motivo le funzioni rappresentate, pur essendo rette, hanno un andamento non lineare).

Dato che la formazione di gocce nella piattaforma microfluidica avviene più semplicemente se la fase continua ha una concentrazione superiore alla CMC allora per questo motivo si giustifica la scelta di Esadecano con concentrazione al 3% di SPAN80 come fase continua per tutte le misure successive.

Si osserva infine che il valore misurato della tensione superficiale fra i fluidi prescelti per le prossime misurazioni è pari a: $\sigma = (4.27 \pm 0.04) \text{ mN/m}$.

Allineamento

Nella fase iniziale si rifornisce il dispositivo di pompaggio con i fluidi che si vogliono usare, nel caso in esame si utilizza una giunzione a X per avere cross-flowing, pertanto si devono riempire tre serbatoi (provette), uno con il fluido in fase dispersa (ovvero acqua distillata Milli-Q) e due con il fluido in fase continua (ovvero Esadecano con concentrazione al 3% di SPAN80). Si avvia poi il sistema di pompaggio iniettando inizialmente olio nel canale, dopodichè si impostano i flussi prestabiliti nei 3 canali e si aspetta che questi si stabilizzino; il sistema di pompaggio infatti, usa un metodo a feedback e dunque ha bisogno di un certo tempo per raggiungere il flusso desiderato. Nel presente lavoro di tesi i flussi sono stati scelti nell'intervallo: $Q_D \in [5; 40] \mu\text{L}/\text{min}$ $Q_C \in [2.5; 82.5] \mu\text{L}/\text{min}$.

Inoltre, è necessario accoppiare il laser con la guida d'onda prescelta e analogamente il microscopio ricevitore con l'uscita della guida, si va pertanto a movimentare i micrometri che controllano la posizione del circuito fino a che il laser non si accoppia con l'entrata della guida. Per capire quando si è in accoppiamento si possono osservare due cose: l'obiettivo del microscopio, per capire se il laser è effettivamente puntato all'ingresso della guida e il segnale in tensione rilevato dal fotodiodo al termine del microscopio, è necessario infatti che il segnale di fondo (dovuto al contributo della fase continua) sia costante e compreso in un voltaggio che va da 0.5 V a 1 V e che si possa riconoscere una perturbazione importante nel momento in cui il fascio luminoso viene attraversato da una goccia di fase dispersa.

Acquisizione

A seguito della procedura di allineamento le misure microfluidiche vengono effettuate misurando l'intensità luminosa trasmessa attraverso la fase dispersa, si visualizzano le gocce che attraversano il canale con due modalità differenti: si osserva il segnale legato al passaggio di gocce nel canale dal punto di vista ottico, ovvero il segnale associato all'intensità luminosa trasmessa e la perturbazione rispetto al fondo dovuta al passaggio della goccia attraverso la guida di luce, oppure possono essere osservate anche dal punto di vista video, inquadrando una sezione del canale. In questo caso si può osservare il canale attraverso la telecamera scegliendo accuratamente il numero di frame al secondo, in modo da fotografare la stessa goccia almeno 6-7 volte durante l'attraversamento della porzione di canale inquadrata, e il tempo di esposizione dell'obiettivo (fissato

per tutte le misure a $100 \mu s$). Le misure sono state effettuate al variare dei flussi della fase dispersa e di quella continua dopo aver aspettato che questi si stabilizzino raggiungendo un plateau, un esempio di segnale acquisito è riportato in figura 2.5, esso è espresso in voltaggio (ovvero l'output del rilevatore PIN al silicio) che è direttamente proporzionale all'intensità luminosa rilevata. Il sistema di misura permette di registrare il segnale in voltaggio della guida in funzione del tempo (di durata all'incirca $15 s$) e contemporaneamente salvare un video (di durata all'incirca $1500 frame$) delle gocce nel canale.

Si è deciso di osservare un range di flussi che variano all'incirca per un ordine di grandezza prendendo misure con il metodo sopra descritto per tutti i seguenti valori di flusso:

Tabella 2.1: Range di flussi delle misure effettuate

$Q_d (\mu L/min)$	$Q_c (\mu L/min)$
5	2.5-5-7.5-10-12.5-15-17.5-20-22.5-25-27.5-30-32.5-35-37.5-40-42.5-45
10	5-10-15-20-25-30-35-40-45-50-55-60-65-70
15	5-7.5-15-22.5-30-37.5-45-52.5-60-67.5-75-82.5
20	10-15-20-25-30-35-40-45-50-55-60-65-70-75
25	12.5-25-37.5-50-62.5

In aggiunta sono state raccolte delle misure anche per i seguenti valori dei flussi delle due fasi:

$Q_d (\mu L/min)$	30	35	40
$Q_c (\mu L/min)$	15-30	17.5-35	20-40

Le misure sono state poi analizzate con due specifici software descritti in dettaglio nell'appendice A, uno per analizzare il file con il segnale in voltaggio, raffigurato schematicamente in figura 2.5, e uno per analizzare il segnale video, ovvero i fotogrammi raccolti dalla telecamera. Nell'appendice inoltre viene spiegato anche come vengono ricavate, dai software, le varie grandezze a partire dai dati "grezzi".

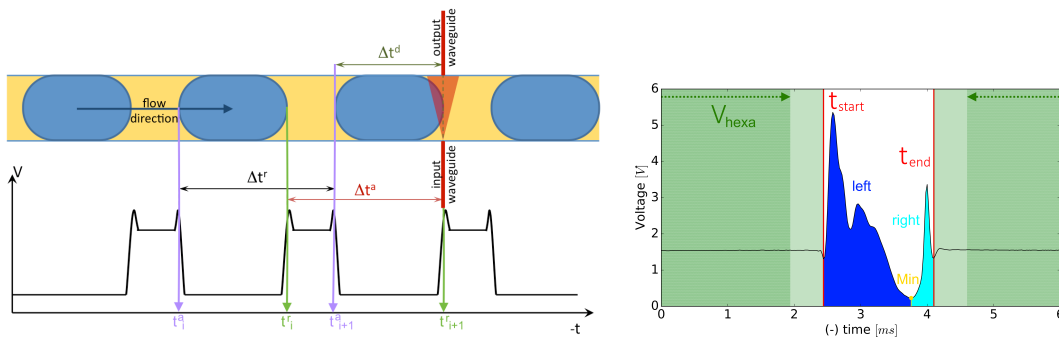


Figura 2.5: Segnale ottico associato alle gocce e grandezze ricavate

Nel prosieguo si descrive brevemente il funzionamento di tali software e le grandezze fisiche rielaborate da questi ultimi.

Il primo software ricava, partendo dal segnale in voltaggio, alcune grandezze tipiche di ciascuna goccia, come la lunghezza (in ms), la frequenza destra ($1/\Delta t_r$) e sinistra ($1/\Delta t_s$), ovvero l'inverso del tempo necessario per il passaggio di due gocce successive, l'integrale del segnale, l'integrale destro, l'integrale sinistro (compresi anche gli integrali normalizzati rispetto al segnale di fondo della fase continua) e infine il minimo della goccia (anche questo normalizzato rispetto al fondo). L'integrale destro e sinistro si riferiscono al fatto che oltre all'integrale completo della goccia, esso può essere calcolato anche dal minimo destro o da quello sinistro fino al minimo assoluto della goccia. Per quanto riguarda le frequenze destra e sinistra invece si calcolano andando ad osservare il picco, nel segnale in voltaggio, corrispondente al menisco destro o quello corrispondente al menisco sinistro della goccia, questi infatti differiscono a seconda che si prenda come riferimento la salita o la discesa del segnale in tensione.

Si riporta in figura 2.5 uno schema esemplificativo delle grandezze misurate mentre invece in figura 2.6 si può osservare un esempio degli istogrammi, forniti in output dal software, di queste ultime calcolate per un preciso valore di Q_d e Q_c .

Tali grandezze sono dunque misurate per ciascuna goccia presente nel segnale in voltaggio e poi raccolte in un istogramma dal quale si ricava il valor medio e la deviazione standard di ciascun parametro. Si è osservato poi, per ciascuna misura, che l'istogramma ottenuto per lo scarto delle misure effette da errore casuale seguisse un andamento gaussiano come ci si aspetta per un qualsiasi set di misure ripetute di una stessa grandezza.

Nel caso delle frequenze inoltre, dato che rappresentano valori ottenuti analizzando la distanza temporale fra i picchi del segnale in tensione associati a due gocce successive, può essere presente una correlazione dovuta al fatto che per calcolare due valori consecutivi di frequenza si utilizza uno stesso dato (il picco centrale viene contato due volte). Per questo motivo si è andati a verificare a posteriori l'effetto di utilizzare la distanza fra due picchi consecutivi per il calcolo delle frequenze. Per ogni misura si è quindi costruito un istogramma con i dati di frequenza ottenuti scegliendo casualmente due picchi del segnale e calcolandone la distanza temporale (ottenendo dunque dati scorrelati fra loro) per capire se questo influisse o meno sul risultato finale. Si è visto però che per ciascuna misura l'istogramma associato allo scarto di tali misure aveva un andamento gaussiano e aderiva perfettamente con quello delle misure ottenute con gocce consecutive (nonostante l'area sottesa fosse inferiore dato che vengono considerate meno gocce). Si è deciso pertanto di considerare valide le misure ottenute da gocce consecutive.

In seguito viene presentata una tabella con i valori raccolti per le frequenze destre e sinistre sia correlate che scorrelate per un certo valore dei flussi Q_d e Q_c dalla quale si nota l'ottima compatibilità fra tutti questi valori:

Tabella 2.2: Valori delle frequenze con $Q_d = 10 \mu L/min$ e $Q_c = 20 \mu L/min$ per 250 gocce

	Frequenza sinistra (kHz)	Frequenza destra (kHz)
misura correlata	0.04169 ± 0.00008	0.04169 ± 0.00007
misura scorrelata	0.04170 ± 0.00008	0.04170 ± 0.00007

Il secondo software utilizzato nell'analisi invece analizza i video raccolti dalla telecamera, frame per frame, applicando un algoritmo di tracking sulle singole gocce e interpolando i menischi di queste ultime usando degli ellissi; in questo modo è possibile ricavare i seguenti parametri da una singola goccia: lunghezza (in pixel ma poi convertita in μm), velocità della goccia (in $\mu m/s$), larghezza e altezza degli ellissi destro e sinistro (in μm). Come per il software precedente, i valori calcolati per la singola goccia sono raccolti in un istogramma e dopo aver verificato che abbia un andamento gaussiano, si trova valor medio e deviazione standard dei vari parametri per ogni misura.

Al termine della procedura sopra descritta, dopo averla applicata in ciascun set di dati, si ottiene una misura precisa dei vari parametri caratteristici delle gocce generate per co-flow da precisi valori di flusso del fluido disperso e di quello continuo (elencati nella tabella 2.1).

Ecco ora degli esempi degli istogrammi forniti in output dai due software:

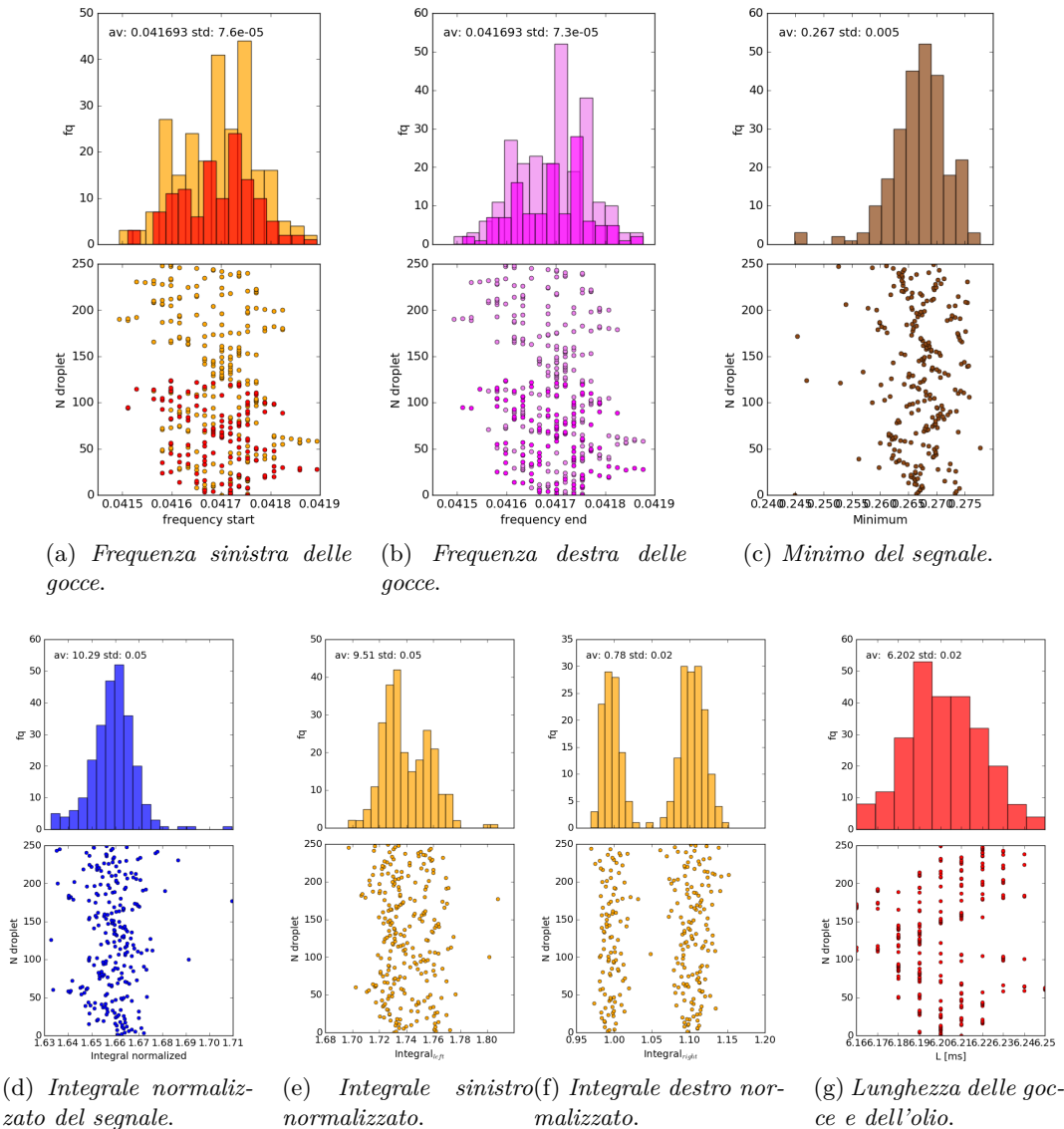


Figura 2.6: Istogrammi delle grandezze ottiche.

Gli istogrammi in figura 2.6 sono un esempio di quelli forniti in output dal programma che rielabora il segnale ottico, ciascuno di essi è composto da due parti, nella parte inferiore si ha un grafico con il numero che identifica ciascuna goccia nelle ordinate e il valore della grandezza misurata nelle ascisse, tale grafico è molto utile per vedere come si dispongono tali grandezze nel tempo all'interno del campione (e trovare eventuali errori nel computo delle grandezze da parte del programma), nella parte superiore invece è presente il vero e proprio istogramma che raccoglie le frequenze delle grandezze misurate da cui si ricava il loro valor medio e la deviazione standard.

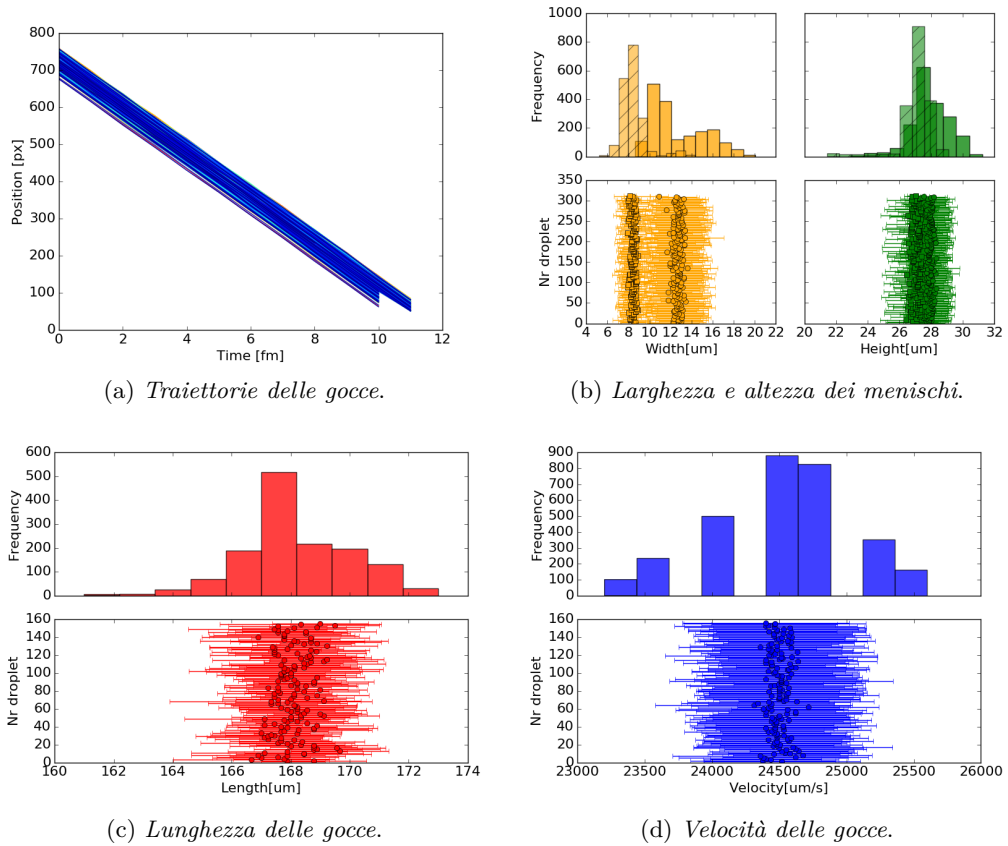


Figura 2.7: Istogrammi delle grandezze video.

Gli istogrammi in figura 2.7 invece sono un esempio particolare degli istogrammi che vengono costruiti dal software che analizza i file video, ciascuno di questi ultimi è caratterizzato da due parti che sono costruite nello stesso modo descritto nel paragrafo precedente sul software che analizza i segnali ottici, eccetto per il grafico delle traiettorie il quale invece rappresenta semplicemente le leggi orarie delle gocce analizzate, in un grafico che esprime la posizione (in pixel) al variare del tempo.

CAPITOLO

3

PRESENTAZIONE E DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Si desidera confrontare la performance di un sistema di misura basato su imaging e relativa analisi con quella di un sistema che si basa su trasmissione e rilevazione in ottica integrata, in modo da comprendere il legame fra grandezze diverse ricavate a partire da questi ultimi. In particolare si vuole capire se il sistema di misura ottico che sfrutta la luce laser accoppiata alla guida d'onda, è in grado sostituire completamente il sistema basato su imaging, fornendo delle grandezze che rispettino le leggi di scala presentate in letteratura.

3.1 Confronto con generazione di gocce standard

Il primo parametro che si va ad osservare è la lunghezza della goccia, questa si può ottenere in due modi differenti a seconda dei sistemi di misura utilizzati; a partire dai singoli frame dei video raccolti dalla telecamera, la lunghezza si ottiene come il valor medio della distanza fra i punti apicali dei due menischi, anteriore e posteriore, della goccia e viene denotata con $L[\mu m]$. Se si utilizza invece il sistema ottico, la lunghezza della goccia viene calcolata come il valor medio della distanza temporale fra i minimi destro e sinistro del segnale associato a ciascuna goccia e viene denotata con $L[ms]$. In questo caso però non è detto che tali minimi siano effettivamente gli estremi dei due menischi che compongono la goccia, ciò infatti dipende da come la luce uscente dalla guida d'onda viene diffratta dal menisco della goccia di fase dispersa, perciò a causa di tale errore sistematico, tale lunghezza non è la reale lunghezza della goccia.

Si può osservare uno schema della goccia di tipo plug e delle due diverse metodologie

usate dai software per stimare le lunghezze nella figura 3.1.

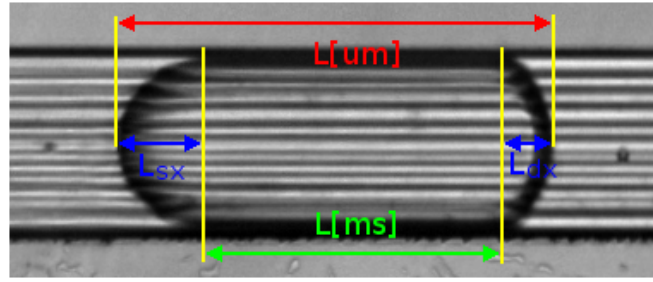


Figura 3.1: Immagine di una goccia di tipo "plug" con le diverse lunghezze ricavabili da questa.

Dunque, a causa dell'errore sistematico sopra citato, le lunghezze calcolate con i due diversi metodi sono legate dalla seguente relazione:

$$L[\mu m] - \Delta L \propto L[ms]$$

dove la grandezza $\Delta L = \Delta L_{sx} + \Delta L_{dx}$ è definita come la somma delle due distanze fra i punti apicali dei menischi destro e sinistro e i punti spaziali associati alla misura dei minimi del segnale da parte del sistema ottico. Inoltre, ΔL_{sx} e ΔL_{dx} non sono di norma identici, come ad esempio mostra la figura 3.1.

3.1.1 Misure di lunghezze in microfluidica

Si vuole ora mettere a confronto i due diversi metodi di misura delle lunghezze, per far ciò devono dunque essere trovate delle relazioni che leghino fra loro $L[\mu m]$ e $L[ms]$.

La prima relazione proposta è:

$$L[\mu m] - \Delta L \propto V \cdot L[ms]$$

dove la grandezza V è semplicemente la velocità della goccia, necessaria per ottenere una relazione dimensionalmente esatta (dato che la lunghezza temporale della goccia è essenzialmente la lunghezza spaziale divisa per la sua velocità).

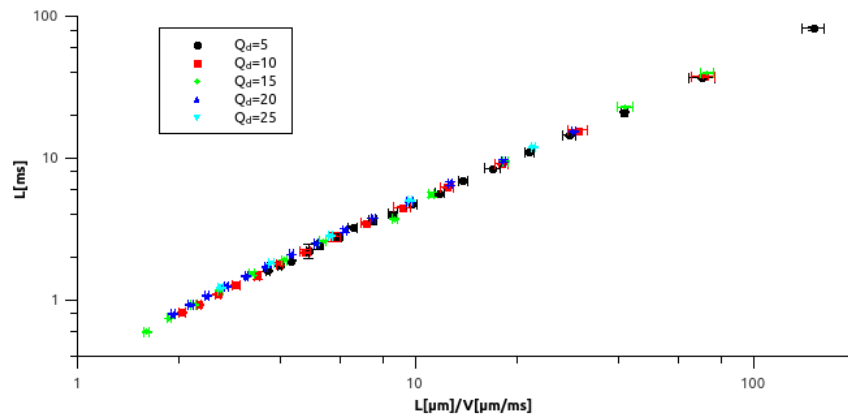


Figura 3.2: Grafico delle lunghezze $L[ms]$ vs. $L[\mu m]/V$ per i diversi valori di Q_d

Dalla relazione descritta sopra è dunque evidente il rapporto di linearità che intercorre fra la lunghezza temporale e la lunghezza spaziale divisa per la velocità della goccia (ottenuta analizzando i dati del sistema di imaging). Pertanto è possibile verificare tale andamento graficamente, anche nei dati sperimentali, come riportato in figura 3.2; si osserva inoltre che in quest'ultima sono rappresentate $L[ms]$ vs. $L[\mu m]/V$ in modo da separare i dati ottenuti mediante il sistema di misura ottico da quelli ottenuti attraverso il sistema di imaging.

Dalla interpolazione lineare fra i due valori utilizzando la formula: $L[ms] = A \cdot L[\mu m]/V + B$ si ottengono infine i seguenti parametri:

A	0.5249 ± 0.0008
$B [ms]$	-0.213 ± 0.003
R^2	0.999
χ^2/dof	26.3

Come si osserva in figura 3.2 è possibile interpolare i dati raccolti con medesimi A e B e dunque con un'unica retta, indipendentemente dal valore di Q_d ; si ottiene dunque una legge che permette di trovare la lunghezza temporale reale delle singole gocce (ovvero la distanza temporale fra i punti apicali dei due menischi) a partire dalla loro lunghezza temporale ricavata dal segnale in voltaggio.

Un'altra relazione che può essere utilizzata per esprimere il legame fra le due lunghezze è la seguente:

$$L[\mu m] - \Delta L \propto Fq \cdot L[ms]$$

dove Fq è la frequenza di formazione delle gocce di fase dispersa (ottenuta mediante il sistema ottico), in questo modo si mette in relazione un parametro "video", fornito da analisi di imaging, come la lunghezza spaziale ad un parametro ottico proporzionale alla lunghezza della goccia (sebbene non sia la reale lunghezza a causa dell'errore sistematico già descritto nel paragrafo precedente), dato dal prodotto fra la frequenza delle gocce (che è direttamente proporzionale alla loro velocità) e la loro lunghezza temporale.

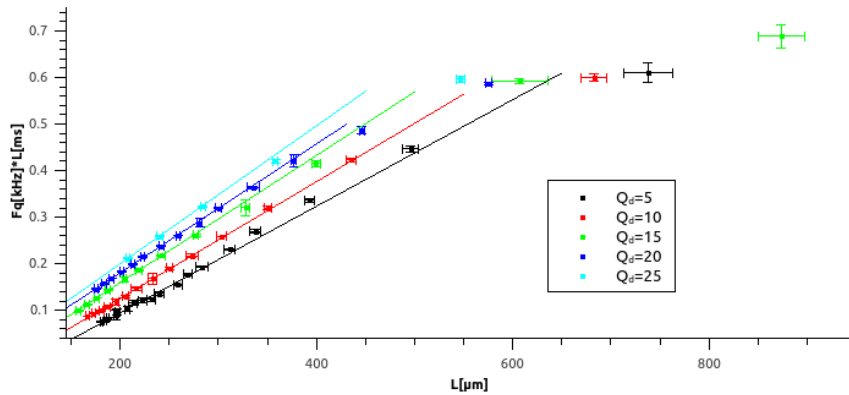


Figura 3.3: Grafico delle lunghezze $Fq \cdot L[ms]$ vs. $L[\mu m]$

Rappresentando le due grandezze in un piano cartesiano pertanto si osserva in figura 3.3 che i dati sperimentali rispettano l'andamento lineare nella forma della relazione:

$Fq \cdot L[ms] = A \cdot L[\mu m] + B$ dove però in questo caso la dipendenza lineare è differente per valori diversi del flusso della fase dispersa.

Nel compiere le regressioni lineari sono stati utilizzati solamente i dati con lunghezza contenuta nel dominio delle semirette rappresentate in figura, i dati esclusi infatti erano incompatibili (oltre il 3σ) con la regressione lineare. Compiendo l'interpolazione lineare si ottengono tali parametri per ciascun valore di Q_d :

Q_d [$\mu L/min$]	A [μm^{-1}]	B	R^2	χ^2/dof
5	$(1.14 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	$(-1.35 \pm 0.02) \cdot 10^{-1}$	0.996	6.6
10	$(1.252 \pm 0.009) \cdot 10^{-3}$	$(-1.25 \pm 0.02) \cdot 10^{-1}$	0.999	1.8
15	$(1.37 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	$(-1.14 \pm 0.04) \cdot 10^{-1}$	0.999	2.2
20	$(1.38 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	$(-9.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-2}$	0.999	1.7
25	$(1.48 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$	$(-9.6 \pm 0.9) \cdot 10^{-2}$	0.999	0.1

Si possono poi porre in un grafico il coefficiente angolare e il termine noto delle singole rette che interpolano i dati per capire come essi varino al variare di Q_d ottenendo la figura 3.4.

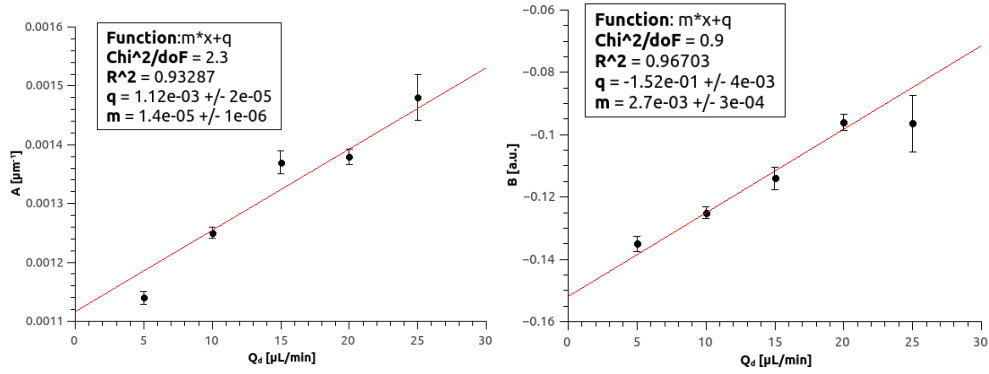


Figura 3.4: Grafico dei parametri d'interpolazione A e B in funzione di Q_d

Si trova perciò che sia il coefficiente angolare che il termine noto crescono linearmente con Q_d seguendo l'andamento descritto dai parametri dell'interpolazione in figura.

Anche in questo caso perciò è possibile ricavare una legge che legni l'effettiva lunghezza spaziale della goccia alla sua lunghezza temporale (parziale, per via del già citato errore sistematico) e alla sua frequenza di formazione.

3.1.2 Commenti di confronto fra i due metodi

Si sono trovate dunque due relazioni che legano la lunghezza temporale misurata attraverso il sistema ottico alla lunghezza reale della goccia (temporale in un caso e spaziale nell'altro) che è quella misurata con il sistema video. Pertanto, grazie alle leggi che sono state ricavate, è sempre possibile ottenere la lunghezza effettiva di una goccia, creata con precisi valori di flusso della fase dispersa e di quella continua, solamente effettuando le misure di tipo ottico e conoscendo i parametri lineari ricavati nei fit precedenti, rendendo il sistema video non necessario per la misura delle lunghezze.

Un'ulteriore commento riguarda l'errore casuale relativo sulle lunghezze al variare dei flussi e dunque al variare del parametro Φ per i principali valori scelti per il flusso della fase dispersa. È possibile confrontare l'errore casuale relativo sulle lunghezze ottenute mediante il sistema ottico e quello sulle lunghezze ottenute mediante il sistema video per verificare se il sistema ottico permette di avere una precisione paragonabile a quella garantita dal sistema video.

Va detto inoltre che si è deciso che l'errore casuale associato alle grandezze misurate (in questo caso associate alle lunghezze) sia la deviazione standard e non l'errore associato al valor medio, questa scelta è giustificata dal fatto che le misure effettuate non sono misure ripetute di una stessa grandezza fissata ma sono invece misure relative a lunghezze di gocce differenti. Per questo motivo se al loro valor medio si andasse ad associare l'errore casuale del valor medio si andrebbe a sottostimare l'effettivo errore della misura, si è scelta dunque la deviazione standard poichè rappresenta un intervallo d'errore fisicamente più significativo.

A questo punto è possibile rappresentare in un istogramma al variare di Φ gli errori casuali relativi associati a $L[\mu m]$ e a $L[ms]$ per confrontarli e capire quale dei due sistemi sia più preciso; nella figura 3.5 è stato presentato un istogramma esemplificativo (quello relativo al flusso della fase dispersa pari a $Q_d = 25 \mu L/min$).

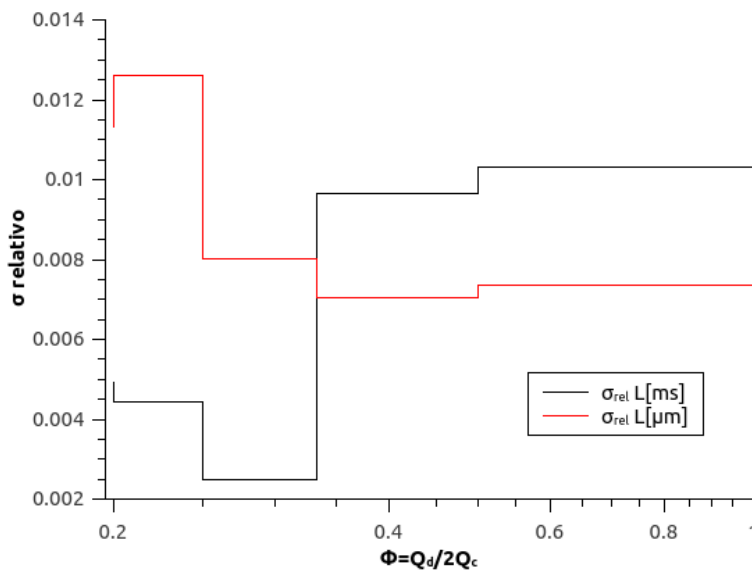


Figura 3.5: Istogramma degli errori relativi sulle lunghezze al variare di Φ per $Q_d = 25 \mu L/min$.

Come si può notare in tale istogramma, l'errore relativo associato alla lunghezza ottenuta dal sistema ottico è paragonabile a quello associato alla lunghezza ottenuta dal sistema di imaging. Tutto ciò inoltre lo si verifica per l'intero campione delle misurazioni effettuate ottenendo dei valori tali per cui entrambi appartengono ad un range che va dallo 0.1% al 2% (in alcuni casi può essere presente un'eccezione per cui l'errore relativo su $L[ms]$ è molto più grande, ciò è dovuto ai possibili errori nel calcolo delle lunghezze che può compiere il programma).

3.2 Verifica delle leggi di scala note in letteratura

In letteratura sono presenti svariate leggi di scala per descrivere come varia la lunghezza di una goccia al variare dei flussi di fase continua e dispersa o al variare della sua velocità, tali leggi sono state sempre verificate utilizzando piattaforme microfluidiche standard fabbricate in PDMS o PMMA (polimetil-metacrilato) nel quale vengono scavati i canali microfluidici, esse inoltre hanno diversa bagnabilità e si interfacciano diversamente con il fluido rispetto alla piattaforma da noi usata.

Si vuole perciò verificare la validità di due delle principali leggi di scala che legano la lunghezza adimensionale della goccia (si usa in entrambi i casi la lunghezza $L[\mu m]$ ottenuta dai dati video), calcolata come: $L[\mu m]/w$ (dove w è la larghezza del canale) ai principali parametri adimensionali che descrivono le due fasi microfluidiche, ovvero Φ e Ca .

La prima legge di scala presa in esame è: $L/w = \alpha(\Phi/Ca)^\beta$

questa interpretazione è stata proposta nell'articolo [6] in cui si ipotizza che essa abbia la forma: $L/w = 1.59(\Phi/Ca)^{0.2}$ con un range di validità dato da $L/w \in [1;6]$ e $Ca \lesssim 10^{-1}$. Pertanto si costruisce un grafico di L/w in funzione di Φ/Ca , rappresentato in figura 3.6, differenziando dati con diversi valori di flusso della fase dispersa e si va a verificare che l'andamento dei due sia ben descritto dalla formula ipotizzata.

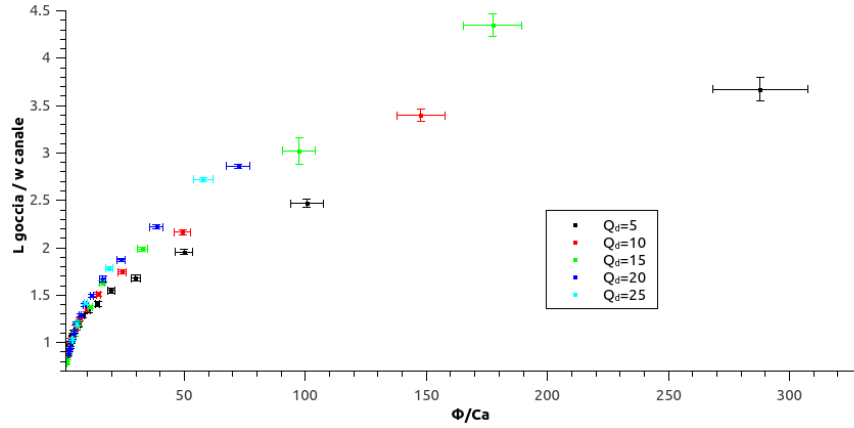


Figura 3.6: Grafico di L/w in funzione di Φ/Ca per i diversi valori di Q_d

Si può ora compiere un'interpolazione dei dati sperimentali rappresentati, attraverso la funzione polinomiale presentata sopra, utilizzando come algoritmo di calcolo lo "Scaled Levenberg-Marquardt" con tolleranza 10^{-4} ; si ottengono dunque i seguenti parametri dall'interpolazione:

Q_d [$\mu L/min$]	α	β	R^2	χ^2/dof
5	$(8.05 \pm 0.04) \cdot 10^{-1}$	$(2.18 \pm 0.03) \cdot 10^{-1}$	0.999	0.6
10	$(7.83 \pm 0.03) \cdot 10^{-1}$	$(2.47 \pm 0.02) \cdot 10^{-1}$	0.999	0.2
15	$(7.23 \pm 0.07) \cdot 10^{-1}$	$(2.82 \pm 0.06) \cdot 10^{-1}$	0.999	1.1
20	$(6.92 \pm 0.04) \cdot 10^{-1}$	$(3.18 \pm 0.02) \cdot 10^{-1}$	0.999	0.6
25	$(6.80 \pm 0.02) \cdot 10^{-1}$	$(3.28 \pm 0.01) \cdot 10^{-1}$	0.999	0.03

Come si osserva dai parametri dell'interpolazione, essi non coincidono esattamente con quelli proposti nell'articolo [6] ma hanno lo stesso ordine di grandezza, tale differenza è dovuta proprio al fatto che la piattaforma microfluidica studiata in questo caso non è la stessa di quella utilizzata nella proposta; infine si nota che anche in questo caso i parametri dipendono linearmente dal flusso della fase dispersa come rappresentato in figura 3.7.

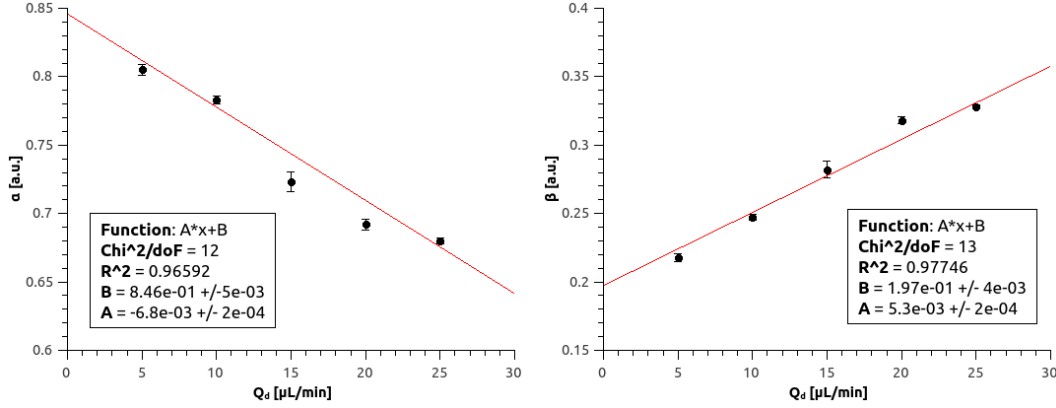


Figura 3.7: Grafico dei parametri d'interpolazione α e β in funzione di Q_d

In seguito si è deciso di prendere in esame una seconda legge di scala, proposta nell'articolo [8], nella forma:

$$L/w = (\epsilon + \omega\Phi)Ca^{-m}$$

in cui ϵ e ω sono dei parametri adimensionali che possono dipendere sia dalla geometria del canale che dal rapporto di viscosità η . Si sono dunque rappresentate in un grafico cartesiano le grandezze L/w e Ca per alcuni valori fissati di Φ , ovvero $\Phi = \{1; 0.5; 0.33; 0.25; 0.2\}$, interpolandole ciascuna con la funzione polinomiale: $L/w = k \cdot Ca^{-m}$ come si può notare in figura 3.8.

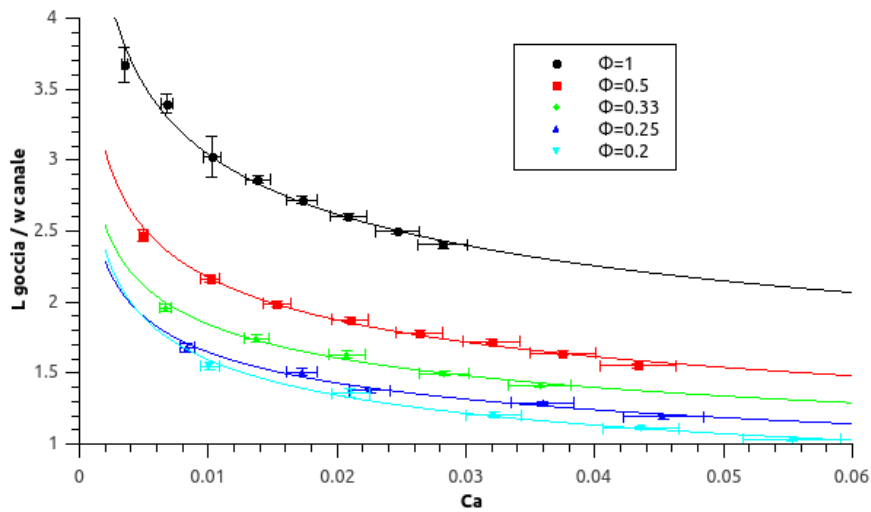


Figura 3.8: Grafico di L/w in funzione di Ca

Dalla procedura di interpolazione si ottengono i seguenti parametri per i diversi valori di Φ :

Φ	k	m	R^2	χ^2/dof
1	1.02 ± 0.01	$(2.41 \pm 0.04) \cdot 10^{-1}$	0.999	0.1
0.5	$(7.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-1}$	$(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-1}$	0.991	1.6
0.33	$(6.7 \pm 0.3) \cdot 10^{-1}$	$(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-1}$	0.995	0.7
0.25	$(6.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-1}$	$(2.1 \pm 0.3) \cdot 10^{-1}$	0.977	2.2
0.2	$(4.60 \pm 0.06) \cdot 10^{-1}$	$(2.81 \pm 0.04) \cdot 10^{-1}$	0.999	0.03

Si può infine rappresentare in un grafico il parametro moltiplicativo k al variare di Φ per verificare che effettivamente questi segua un andamento lineare come previsto dalla legge di scala e ricavare i due parametri ϵ e ω come si nota nella figura 3.9.

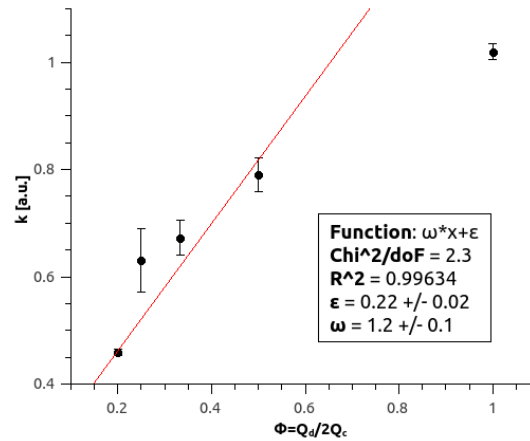


Figura 3.9: Grafico del parametro k della legge di scala in funzione di Φ

3.3 Leggi di scala: nuove applicazioni

Nella sezione precedente si è visto che la piattaforma microfluidica utilizzata rispetta le principali leggi di scala presenti in letteratura ed inoltre è stato dimostrato che non è necessaria la presenza di una telecamera per studiare dal punto di vista visivo le caratteristiche principali delle gocce generate, l'apparato di misura ottico infatti fornisce tutte le grandezze necessarie.

Ora dunque è possibile studiare le grandezze fornite dall'apparato ottico per trovarne nuove applicazioni nello studio delle gocce generate dalla piattaforma microfluidica.

3.3.1 Nuove leggi di scala

Elaborando i dati forniti dall'apparato di misura ottico si ottengono la frequenza destra e sinistra delle gocce, ovvero le frequenze calcolate utilizzando solamente i picchi destri/sinistri del segnale in tensione (come descritto in appendice A), si nota che tali frequenze sono compatibili ottimamente fra loro caso per caso, dunque è possibile ricavare una frequenza di generazione delle gocce facendo una media dei due valori.

Se si dispone in un grafico con la frequenza nelle ordinate e il Numero Capillare nelle ascisse, rappresentato in figura 3.10, si nota immediatamente che queste due grandezze

sono legate da una diretta proporzionalità.

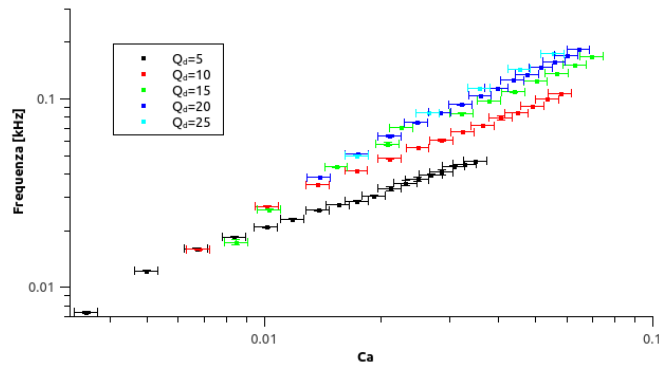


Figura 3.10: Grafico della frequenza in funzione di Ca

Si possono dunque interpolare i dati con una retta della forma $Fq = A \cdot Ca + B$ per ogni differente valore del flusso della fase dispersa ottenendo i seguenti parametri come risultato:

Q_d [$\mu L/min$]	A [kHz]	B [kHz]	R^2	χ^2/dof
5	1.090 ± 0.005	$(9.92 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	0.997	19.1
10	1.582 ± 0.003	$(1.54 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	0.999	18.9
15	2.242 ± 0.003	$(1.16 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	0.999	77.4
20	2.726 ± 0.004	$(6.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$	0.999	31.0
25	3.04 ± 0.01	$(5.9 \pm 0.6) \cdot 10^{-3}$	0.999	5.1

L'andamento lineare di tali grandezze permette di formulare una nuova legge di scala che legghi la frequenza al Numero Capillare mediante una proporzionalità lineare. Infine si osserva che la pendenza di tali rette è direttamente proporzionale al flusso della fase dispersa, infatti ciò è evidente se li si mette in un grafico in funzione di quest'ultima e se ne compie una regressione lineare, come rappresentato nella figura 3.11.

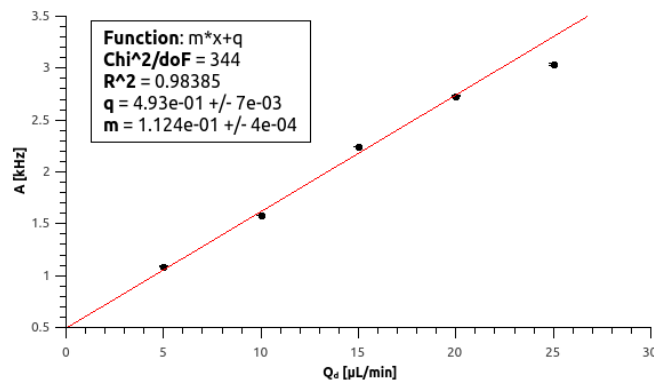


Figura 3.11: Grafico del coefficiente angolare di Fq vs. Ca al variare di Q_d

Da tale retta dunque è possibile ricavare i coefficienti angolari delle singole rette conoscendo il flusso della fase dispersa e in questo modo si potrà predire il Numero Capillare

a partire dalla frequenza o viceversa, infatti si avrà la seguente relazione:

$$Fq = (m \cdot Q_d + q) \cdot Ca + B$$

in cui tutti i parametri di proporzionalità sono stati stimati (m , q e B) e il parametro B può oscillare in un range $B \in [10^{-3}; 10^{-2}]$.

3.3.2 Misura geometrica di transizione

Si possono analizzare ora anche altre grandezze fornite dal sistema di misura ottico, come ad esempio l'integrale normalizzato del segnale in tensione, ovvero l'area sottesa dalla porzione di curva fra i due minimi destro e sinistro che rappresenta la goccia di fase dispersa, normalizzata con il valore in tensione del segnale di fondo dovuto alla fase continua. Si può analizzare anche il minimo assoluto del segnale in tensione associato alla goccia normalizzato al fondo. Il significato della definizione di entrambe le grandezze è spiegato in appendice A.

Queste due grandezze vengono osservate per i vari valori fissati del flusso della fase dispersa al variare del parametro Φ e rappresentate nel piano cartesiano in figura 3.12. Si può osservare inoltre come la variazione di tali parametri ottici possa essere descritta altrettanto bene se al posto del parametro Φ la si osserva al variare della grandezza adimensionale L/w che rappresenta la lunghezza della goccia normalizzata alla larghezza del canale, come si nota in figura 3.13.

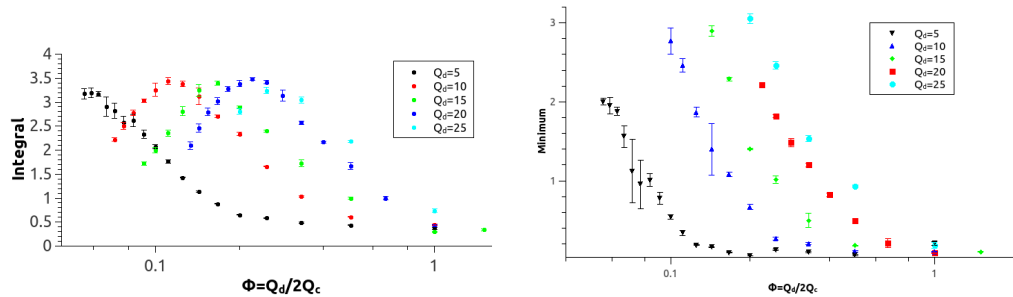


Figura 3.12: Grafico di integrale normalizzato e minimo assoluto del segnale al variare di Φ

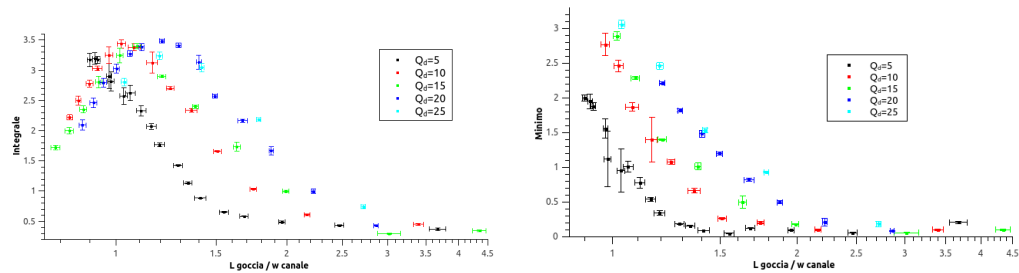


Figura 3.13: Grafico di integrale normalizzato e minimo assoluto del segnale al variare di L/w

I parametri analizzati dipendono dalla forma della goccia, infatti si osserva che per valori alti di Φ e di L/w , quando la goccia è di tipo plug, l'integrale e il minimo sono

all'incirca costanti, dato che la goccia ha sempre lo stesso effetto sul fascio luminoso indipendentemente dalla sua lunghezza. Al diminuire di Φ invece la goccia tende ad assumere una forma sempre più vicina a quella sferica e ad avere un effetto sempre più importante sul fascio luminoso, infatti a causa della sua forma l'effetto lente e la conseguente focalizzazione del fascio di luce influisce sempre di più e ciò causa un segnale sempre più piccato, di conseguenza l'integrale e il minimo tenderanno ad assumere valori sempre maggiori.

Nel caso dell'integrale inoltre, diversamente dal minimo, al di sotto di un certo valore di Φ o di L/w il valore inizia a decrescere, questo andamento particolare può essere spiegato osservando il tipo di goccia in questione. Com'è noto, al diminuire di Φ , quando si passa ad un regime di dripping, la goccia assume una forma sempre più sferica, in queste condizioni però la goccia può essere tangente alle pareti del canale e dunque confinata, oppure può avere un diametro inferiore alla larghezza del canale e dunque essere libera al suo interno. Per questo motivo, mentre l'integrale dovrebbe crescere sempre di più all'aumentare della sfericità della goccia per via della focalizzazione del fascio luminoso, si nota che esiste un punto in cui esso inizia a diminuire a causa della diminuzione delle dimensioni della suddetta, infatti, se diminuiscono le dimensioni delle gocce, esse focalizzano una sezione sempre minore del fascio di luce e dunque la perturbazione nel segnale in tensione dovuta a queste ultime diminuisce.

Si nota poi nella figure 3.12 e 3.13 una transizione piuttosto continua, con la forma di una funzione sigmoidale tipica di una transizione di fase, da un regime di squeezing ad uno di dripping, tutto ciò influenza la forma delle gocce e di conseguenza i loro principali parametri ottici come l'integrale e il minimo.

Infine si può osservare come i valori critici di Φ ed L/w per i quali si ha una transizione fra due regimi differenti, ovvero il punto in cui la goccia passa da una forma di tipo plug ad una sferica e il punto in cui le dimensioni della goccia diventano inferiori a quelle del canale, siano differenti per valori diversi del flusso della fase dispersa. La dipendenza da Q_d di questi punti particolari permette di ipotizzare che tali valori dipendano in qualche modo dalla velocità della goccia e dunque al Numero Capillare, pertanto, per includere tale dipendenza, si potrà graficare l'integrale normalizzato e il minimo in funzione di Ca , come in figura 3.14.

Da quest'ultima si può notare immediatamente come i punti critici in tal caso coincidano per tutti i differenti valori di Q_d ; infine, interpolando i dati attorno a tali valori critici si potrà ottenerne una stima:

- Interpolando i dati nei pressi del punto in cui le gocce passano da "plug" a sferiche (che è molto più evidente nel grafico *Min vs. Ca*) con due rette e calcolandone l'intersezione si può stimare tale valore critico come: $Ca_1 \sim 1.4 \cdot 10^{-2}$;
- Interpolando i dati nei pressi del punto in cui le dimensioni delle gocce diventano inferiori a quelle del canale (ovvero nel picco del grafico *Int vs. Ca*) attraverso una curva polinomiale di terzo grado e trovandone le coordinate del picco si ottiene una stima del valore critico: $Ca_2 \sim 3.8 \cdot 10^{-2}$.

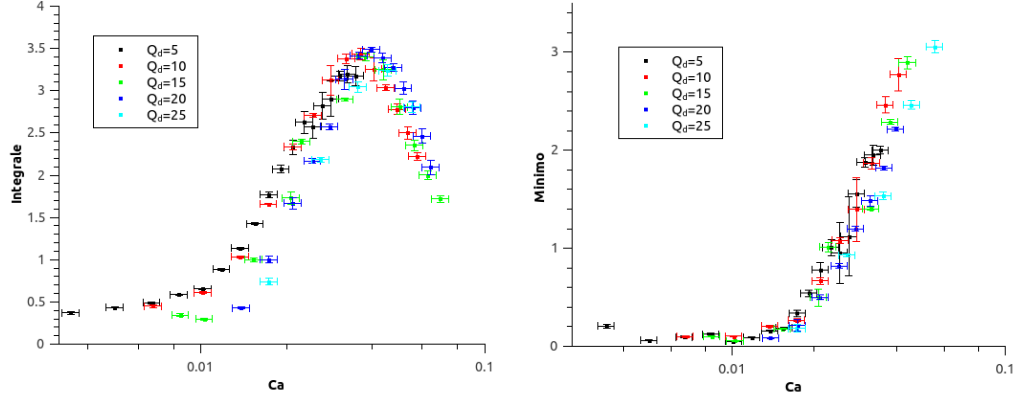


Figura 3.14: Grafico di integrale normalizzato e minimo assoluto del segnale al variare di Ca

3.3.3 Misure di asimmetria della goccia

Infine è possibile studiare la simmetria delle varie gocce di fase dispersa che vengono create modificando i flussi delle due fasi, ovvero si va ad osservare la forma dei menischi destro e sinistro di ogni goccia. Per valutare la simmetria di ogni singola goccia sono necessari degli indicatori di forma, ovvero dei parametri che siano pari a 1 quando i due menischi sono perfettamente identici mentre invece assumano valori differenti se i menischi hanno forme diverse, tali parametri inoltre possono essere sia di tipo ottico (ovvero provenire dal sistema di misura costituito dall'ottica integrata) che di tipo video (ovvero provenire dal sistema di misura basato su imaging).

Le grandezze utilizzate per costruire tali parametri pertanto sono sei, i due integrali destro (I_r) e sinistro (I_l) del segnale in tensione (la cui definizione è in appendice A), l'altezza (H_r ; H_l) e la larghezza (W_r ; W_l) degli ellissi destro e sinistro che interpolano la superficie dei menischi destro e sinistro presenti nelle gocce del segnale video (anche in questo caso la definizione è in appendice A). A partire dalle grandezze misurate dal sistema di imaging inoltre vengono costruite altre grandezze derivate come ad esempio (in ordine sono il rapporto, l'area e l'eccentricità dell'ellisse):

$$R_r = \frac{W_r}{H_r} \quad R_l = \frac{W_l}{H_l} \quad A_r = \frac{\pi}{4} H_r W_r \quad A_l = \frac{\pi}{4} H_l W_l \quad \epsilon_r = \sqrt{1 - R_r^2} \quad \epsilon_l = \sqrt{1 - R_l^2}$$

Ora dunque, utilizzando tali grandezze, è possibile costruire dei parametri che siano in grado di descrivere la simmetria delle gocce nella forma: $P = G_l / (G_l + G_r)$ dove la lettera P sta per parametro mentre G_r e G_l sono le grandezze descritte nelle righe precedenti (si potrebbe alternativamete utilizzare la formulazione analoga $P = G_r / (G_r + G_l)$) e si costruiscono dunque a partire dalle varie grandezze elencate i seguenti parametri che assumono ogni volta un valore differente al variare di Q_d o Φ (ognuno di essi è dotato di errore casuale ottenuto tramite propagazione):

$$P_O = I_l / (I_l + I_r) \quad P_V^R = R_l / (R_l + R_r) \quad P_V^A = A_l / (A_l + A_r) \quad P_V^\epsilon = \epsilon_l / (\epsilon_l + \epsilon_r)$$

Ciò che si vuole fare ora è osservare se i parametri che stimano l'asimmetria della goccia dal punto di vista ottico (P_O) sono proporzionali a quelli che ne descrivono l'asimmetria dal punto di vista video (P_V^R, P_V^A, P_V^e) e ciò lo si può fare rappresentandoli in un grafico con un parametro ottico in un asse e uno video nell'altro come si nota in figura 3.15.

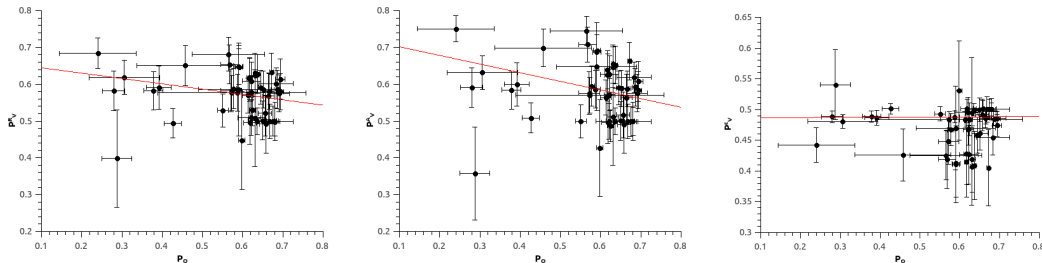


Figura 3.15: Confronto fra i parametri di asimmetria ottici e quelli video.

Nonostante gli errori associati ai dati siano molto grandi, la presenza di un gran numero di punti dà delle indicazioni sul fatto che i valori rappresentati non siano scorrelati fra loro ma abbiano una qualche dipendenza particolare. In prospettiva, dunque, serviranno delle misure più precise e ad hoc per identificare i parametri più adatti alla misura dell'asimmetria delle gocce.

3.4 Conclusioni e prospettive future

Gli obiettivi del presente lavoro di tesi erano la caratterizzazione e lo studio del metodo di produzione di gocce attraverso una cross-junction, ovvero con il metodo del *co-flowing streams*, utilizzando una piattaforma opto-microfluidica costruita su di un substrato di LiNbO_3 . Sono stati raccolti dati sperimentali per diversi regimi di produzione di gocce per poi confrontare questi ultimi con leggi di scala già presenti in letteratura. Sono stati poi confrontati due diversi sistemi di misura usati per studiare le gocce generate: un sistema ottico integrato nella piattaforma tramite una guida di luce di cui poi viene analizzato il segnale in tensione dovuto all'interferenza fra la goccia passante nel canale e il fascio luminoso che attraversa la guida e un sistema di imaging che studia le immagini delle gocce che attraversano il canale, raccolte da una telecamera posta al di sotto della piattaforma.

Si può concludere dunque che i vari regimi di produzione delle gocce in tale piattaforma rispettano le leggi di scala proposte per piattaforme microfluidiche in PDMS o PMMA sebbene con coefficienti di proporzionalità leggermente differenti. Invece, per quanto riguarda il confronto fra i due metodi di misura, si nota che l'errore relativo sulla misura delle lunghezze è compatibile fra di essi ed appartiene ad un range che va dallo 0.1% al 2%; inoltre, confrontando le grandezze ricavate attraverso i due sistemi, si nota che è possibile ricavare alcuni parametri fondamentali (che si ottengono attraverso il sistema di imaging), come la lunghezza e il Numero Capillare (ovvero la velocità) delle gocce, partendo da parametri puramente ottici come ad esempio la lunghezza temporale del segnale legato al passaggio di una di esse e la frequenza di generazione delle gocce.

Sono state trovate infatti delle relazioni che permettono di calibrare l'apparato in modo da ottenere tali parametri fondamentali utilizzando soltanto le grandezze ricavate dal sistema di misura ottico senza dover necessariamente utilizzare un sistema di imaging.

Un risultato molto promettente è la formulazione di una nuova legge di scala che lega la frequenza di generazione delle gocce al Numero Capillare di queste ultime (e dunque alla loro velocità) mediante una proporzionalità diretta, essa inoltre ha un range di affidabilità dato da $5 \cdot 10^{-3} \lesssim Ca \lesssim 10^{-1}$; una tale legge di scala mi permette perciò di ricavare il Numero Capillare conoscendo soltanto il flusso della fase dispersa e la frequenza di generazione delle gocce (oltre ovviamente i parametri delle rette di calibrazione) ed è molto utile per future applicazioni.

Infine vengono messe in evidenza alcune misure promettenti che possono avere buone prospettive per una loro futura caratterizzazione, si è notato che rappresentando l'integrale normalizzato e il minimo del segnale in tensione associato all'apparato ottico al variare del Numero Capillare, questi dati si dispongono seguendo un andamento sigmoidale tipico di una transizione di fase. Andando ad osservare gli estremi di tali curve, ovvero i punti in cui varia maggiormente la loro pendenza, è possibile ottenere dei precisi valori che indichino i diversi regimi di produzione delle gocce.

Sono stati poi introdotti alcuni parametri per caratterizzare l'asimmetria dei menischi delle gocce, sia dal punto di vista del sistema ottico che da quello di imaging, dalla disposizione di tali parametri uno rispetto all'altro in un grafico cartesiano si è notato come questi siano legati fra di loro da un certo tipo di proporzionalità da identificare. Sono necessarie dunque ricerche ed analisi più approfondite per indagare tali caratteristiche del sistema.

Questo lavoro di tesi perciò ha raggiunto gli obiettivi prefissati ma anche aperto nuove prospettive per ricerche e approfondimenti futuri sulla caratterizzazione di tale metodo di produzione delle gocce. Per quel che riguarda gli scopi del progetto di ricerca in cui si inserisce questo lavoro, si sono soddisfatte le prerogative necessarie alla descrizione della configurazione di co-flow del dispositivo, in particolare si è in grado di generare gocce di determinate lunghezze e ad una determinata velocità in funzione dei flussi delle due fasi, osservando i parametri ottici legati ad esse.

APPENDICE

A

SOFTWARE UTILIZZATI NELL'ANALISI DATI

I dati raccolti dalla strumentazione sono di due tipologie: dati di tipo ottico salvati in un file (estensione .tdms) che rappresenta, al variare del tempo, il segnale in tensione in uscita dal fotodiodo e dall'elettronica associata e dati di tipo video sottoforma di immagini raccolte dalla telecamera (con un certo framerate e tempo di esposizione); tali dati grezzi vengono manipolati e analizzati attraverso due programmi in python.

A.1 Segnale ottico

Il programma che analizza il segnale ottico si occupa di aprire il file .tdms con il segnale in tensione scorrendo tutti i valori alla ricerca di minimi e massimi rispetto al segnale di fondo dell'olio, come si può vedere dalla figura A.1, il segnale in tensione associato ad una singola goccia è caratterizzato da due picchi intervallati con tre minimi, i due minimi più esterni (segnati in rosso) sono associati al menisco destro e sinistro della goccia (e dunque ai suoi estremi), i due massimi (in blu) sono dati dall'interferenza costruttiva dovuta al passaggio di questi ultimi mentre invece il minimo centrale (in giallo) è causato dalla rifrazione del fascio laser dovuta al diverso indice di rifrazione fra acqua e olio che ne causa la dispersione e dunque una minor intensità luminosa raccolta dalla guida.

Il programma riceve in input, oltre ai dati grezzi, il tempo di esposizione e l'intervallo temporale da analizzare, anche una soglia in tensione oltre la quale è possibile trovare i massimi, un valore approssimativo per la tensione del segnale di fondo e un intervallo temporale che rappresenta la distanza da saltare prima di trovare il massimo succes-

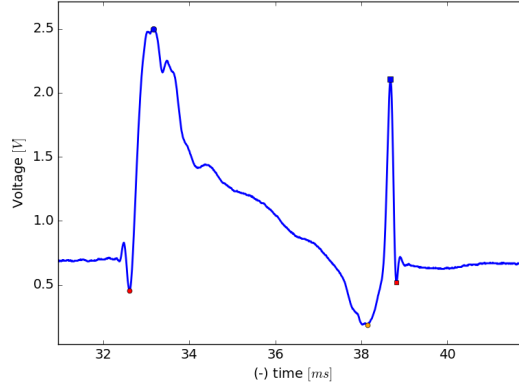


Figura A.1: Segnale in tensione di una singola goccia

sivo. In questo modo è in grado di ricavare minimi e massimi di ogni singola goccia registrando la loro posizione temporale. Dalle posizioni degli estremali della goccia è infine possibile ricavare tutte le sue caratteristiche, ad esempio, la lunghezza viene calcolata come distanza temporale fra i due minimi esterni, gli integrali (totale, destro e sinistro) si trovano calcolando l'area sottesa dall'istogramma del segnale (tutto, solo a destra del minimo assoluto o solo a sinistra) ed eventualmente normalizzandola al fondo, il minimo invece lo si identifica facendo il rapporto fra il valore in tensione del minimo assoluto compreso fra i 2 picchi (in giallo in figura) e il fondo, la frequenza infine viene trovata come l'inverso dell'intervallo temporale fra i picchi destro o sinistro di due gocce consecutive (per il valore scorrelato invece si salta una goccia in modo da non usare due volte lo stesso picco).

Calcolati tali valori per ogni singola goccia riconosciuta nel segnale, il programma crea un istogramma con tutti questi e nel caso in cui esso segua effettivamente un andamento gaussiano, si può richiedere in output valor medio e deviazione standard. Si osserva infine che l'andamento poco gaussiano dell'istogramma può essere dovuto ad un errato riconoscimento degli estremali da parte del programma oppure dalla presenza di disturbi nel segnale (come ad esempio le gocce satellite), tale problema può essere risolto sistemando i dati in input oppure mettendo dei filtri sui parametri individuati in modo da creare un istogramma solamente con quelli ottimali eliminando quelli esterni ad un certo intervallo.

A.2 Tracking

Il programma di tracking si occupa di analizzare i fotogrammi raccolti dalla telecamera, riconoscere la singola goccia, seguirla da un estremo all'altro del tratto di canale inquadrato e infine calcolare i vari parametri che la contraddistinguono. Ciò che sostanzialmente compie il software è considerare ogni singolo fotogramma come una matrice bidimensionale i cui elementi rappresentano tutti i singoli pixel dell'immagine ed ognuno di essi assume il valore dell'intensità luminosa associata a tale pixel (seguendo una

scala graduata che va da un'intensità minima ad una massima) e poi analizzare tale matrice.

I dati che è necessario fornire al programma come input inoltre sono: il framerate e il tempo di esposizione dei fotogrammi, la soglia di intensità luminosa sotto la quale trovare i minimi, la velocità approssimativa della goccia (ovvero quanti pixel più avanti si trova lo stesso menisco nel frame successivo), l'intervallo di pixel in cui cercare i menischi entranti nel canale, l'intervallo di pixel da saltare prima di andare a cercare un altro menisco, l'intervallo di pixel da considerare per fittare il menisco con un'ellisse e infine i frame da cui iniziare e terminare il tracking.

Il software inizialmente sottrae all'immagine un fondo che può essere o un'immagine del canale senza gocce (che dev'essere scattata dall'utilizzatore usando la stessa fotocamera) oppure un valor medio delle matrici che rappresentano i singoli fotogrammi calcolato dallo stesso programma (i due metodi sono analoghi e possono essere scelti a seconda di quello che rende l'immagine più nitida). Il software è in grado di riconoscere immediatamente le due pareti laterali del canale microfluidico poichè sono i punti con intensità luminosa minore; all'interno del range di pixel selezionato da queste infine va a riconoscere i menischi delle singole gocce, anch'essi infatti hanno un'intensità inferiore rispetto al resto del canale.

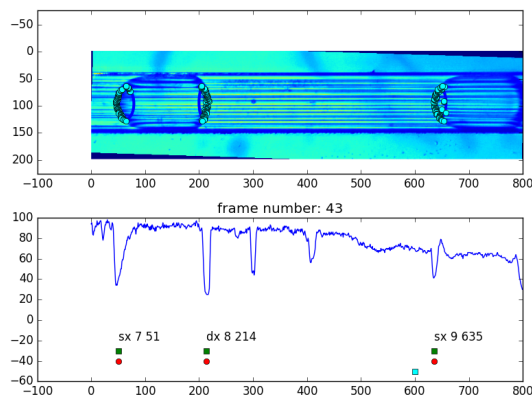


Figura A.2: Tracking della goccia

Nella figura A.2 si può osservare come funziona l'algoritmo di tracking del programma, esso inizialmente riconosce tutti i minimi di intensità luminosa, al di sotto della soglia impostata, nella riga di pixel al centro del canale (punti rossi), questi vengono identificati effettivamente come menischi delle gocce solamente se sono attorniti da altri minimi di intensità luminosa, ovvero gli altri punti del menisco (in tal caso gli si associa un punto verde), infine tali minimi devono essere identificati come menisco destro o sinistro, per fare ciò il software identifica come sinistro il primo menisco entrante nel canale da destra, come destro il secondo e via così con l' n-esimo menisco che sarà sinistro se n è dispari o destro se è pari (tutto questo funziona bene solamente se si seleziona adeguatamente il frame con cui iniziare il tracking). Conoscendo la velocità media delle singole gocce (fornita in input) il programma può associare in due frame

consecutivi 2 menischi alla stessa goccia e dunque tracciare la posizione della goccia in tutti i fotogrammi che la contengono fino a che non esce dal canale.

Conoscendo dunque la conversione fra pixel e micrometri e sapendo il framerate del file, il software ricava: la lunghezza della goccia come la distanza media fra i centri dei due menischi, la velocità come la distanza media di cui si sposta una goccia fra un frame e il successivo e infine fittando i singoli menischi con degli ellissi ne ricava le dimensioni di larghezza e altezza medie in micrometri. Tali valori sono definiti medi perchè il programma compie i suddetti calcoli per tutti i frame che racchiudono la stessa goccia (circa 7 in media da quando entra a quando esce dal canale fotografato) e ricava un valor medio di tali parametri, poi, esso va a costruire un istogramma con le grandezze calcolate per tutte le altre gocce del quale stampa in output la media e la deviazione standard. Si aggiunge infine che, come per il software precedente, va sempre verificato che l'istogramma abbia un andamento gaussiano e nel caso in cui ci fossero alcuni dati "problematici" (dovuti ad un errato funzionamento dell'algoritmo) è possibile eliminarli applicando dei filtri nei dati usati per costruire l'istogramma.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Baylor Et Al. 2012, *Monolithic Integration Of Optical Waveguide And Fluidic Channel Structure In a Thiolene/Methacrylate Photopolimer*, Optical Material Express Vol. **2** N.11
- [2] G. Testa Et Al. 2014, *A Hybrid Silicon-PDMS Optofluidic Platform For Sensing Application*, Biomedical Optics Express Vol. **14** N.2 P.417
- [3] G. F. Christopher and S. L. Anna 2007, *Microfluidic methods for generating continuous droplets streams*, J. Phys. D: Appl. Phys. **40** R319
- [4] T. Cubaud and T. G. Mason 2008, *Capillary threads and viscous droplets in square microchannels*, Phys. Fluids **20** 053302
- [5] S. van Loo, S. Stoukatch, M. Kraft and T. Gilet 2016, *Droplet formation by squeezing in a microfluidic cross-junction*, Microfluid Nanofluid **20**
- [6] J. Tan, J. H. Xu, S. W. Li and G.S. Luo 2007, *Drop dispenser in a cross-junction microfluidic device: Scaling and mechanism of break-up*, Chemical Engineering Journal **136** p. 306-311
- [7] T. Fu, Y. Wu, Y. Ma and H.Z. Li 2012, *Droplet formation and breakup dynamics in microfluidic flow-focusing devices: From dripping to jetting*, Chemical Engineering Science **84** p. 207-217
- [8] H. Liu and Y. Zhang 2011, *Droplet formation in microfluidic cross-junctions*, Phys. Fluids **23** 082101
- [9] A. Daerr and A. Mogne 2016, *PendentDrop: An ImageJ Plugin to Measure the Surface Tension from an Image of a Pendent Drop*, Journal of Open Research Software **4(1)** p.e3