

## **Dipartimento Interateneo di Fisica “*Michelangelo Merlin*”**

*Dottorato di Ricerca in Fisica XXIX ciclo*

Dottoranda: Annalisa Volpe

### **Relazione attività II anno**

Il secondo anno di dottorato è stato prevalentemente dedicato alla prosecuzione dell'attività di ricerca già avviata nel primo anno, nel quale mi sono occupata della fabbricazione e validazione di un prototipo di lab on chip polimerico volto all'isolamento e caratterizzazione delle proprietà meccaniche delle cellule per la diagnostica medicale.

Nelle ultime settimane ho inoltre avviato di ulteriori attività inerenti a questa appena introdotta da sviluppare nel terzo e ultimo anno. L'obiettivo sarà infatti proseguire con la fabbricazione di dispositivi polimerici utili in campo bio-medicale. A questo proposito sarà sviluppato, sulla base di simulazioni fluidodinamiche, un nuovo chip in cui verranno sfruttate le proprietà inerziali delle cellule e la geometria del canale per smistare le cellule presenti nel sangue in base alle loro dimensioni<sup>1</sup>.

Parte delle ore previste è stata dedicata alla divulgazione dei risultati ottenuti, con la stesura di articoli e con la partecipazione a conferenze.

Ho partecipato inoltre alla Scuola di Nanomedicina tenutasi dal 2 al 4 dicembre 2015, presso l'Istituto di Cristallografia del Consiglio Nazionale delle Ricerche a Bari.

Le attività di ricerca, i lavori pubblicati e i contributi a conferenze, sono illustrati nei paragrafi seguenti.

#### **1. Avanzamento stato ricerca**

La mia attività di ricerca è stata incentrata prevalentemente sullo sviluppo del processo di fabbricazione al laser con impulsi al femtosecondo di chip di polimero per applicazioni biomedicali (fig.1).

---

<sup>1</sup> Lab Chip, 2014, 14, 63–77  
Lab Chip, 2015, 15, 1350

Il cuore del dispositivo è uno *stretcher* ottico (fig.1A), dispositivo biofotonico costituito da due fibre ottiche affiancate, dalle quali escono due raggi laser che “intrappolano” una singola particella.

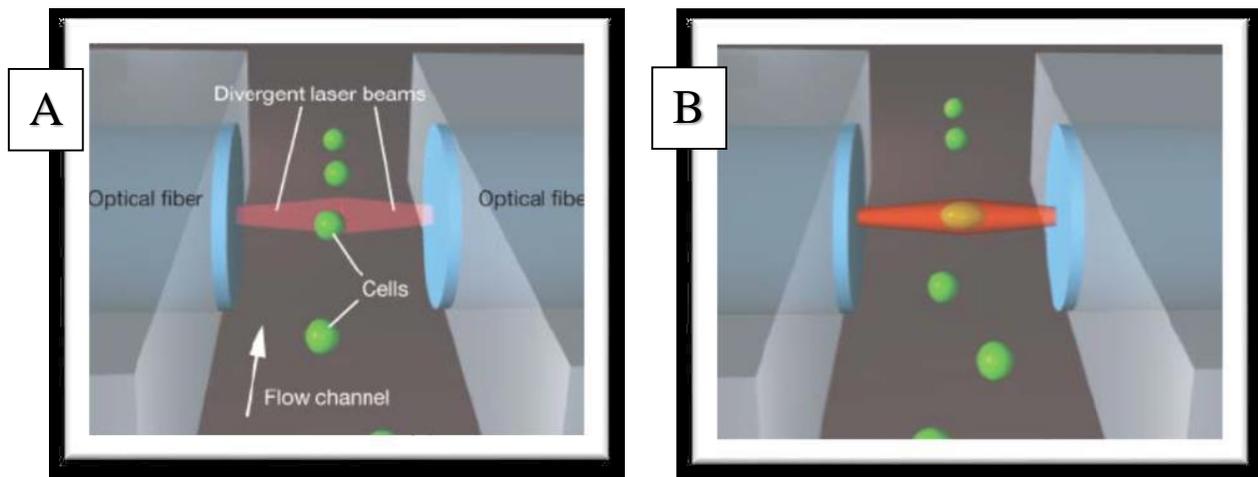


Fig. 1. A) Schema del sistema di stretcher ottico. Le cellule (in verde) scorrono nel canale nella direzione indicata dalla freccia. B) La forza ottica esercitata dai due fasci fa sì che la cellula venga intrappolata e, aumentando ancora la potenza dei due fasci, allungata.

Mentre tutte le altre particelle presenti nel canale si muovono, quella “catturata” nella trappola ottica rimane immobile. Aumentando la potenza ottica in uscita dalla fibra è possibile deformare la cellula intrappolata, allungandola in funzione della sua elasticità (fig.1B).

Per le lavorazioni è stato utilizzato un sistema laser a fibra amplificato con la tecnica CPA (chirped pulsed amplification) ad impulsi ultrabrevi (durata impulso 650-fs) che lavora ad una lunghezza d’onda di 1030 nm a frequenza di ripetizione variabile da 50 KHz a 20 MHz e massima energia per impulso di 100  $\mu$ J (o massima potenza media di 50 W).

### 1.1 Saldatura PMMA trasparente

Da una parte è stato messo a punto il metodo di saldatura laser già sviluppato nell’anno precedente di materiali trasparenti di polimetilmetacrilato (PMMA, vistacryl) con sorgenti ad impulsi ultrabrevi. La sfida principale è stata quella di saldare due strati trasparenti alla lunghezza d’onda della radiazione laser incidente, focalizzando il fascio laser incidente all’interfaccia e sfruttando sia il fenomeno dell’assorbimento non lineare nel volume focale che l’accumulo localizzato di calore che si ottiene ad alte frequenze di ripetizione. Fino ad ora tale tecnica era stata provata con successo su diversi tipi di vetro, ma **mai** su polimeri trasparenti.

Si è investigata l’influenza dei parametri di lavorazione e in particolare della durata dell’impulso e della lente di focalizzazione sulla modifica del polimero bulk. Alla luce dello studio fatto sono stati individuati i parametri di lavorazione che generassero una fusione continua e localizzata del materiale.

In seguito sono stati con successo saldati due strati PMMA trasparenti di 1 mm di spessore sovrapposti e su cui è stata esercitata una pressione uniforme.

Questa nuova tecnica di micro-saldatura laser non ha bisogno di alcun pre-trattamento dei campioni o di uno strato assorbente intermedio. Inoltre, offre numerosi vantaggi rispetto ad altre tecniche di giunzione (sia con colla o con film sottili sensibili alla pressione), perché impedisce la contaminazione e la distorsione termica dei campioni, rendendosi così particolarmente interessante per la fabbricazione laser diretta di dispositivi microfluidici.

A tale proposito si è voluta dimostrare la fattibilità della saldatura con laser al femtosecondo di un dispositivo microfluidico di PMMA, sigillando un canale provvisto di serbatoi, precedentemente fabbricati per ablazione laser sulla superficie di uno dei due strati di polimero (Fig.2).

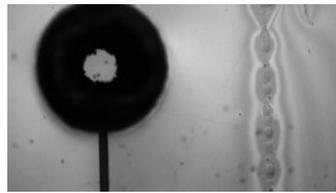


Fig.2: Immagine al microscopio della saldatura intorno al canale e a uno dei due serbatoi visti da sopra.

Per eseguire la prova di tenuta statica, un serbatoio è stato collegato ad una pompa microfluidica mentre l'altro è stato tenuto ermeticamente chiuso. Un liquido blu è stato pompato nel microcanale fino a pressioni di 1 bar senza che siano state osservate perdite dal dispositivo (Fig.3)

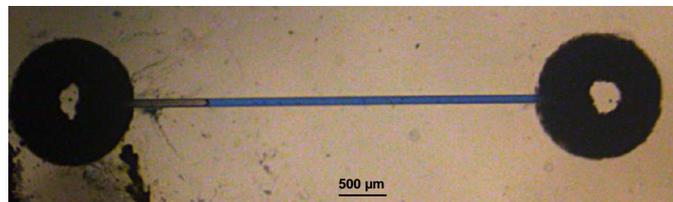


Fig. 3. Immagine al microscopio del canale microfluidico dopo 5 cicli a 1 bar di pressione: non è presente nessuna perdita del fluido blu dal microcanale.

In seguito alla prova sopra descritta è stato possibile validare il primo prototipo di lab on chip interamente realizzato al laser al femtosecondo con integrato l'optical strecher per l'intrappolamento delle cellule.

## 1.2 Microfresatura mediante laser al femtosecondo di inserti rimovibili e saldatura

Parallelamente alla prototipazione rapida del dispositivo microfluidico innovativo e alla prova di tenuta della saldatura, si è proceduto alla fabbricazione dello stampo con inserti rimovibili da utilizzare per la produzione in serie del dispositivo con la tecnica dello stampaggio a micro iniezione. La presenza nello stampo principale di inserti rimovibili, fa sì che tale stampo sia facilmente e velocemente riconfigurabile qualora si decidesse di cambiare la geometria del dispositivo.

Anche in questo caso si è utilizzata la sorgente descritta in precedenza per la micro-fresatura dell'inserto removibile (fig. 4B) da inserire nello stampo principale (fig. 4A)

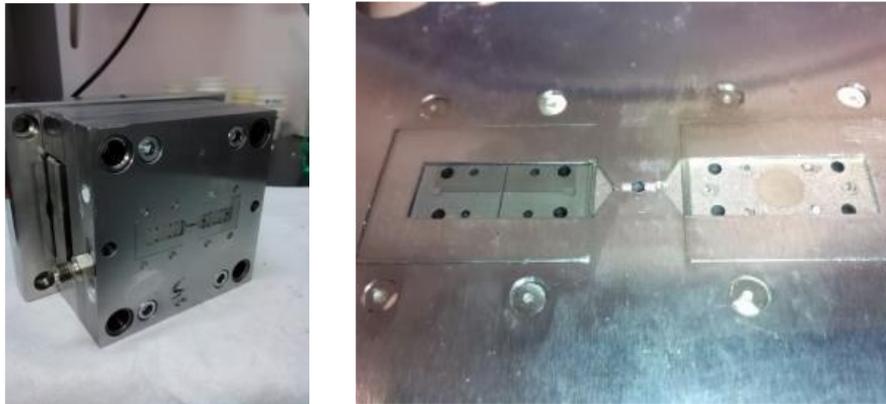


Fig. 4: A) Stampo completo; B) particolare dell'inserto, a sinistra la parte lavorata al laser.

La lavorazione è stata eseguita in accordo con il design stabilito per il chip finale e in base alle simulazioni numeriche del processo di stampaggio.

Mediante l'impiego congiunto di microscopia a scansione elettronica e di microscopia confocale (fig.5) si sono correlati i parametri di processo alla geometria e alla rugosità della superficie lavorata al fine di trovare la combinazione di energia per impulso, velocità di scansione, frequenza di ripetizione, geometria che ci permettesse di rientrare nelle specifiche di dimensioni e rugosità previste.

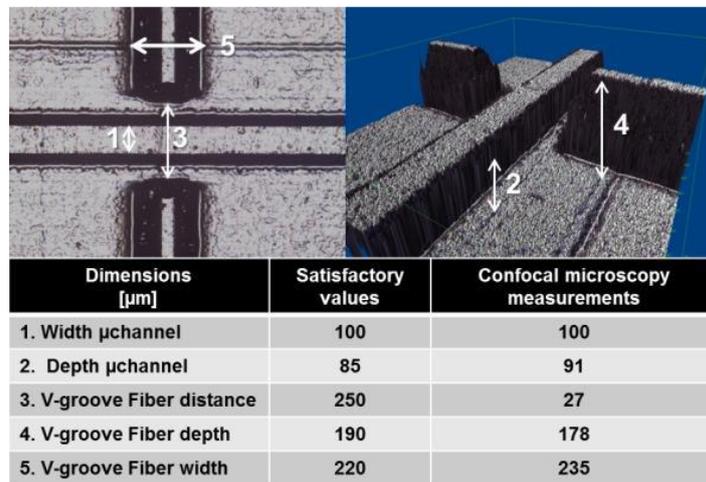


Fig.5: Immagine ottenuta al microscopio confocale dell'inserto. In tabella sono riportate le dimensioni misurate sperimentalmente confrontate con quelle previste dal design dell'inserto.

Con lo stampaggio a micro iniezione è stato possibile produrre centinaia di componenti in poco tempo. Sono state stampate due parti del chip, quella superiore con due fori per la connessione dei tubi esterni (fig.6A) e quella inferiore con il canale e l'alloggiamento per le fibre (fig.6B).



Fig. 5: A) Piastrina superiore con fori per la connettorizzazione; B) piastrina inferiore con canale e alloggiamento fibre.

Le due parti del chip sono state quindi ancora una volta saldate al laser lungo tutto il perimetro del sistema composto dal canale, dai due alloggiamenti per le fibre e dai fori.

Il passo finale è stata la validazione del sistema integrato di *optical stretcher*. Il dispositivo, dopo la saldatura, è stato infatti collegato al circuito microfluidico e due fibre sono state inserite nelle v-grooves (fig.7A). Dopo diverse caratterizzazioni preliminari con sferette rigide, il test è stato ripetuto con un campione di sangue. Come si vede in fig. 7B, i globuli rossi sono stati singolarmente intrappolati dalle forze ottiche all'incrocio tra le fibre e il canale. Aumentando ancora la potenza ottica nelle due fibre è stato possibile modificare la forma delle cellule (fig. 7C).

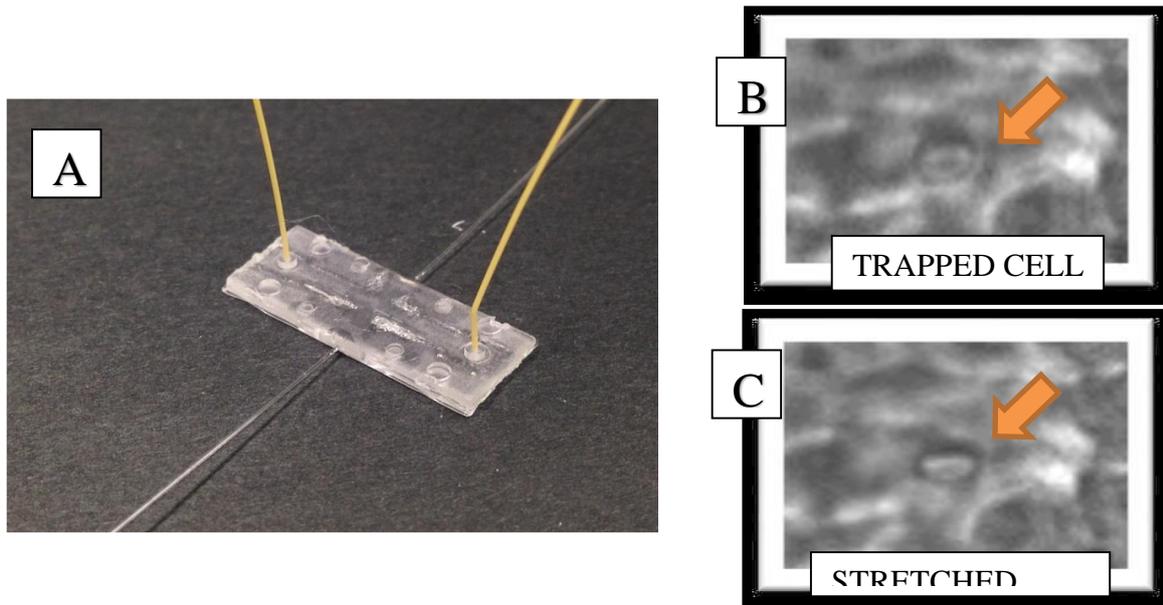


Fig. 4: A) Dispositivo saldato connesso al circuito microfluidico (tubi gialli) e con fibre inserite; B) la freccia indica la cellula intrappolata e C) quando è allungata all'aumentare della forza ottica,

Tale tecnica, validata sui globuli rossi, gioca un ruolo cruciale nello studio dell'evoluzione cellulare e anche di molte malattie. Un dispositivo basato sull'*optical stretcher* può essere infatti il mezzo per investigare cambiamenti nella meccanica cellulare. A titolo d'esempio sulle potenzialità di questa tecnica, basti pensare che è stato dimostrato come le cellule tumorali si deformino diversamente da quelle sane e tanto più quanto è avanzato il grado di "malignità"<sup>2</sup>. Un ulteriore sviluppo di questa tecnica potrebbe quindi riguardare proprio la discriminazione delle cellule malate da quelle sane in maniera non invasiva.

<sup>2</sup> Guck, J.; et al. (2005). "Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence". *Biophys. J.* **88** (5): 3689-3698.

### 1.3 Altre attività

Parallelamente a quelle appena descritte, durante l'anno ho svolto anche altre attività sperimentali, di seguito brevemente riassunte:

- Messa a punto di nuove tecniche laser per il taglio di diapason di quarzo per applicazioni nella spettroscopia fotoacustica.
- Sintesi di nano-compositi con proprietà antimicrobiche a base di nano-particelle bimetalliche di rame e argento in chitosano prodotte per ablazione con laser al femtosecondo di targhette solide in soluzione liquida in configurazione statica e con cella di flusso.
- Realizzazione di superfici micro/nano-strutturate con fascio laser ad impulsi ultrabrevi per la modifica superficiale di materiali metallici e dielettrici.

## 2. Divulgazione scientifica

### 1.4 Articoli di rivista

- *“Welding of PMMA by a femtosecond fiber laser”* (autori: **A. Volpe**, F. Di Niso, C. Gaudiuso, A. De Rosa, R. Martínez Vázquez, A. Ancona, P. M. Lugarà e R. Osellame), *Optics Express*, Vol. 23, Issue 4, pp. 4114-4124 (2015), doi: 10.1364/OE.23.004114.
- *“Ultrafast carrier dynamics in hybrid systems based on organic capped CdSe nanocrystals in low band gap copolymer”* (autori: A.E. Di Mauro, M. Striccoli, A. Brunetti, A. Volpe, S. Destri, M. Corricelli, A. Agostiano, M.L. Curri, R. Tommasi), SOTTOMESSO a una special Issue di *Synthetic Metals*.

### 1.5 Proceedings:

- *“Laser Ablation Synthesis in Solution of Nanoantimicrobials for Food Packaging Applications”*, (Autori: Maria C. Sportelli, Antonio Ancona, Rosaria A. Picca, Adriana Trapani, Annalisa Volpe, Giuseppe Trapani, Nicola Cioffi) *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* Vol. 1804, 2015 Materials Research Society.
- *“Femtosecond fiber laser welding of PMMA”* (Author(s): Annalisa Volpe; Francesca Di Niso; Caterina Gaudiuso; Andrea De Rosa; Rebeca Martínez Vázquez; Antonio Ancona; Pietro Mario Lugarà; Roberto Osellame, *Proc. SPIE 9351, Laser-based Micro- and Nanoprocessing IX*, 935106 (12 March 2015); doi: 10.1117/12.2078789.

- *“Laser Ablation Synthesis of Hybrid Cu/Ag Nanoparticles for perspective application as nanoantimicrobial agents for food packaging”* (autori: Rosaria Anna Picca, Anna Di Maria, Lenka Riháková , Annalisa Volpe, Maria Chiara Sportelli , Pietro Mario Lugarà, Antonio Ancona, Nicola Cioffi), SOTTOMESSO a MRS Fall Meeting 2015, November 29-December 4, 2015, Boston, Massachusetts.

## 1.6 Comunicazioni a conferenze:

- *“Femtosecond fiber laser welding of PMMA”* (autori: **A. Volpe**, F. Di Niso, C. Gaudio, A. De Rosa, R. Martínez Vázquez, A. Ancona, P. M. Lugarà e R. Osellame). Presentazione orale alla conferenza internazionale "Laser-based Micro- and Nanoprocessing IX", Photonics West 2015, 07-12 Febbraio 2015, San Francisco, California (USA).
- *“Aqueous laser ablation synthesis of hybrid Copper-Chitosan Nanoantimicrobials for applications in food packaging and bio-risk containment”* (autori: M. C. Sportelli, A. Ancona, R.A. Picca, **A. Volpe**, A. Trapani, G. Trapani, N. Cioffi), presentato alla conferenza internazionale “MRS Spring Meeting & Exhibit” (Symposium RR: “Solution Syntheses of Inorganic Functional/Multifunctional Materials”), 6-10 Aprile 2015, San Francisco, California.
- *“Improving the flexibility of micro injection moulding by exploiting fs-laser micro milling to realize mould inserts with complex 3D microfeatures”* (autori: G.Trotta, A. Ancona, A.Volpe, F. Di Niso, I. Fassi). Presentato a 4M/ICOMM2015-International Conference on Micromanufacturing, Milano, 31 marzo - 2 Aprile 2015.
- *“Direct bonding of transparent PMMA using an ultrafast fiber CPA laser system”* (autori: Annalisa Volpe, Caterina Gaudio, Andrea De Rosa, Rebeca Martínez Vázquez, Antonio Ancona, Pietro Mario Lugarà, and Roberto Osellame), Presentazione orale alla conferenza internazionale LiM - Lasers in Manufacturing, Monaco, 22-25 Giugno 2015.
- *“Non-Uniform Micro-Texturing of Tribological Steel Surfaces by Femtosecond Laser Ablation”*, (autori: A. Ancona, G. Carbone, M.Scaraggi, A. Volpe, M. De Filippis, and P. M. Lugarà), Presentazione orale alla conferenza internazionale LiM - Lasers in Manufacturing, Monaco, 22-25 Giugno 2015.
- *“Synthesis and characterization of hybrid cu/ag nanoparticles by laser ablation in liquid”*, presentazione POSTER al XXV Congresso Nazionale della Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana Trieste, 13 - 17 Settembre 2015.