

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Corso di dottorato in

**Tecnologie per la salute: valutazione e gestione delle
innovazioni nel settore biomedicale**

Ciclo XXIII



*“Tecniche di realizzazione di superfici di interfaccia
con sistemi biologici per dispositivi biomedici
miniaturizzati”*

RELATORI:

Prof.ssa Arianna Menciassi

Prof. Paolo Dario

Dott.ssa Lucia Beccai

Dott. Pietro Valdastri

CANDIDATA:

Elisa Buselli

Anno Accademico 2010/2011

SSD ING-IND/34

Abstract

Il presente lavoro di tesi ha preso in esame lo studio di tecnologie e materiali per la realizzazione di dispositivi miniaturizzati in ambito biomedico. In particolare sono state realizzate delle superfici di interfaccia tra sistemi biologici e artificiali, prendendo in considerazione diversi intervalli dimensionali, che vanno dal centimetro al micrometro. Per ogni scala le forze predominanti e le caratteristiche da valutare sono diverse: scendendo da dimensioni macroscopiche a microscopiche è necessario utilizzare accorgimenti diversi nella progettazione, nella scelta dei materiali e delle tecniche di fabbricazione, nonché nella metodiche di valutazione e di analisi dei risultati. Lo studio delle tecnologie di micro-fabbricazione nell'intervallo dimensionale che si trova a metà strada tra la macroscale e la microscale non è banale e non può essere trattato semplicemente come un'estensione delle tecniche classiche utilizzate nelle altre scale. È inoltre essenziale segnalare come la miniaturizzazione possa dare vita a nuove possibilità: permette infatti di sviluppare sistemi che sfruttano le proprietà fisiche tipiche della microscale e che non hanno equivalenti nel campo macroscopico, infatti la riproduzione degli stessi dispositivi nella macroscale non raggiungerebbe la stessa efficienza.

Al fine di sviluppare nel dettaglio le varie problematiche affrontate, sono stati realizzati dei dispositivi esemplificativi, aventi dimensioni variabili nell'intervallo di studio. Essi sono stati progettati e costruiti in modo da fornire tipi di attuazione o sensorizzazione innovativi dal punto di vista ingegneristico e, allo stesso tempo, da garantire la sicurezza dei sistemi biologici con cui entrano in contatto. Il primo esempio trattato riguarda un dispositivo endoscopico, composto da più parti di dimensioni millimetriche, che interagisce con un tessuto biologico. Oltre ai componenti meccanici, è stata studiata la superficie che costituisce l'interfaccia diretta tra il tessuto e il dispositivo per garantire l'adeguata adesione tra le due parti. Un altro esempio riguarda la realizzazione di strutture deformabili e sensorizzate per l'interazione con delle colture cellulari. Infine è stata studiata la problematica dell'interfaccia con i fluidi biologici attraverso un dispositivo microfluidico.

In sintesi, sono state esaminate le tecnologie disponibili al fine di trovare le migliori strategie di fabbricazione per sfruttare, di volta in volta, le peculiarità della scala dimensionale e dell'ambiente nel quale il dispositivo è inserito. Nel corso della tesi sono presentati numerosi spunti ed esempi che possono costituire delle linee guida per la realizzazione di dispositivi miniaturizzati in ambito medico. In generale lo scopo di questo lavoro risiede nello studio e nella ricerca di nuovi materiali e tecnologie che possano migliorare la fabbricazione di strutture miniaturizzate e biocompatibili, creando soluzioni innovative e/o ottimizzando le procedure già esistenti.

INDICE

Capitolo 1

Introduzione: realizzazione di interfacce con sistemi biologici	1
1.1 Introduzione e panoramica sul lavoro di tesi	1
1.2 Come variano le leggi fisiche e le forze in gioco con le dimensioni	2
1.3 Come variano le tecniche di fabbricazione con la variazione di scala	6
1.4 Biomateriali e interfacce con i sistemi biologici nei dispositivi medici	8
1.4.1 <i>I metalli in medicina</i>	10
1.4.2 <i>I polimeri in medicina</i>	11
1.5 Breve presentazione delle diverse problematiche affrontate	12
Bibliografia I	15

Capitolo 2

Sistemi di interfaccia con i tessuti – dispositivo bulk	16
2.1 Introduzione	16
2.2 Applicazione	16
2.2.1 <i>Le capsule endoscopiche come strumento diagnostico nei disturbi del tratto gastrointestinale</i>	16
2.2.2 <i>Il dispositivo preso in esame</i>	18
2.3 Tecniche di fabbricazione	18
2.3.1 <i>Stato dell'arte sulla fabbricazione nella scala mini</i>	18
2.3.2 <i>Fabbricazione dei singoli componenti</i>	19
2.3.3 <i>Assemblaggio del dispositivo</i>	24
2.4 Test sperimentali e verifica dei risultati	24
2.5 Progettazione ed analisi della zampa della capsula	26
2.6 Conclusioni	31
Bibliografia II	33

Capitolo 3

Sistemi di interfaccia con i tessuti – struttura superficiale	35
3.1 Introduzione	35
3.2 Applicazione: la morfologia del tessuto intestinale e l'approccio a soluzioni bioispirate	35
3.3 Tecniche di fabbricazione	37

3.3.1	<i>Realizzazione di microuncini metallici</i>	37
3.3.2	<i>La soft-lithography</i>	38
3.3.3	<i>Realizzazione di superfici polimeriche micro-strutturate</i>	41
3.4	Test sperimentali e verifica dei risultati	43
3.4.1	<i>Test delle zampe con microuncini metallici</i>	43
3.4.2	<i>Test delle zampe con superfici polimeriche micro-strutturate</i>	43
3.5	Conclusioni	48
	Bibliografia III	49
	<u>Capitolo 4</u>	
	Sistemi di interfaccia con le cellule	51
4.1	Introduzione	51
4.2	Applicazione	51
4.2.1	<i>L'interfaccia tra le cellule e il materiale artificiale</i>	51
4.2.2	<i>Il dispositivo preso in esame</i>	53
4.2.3	<i>Il monitoraggio automatizzato delle colture cellulari</i>	54
4.3	Tecniche di fabbricazione	55
4.3.1	<i>Fabbricazione della struttura microfluidica</i>	55
4.3.2	<i>Fabbricazione dell'elettrodo deformabile</i>	57
4.4	Test sperimentali e verifica dei risultati	59
4.4.1	<i>Test sulle cellule: adesione al substrato e comportamento in risposta ad uno stimolo applicato</i>	59
4.4.2	<i>Caratterizzazione elettromeccanica dell'elettrodo deformabile</i>	60
4.4.3	<i>Misure di impedenza sull'elettrodo e sulle cellule</i>	61
4.5	Conclusioni	62
	Bibliografia IV	63
	<u>Capitolo 5</u>	
	Sistemi di interfaccia con i fluidi	65
5.1	Introduzione	65
5.2	Applicazione	65
5.2.1	<i>La microfluidica e i dispositivi lab-on-chip</i>	65
5.2.2	<i>Il dispositivo preso in esame</i>	66
5.3	Tecniche di fabbricazione	68

5.3.1 <i>Multilayer soft-lithography</i>	68
5.3.2 <i>Materiali</i>	71
5.3.3 <i>Fabbricazione micro-pompa peristaltica</i>	71
5.4 Test sperimentali e verifica dei risultati	74
5.5 Conclusioni	78
Bibliografia V	79
<u>Capitolo 6</u>	
Conclusioni	80

Capitolo 1

Introduzione: realizzazione di interfacce con sistemi biologici

1.1 Introduzione e panoramica sul lavoro di tesi

Il presente lavoro di tesi è focalizzato sullo studio di materiali e tecniche di micro-fabbricazione per la realizzazione di dispositivi biomedicali miniaturizzati. In particolare sono stati sviluppati dispositivi che costituiscono un'interfaccia tra una parte biologica e una artificiale. In questo contesto le tecniche ed i materiali utilizzati devono essere scelti in base alle caratteristiche meccaniche richieste dall'applicazione, ai limiti nella fabbricazione imposti dalle dimensioni, alla biocompatibilità dei materiali e alla capacità del sistema di entrare in contatto con sostanze biologiche senza indurre danni né deteriorarsi.

Il lavoro si articola partendo da interfacce con tessuti in scala macroscopica e scendendo fino a livello micrometrico.

Innanzitutto, è essenziale definire le dimensioni tipiche alle quali sarà fatto riferimento per il resto della tesi e definire quali sono gli intervalli dimensionali presi in considerazione:

- definiamo scala “macro” quella che comprende grandezze al di sopra del centimetro ($L > 1\text{cm}$). È la scala dimensionale del mondo in cui viviamo, per la quale valgono tutte le regole della progettazione meccanica classica;
- definiamo scala “mini” quella tra il centimetro e il millimetro ($L \approx 1\text{cm} - 1\text{mm}$). In questo intervallo sono valide le stesse leggi fisiche dei sistemi macro, ma le forze predominanti vanno valutate con attenzione poiché possono acquistare pesi diversi a seconda dei fattori in gioco. In questa scala, il caso preso in esame è un dispositivo che interagisce con un tessuto biologico;
- definiamo scala “micro” quella tra il millimetro e i 10 micrometri ($L \approx 1\text{mm} - 10\mu\text{m}$). In questo *range* l'azione delle forze superficiali è preponderante. Il caso preso in esame è una superficie che costituisce un'interfaccia con una coltura cellulare;
- definiamo scala “sub-micro” quella che include dimensioni inferiori ai 10 micrometri ($L < 10\mu\text{m}$). In questa scala, il caso preso in esame è una superficie che entra in contatto con dei fluidi biologici (siero, sangue) contenenti delle particelle subcellulari.

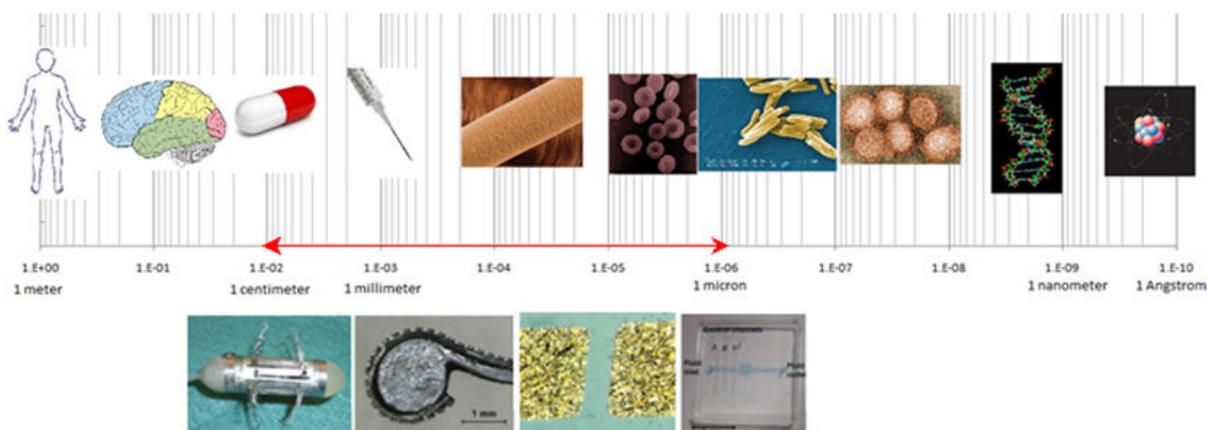


figura 1.1: Linea delle diverse scale dimensionali; le figure in basso permettono di collocare nella scala i casi di studio presi in esame nel lavoro di tesi.

Per ogni scala le forze predominanti e le caratteristiche da valutare sono diverse. Scendendo dal macro al micro è necessario utilizzare accorgimenti diversi nella progettazione, scegliere i materiali più adatti e selezionare le tecniche di fabbricazione in base ai limiti delle macchine. Infine, anche i metodi di valutazione e analisi dei risultati devono essere scelti coerentemente.

Tutti i sistemi presentati nel lavoro di tesi, al di là delle diverse applicazioni specifiche, hanno un comune denominatore in quanto tutte le superfici realizzate costituiscono un'interfaccia con un sistema biologico (tessuto, cellule, siero). È importante puntualizzare che nessuno dei dispositivi è progettato per essere impiantato in modo stabile nel corpo umano. Infatti i due casi di studio in cui le superfici vengono a contatto con cellule e siero riguardano apparecchiature da usare in laboratorio, quindi in ambiente *in-vitro*. Per quanto riguarda l'applicazione su tessuto, essa è pensata per un dispositivo che transita nel tratto gastro-intestinale per poche ore e, un po' come il cibo, non entra in diretto contatto con parti "interne" del corpo umano. In tutti i casi trattati non esiste quindi il rischio di reazioni di rigetto da parte dell'organismo. Questa premessa è importante per chiarire che i dispositivi sviluppati non devono sottostare alle norme per i dispositivi impiantabili, poiché non sono sistemi "intracorporei".

Inoltre il presente studio prende in considerazione le interazioni di tipo fisico all'interfaccia biologica/artificiale, mentre non viene approfondita l'analisi di eventuali reazioni e/o modifiche biochimiche nello "strato limite". Infatti, l'approccio adottato è di tipo ingegneristico e mira alla progettazione e alla realizzazione dei dispositivi in funzione dell'applicazione. Ad ogni modo, sono state verificate di volta in volta la biocompatibilità dei materiali, la sicurezza del dispositivo e l'assenza di danni a posteriori alla parte biologica, essendo l'obiettivo finale lo sviluppo di dispositivi che si interfaccino con le strutture biologiche in modo affidabile e sicuro.

1.2 Come variano le leggi fisiche e le forze in gioco con le dimensioni

Negli ultimi anni l'interesse per il settore micro e nano è aumentato rapidamente, basti solo pensare allo sviluppo di micro-macchine, MEMS (*Micro-Electrical Mechanical Systems*) e nanotecnologie. Sia dal punto di vista teorico che pratico ci sono differenze interessanti nel passaggio di scala, ad esempio alcuni effetti trascurabili a livello macroscopico diventano importanti nella microscala e viceversa. Quando la dimensione caratteristica degli elementi scende da dimensioni macroscopiche a microscopiche, l'effetto della gravità diventa trascurabile se paragonato agli effetti di adesione e attrito oppure alla tensione superficiale; questo accade perché il volume, e di conseguenza la massa, diminuiscono più velocemente della superficie. Questo implica che molte teorie, basate sulla nostra esperienza nel mondo macroscopico, non sono più valide. Per comprendere la portata pratica di questa affermazione basti pensare che una scheggia di metallo può essere sollevata per semplice aderenza ad un dito inumidito, mentre risulta impossibile sollevare una trave per aderenza ad un tampone bagnato. Passando dalla dimensione della trave a quella della scheggia, infatti, le forze di superficie diventano predominanti [1.1]. Il confine tra i livelli macro e micro non è brusco e dipende dagli effetti che vengono presi in considerazione.

Diminuendo ancora la dimensione caratteristica si raggiunge il livello nano e si incontra un altro limite. Mentre le proprietà macroscopiche in genere rimangono valide anche nella dimensione micrometrica, seppur con molti limiti e variazioni, nella scala nano le leggi cambiano radicalmente: le forze superficiali diventano dominanti ed appaiono effetti quantistici.

La miniaturizzazione di un corpo o di un dispositivo, quindi, non conduce solamente ad una riduzione delle dimensioni, ma anche a delle modifiche nei comportamenti fisici. Lo studio delle leggi di scala e del loro dominio di validità può aiutare a comprendere le origini delle

differenze tra gli ambienti macro, micro e nano. Per analizzare questa transizione è necessario considerare effetti pluridisciplinari: nel seguito del paragrafo verranno introdotte le leggi di scala negli ambiti di meccanica, fluidica, termodinamica e ottica [1.2].

Leggi di scala in meccanica

Consideriamo elementi con una dimensione caratteristica L e assumiamo che tutte le dimensioni lineari varino proporzionalmente con L . Questo implica che l'area S , il volume V e la massa m varino come:

- area $S \sim L^2$
- volume $V \sim L^3$
- massa $m \sim L^3$

Nella prossima tabella sono riportate le maggiori forze e grandezze in gioco e la loro relazione con L .

Inertial momentum: $I \sim mL^2$	L^5
Gravitational force	L^3
Adhesion (Van der Waals) forces	L^2
Striction (i.e. adhesion + friction) forces	L^2
Elastic potential energy (linear spring, fixed stiffness)	L^2
Period of oscillation (linear spring, fixed stiffness)	$L^{3/2}$
Capillary forces	L

figura 1.2: Leggi di scala: meccanica classica.

Prendiamo come esempio di discussione la forza gravitazionale. Sulla superficie terrestre essa è:

$$F_{gr} = mg, \text{ dove } g \text{ è l'accelerazione gravitazionale; quindi } F_{gr} \sim L^3.$$

È ben noto che l'adesione tra un solido e un altro solido (o un liquido) è dovuta a forze tra gli atomi e le molecole. In generale le forze di adesione, il cui maggior contributo è dato da quella di Van der Waals, variano come L^2 .

Considerando che F_{gr} e F_{vdw} sono legate in modo diverso a L , bisogna considerare come varia il loro rapporto scalando le dimensioni; otteniamo così:

$$F_{gr}/F_{vdw} \sim L^{-1}.$$

Il fatto che le forze superficiali (ad esempio adesione e capillarità) diventino dominanti nel mondo microscopico implica che il *coating* (copertura superficiale) diventi importante nei sistemi micro/nanoscopici quando si voglia favorire oppure prevenire i fenomeni di adesione.

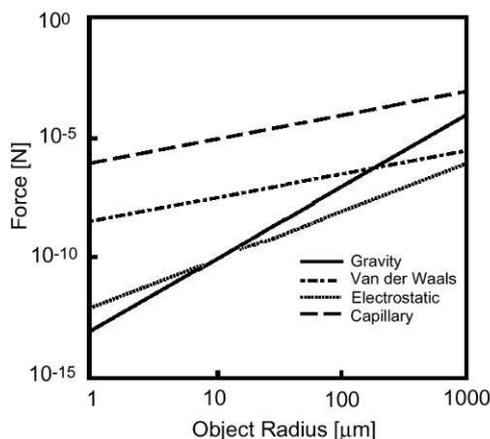


figura 1.3: Modifica dell'importanza delle forze con la variazione di scala.

Per quanto riguarda l'attrito, esso nel mondo macro è indipendente dall'area superficiale:

$$F_{fr} = \mu F_{gr} = \mu mg \sim L^3, \text{ dove } \mu \text{ è il coefficiente d'attrito.}$$

Nel mondo microscopico invece, a causa della rugosità superficiale e delle larghe forze di adesione, deve essere preso in considerazione lo *striction* (combinazione di forze di attrito e di adesione) che varia come L^2 .

La predominanza delle forze di adesione nei sistemi micro e nano, fa sì che alcuni animali adottino strategie basate su questo principio per ottimizzare l'adesione al terreno. Ad esempio le zampe di molti piccoli animali sono ricoperte di strutture microscopiche che sfruttano le forze esistenti nel dominio microscopico, di cui non potrebbero beneficiare con zampe "macro" [1.3].

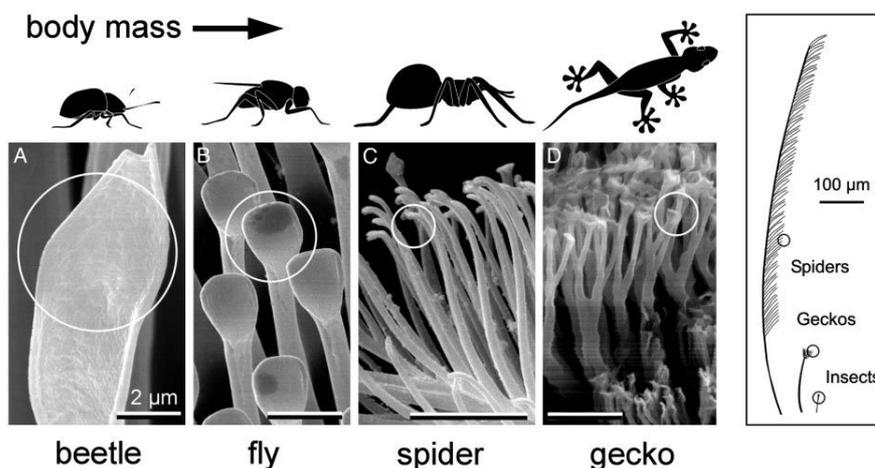


figura 1.4: Strutture microscopiche sulle zampe di vari animali. Gli animali più pesanti adottano terminazioni di dimensioni minori [1.3].

Leggi di scala in fluidica

Nei fluidi il numero di Reynolds, Re , rappresenta il rapporto tra le forze di inerzia e le forze viscose e segna la transizione tra il moto laminare e quello turbolento.

$$Re = \rho v L / \eta, \text{ dove } \rho \text{ è la densità, } v \text{ è la velocità media e } \eta \text{ è la viscosità del fluido.}$$

Per canali piccoli si può assumere che $v \sim L$, perciò $Re \sim L^2$.

Nel mondo microscopico la resistenza viscosa domina sull'inerzia ed il moto è sempre laminare. Questo porta ad eliminare fenomeni di turbolenza ma, allo stesso tempo, rende difficile miscelare due fluidi in un canale micrometrico [1.4].

Regime speed (Stokes solution - sphere, fixed viscosity)	L^2
Diffusion time (fixed diffusivity)	L^2
Reynolds no. $Re = \rho v L / \mu$ (fixed density ρ and viscosity μ)	$L [v]$
Surface tension/capillary forces	L

figura 1.5: Leggi di scala: fluidica.

La variazione del numero di Reynolds ha molta influenza anche sul tipo di locomozione che è possibile condurre in un dato intervallo dimensionale. Infatti gli organismi viventi sfruttano diversi principi di locomozione in base al tipo di forze predominanti nel loro dominio.

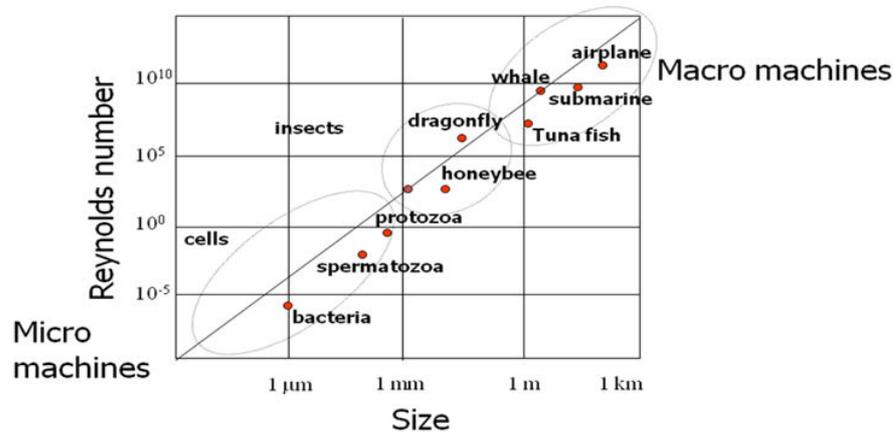


figura 1.6: Andamento del numero di Reynolds con le dimensioni ed esempi di organismi viventi nei diversi domini.

Leggi di scala in termodinamica

Dato che il tempo caratteristico di diffusione varia come L^2 , i dispositivi microscopici immersi in un certo ambiente raggiungono una temperatura di equilibrio molto più velocemente di quelli macroscopici. Questo porta a ridurre i problemi di stress indotti termicamente e abbassa i tempi di raffreddamento.

Energy for heating a system (fixed thermal capacity)	L^3
Thermal power dissipated by conduction/radiation (fixed ...)	L^2
Thermal diffusion time (fixed thermal diffusivity)	L^2
Melting temperature (spherical particle)	$\sim 1 - \text{const}/L$
Heat flux by convection (Newton law)	L^{-1}
Heat flux by conduction (Fourier law, fixed bulk conductivity)	L^{-1}

figura 1.7: Leggi di scala: termodinamica.

È interessante notare come la natura abbia adottato strategie diverse per adattarsi ai cambiamenti di scala. Ad esempio i piccoli mammiferi devono mangiare più spesso di quelli

grandi per mantenere il calore corporeo (calore dissipato $\sim L^2$, calore prodotto $\sim L^3$); gli insetti si sottraggono a questo problema essendo animali a sangue freddo [1.5].

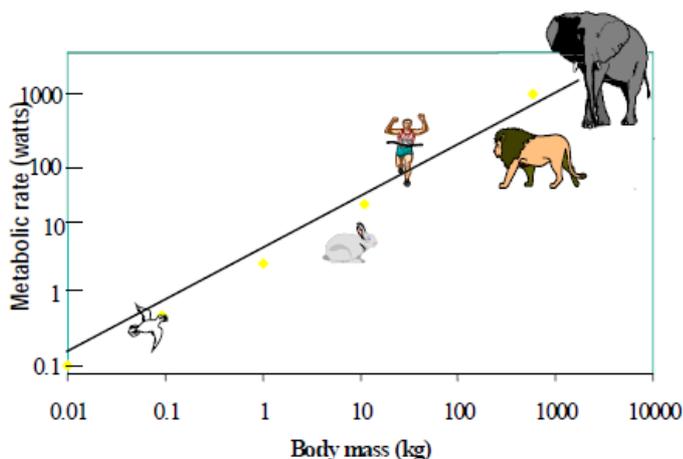


figura 1.8: Consumo energetico delle varie specie viventi in funzione della massa corporea.

Leggi di scala in ottica

La luce visibile ha una lunghezza d'onda di circa 500 nm, quindi la luce interagisce con le nano particelle in modo molto diverso rispetto ad oggetti macroscopici. In fotolitografia è necessario disegnare oggetti di dimensione $L \sim \lambda$, dove λ è la lunghezza d'onda; questo è il motivo per cui si usa la luce ultravioletta per realizzare componenti di dimensioni ridotte. Inoltre oggetti di dimensioni paragonabili alla lunghezza d'onda della luce presentano interessanti fenomeni di antiriflesso e di trasmissione amplificata della luce [1.6].

Wavelength to irradiate an element of size L (fixed numerical aperture,...)	L
Focal length (thin lens, fixed shape)	L
Angle for destructive interference - Fraunhofer diffraction (fixed ...)	L^{-1}
Angular measure of Airy disc from circular aperture of diameter L (fixed ...)	L^{-1}

figura 1.9: Leggi di scala: ottica.

1.3 Come variano le tecniche di fabbricazione con la variazione di scala

I dispositivi di dimensioni mini e micro-metriche rappresentano attualmente un campo in continua evoluzione e la richiesta di questi componenti sul mercato sta crescendo rapidamente, soprattutto nei settori ad alta tecnologia come l'elettronica, le comunicazioni, le bio-tecnologie, ecc [1.7] [1.8].

Semplificando si può dire che fino ad oggi gli sforzi progettuali nell'ambito delle applicazioni meccaniche sono stati principalmente indirizzati verso le macrotecnologie e le nano/microtecnologie (NEMS e MEMS, cioè *Nano/Micro Electro-Mechanical Systems*) [1.9]. Per le applicazioni macro (navi, edifici, aerei ecc.) sono ormai disponibili procedure standard e programmi di simulazione numerica sofisticati, che agevolano sia la progettazione che la comprensione dei fenomeni fisici.

Anche le nano/micro-tecnologie, sono ormai oggetto di studi estesi e consolidati; la ricerca scientifica e tecnologica in questi campi è lontana dall'essere esaurita, ma sono stati standardizzati processi e metodi che si adattano a questo livello dimensionale. Il limite principale per l'applicazione delle tecnologie MEMS a dispositivi più grandi di alcune decine di micrometri risiede nel fatto che queste procedure si limitano a riprodurre oggetti 2D o 2 e

1/2D (cioè hanno un certo spessore, ma la terza dimensione non può essere lavorata) e soprattutto utilizzano in genere una classe limitata di materiali (di solito silicio) [1.10].

Se non è necessario progettare strutture 3D, in ambito micrometrico 2D la tecnologia più avanzata è quella litografica. Questa metodica permette di creare strutture bidimensionali che possono essere usate sia come materiale strutturale sia come stampi per replicare il design desiderato con altri materiali, in genere polimeri [1.11]. Il processo fotolitografico tradizionale si basa sull'esposizione ai raggi UV di un materiale fotosensibile ed è utilizzato soprattutto in ambito elettronico per la realizzazione di microchip e circuiti integrati per rispondere all'esigenza di elevata precisione nell'ambito micrometrico. Per aumentare la risoluzione rispetto alla litografia tradizionale a luce UV, negli anni sono state sviluppate nuove tecniche di litografia: fotolitografia a raggi X, litografia E-Beam, *soft*-litografia, nanolitografia [1.12] [1.13].

In genere la progettazione di un dispositivo complesso richiede lavorazioni 3D e l'utilizzo di materiali con caratteristiche diverse a seconda del tipo di applicazione. L'obiettivo è infatti realizzare dispositivi simili a quelli macroscopici, composti da più elementi, ma caratterizzati da dimensioni molto ridotte. I requisiti richiesti per questo tipo di componenti possono essere ottenuti tramite le macchine a controllo numerico (CNC *machine*) ad alta precisione. Esse permettono, infatti, di ricavare forme 3D con una vasta gamma di materiali e garantendo alti valori di accuratezza [1.14].

Inaspettatamente, però, si rileva una carenza di conoscenze relativa alla progettazione di oggetti meccanici di dimensioni particolarmente ridotte ma non ancora microscopiche. Comunemente, infatti, si pensa che basti disegnare un dispositivo in scala ridotta per ottenere il corrispettivo mini, ma non si è generalmente consci del fatto che in questa scala avvengono dei fenomeni che, per quanto concettualmente noti, non rientrano nell'esperienza del progettista. In realtà la progettazione e la produzione in scala millimetrica non sono una novità, ma sono confinate in settori di nicchia come la produzione di orologi o macchine fotografiche, mentre adesso si affacciano applicazioni di vario tipo nei settori biologico, farmacologico, biomedico, aerospaziale.

Mancando l'esperienza pregressa e l'abitudine a lavorare nell'ambito mini, manca anche la sensibilità necessaria ad identificare i fattori da tenere in considerazione negli studi e a comprendere l'entità delle forze in gioco e delle loro relazioni. In questo contesto ci si scontra con alcune problematiche: ad esempio fenomeni in genere trascurabili cominciano ad assumere ruoli significativi mentre quelli che comunemente fondamentali perdono d'importanza. Inoltre spesso i componenti non sono reperibili per cui è necessario progettare anche gli elementi più comuni. Questo aumenta i tempi ed i costi oltre ad aprire la strada a nuove problematiche: oggetti nuovi da testare o tarare, materiali e lavorazioni tecnologiche da scegliere, problemi di misura e di verifica in quanto non sono più applicabili le tolleranze dimensionali applicate nella scala macroscopica.

Osservando il grafico di figura 1.10, che mostra gli attuali processi tecnologici in funzione della dimensione dell'oggetto e dell'accuratezza richiesta, risulta evidente come esista un dominio, tra 10 a 10⁴ µm, per il quale non esiste una tecnologia di lavorazione appositamente dedicata [1.15] [1.16]. Tutte queste problematiche stanno spingendo molti ricercatori a studiare la realizzazione di nove macchine utensili progettate appositamente per la mini/micro-scala in modo da coprire questa mancanza di tecnologie [1.17].

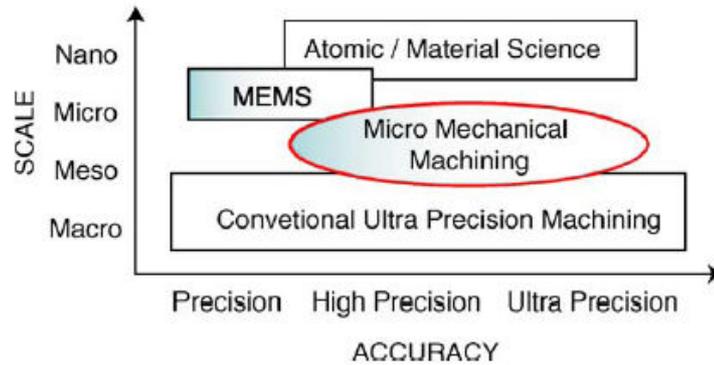


figura 1.10: Intervalli dimensionali di applicazione delle diverse tecnologie di fabbricazione [1.16].

1.4 Biomateriali e interfacce con i sistemi biologici nei dispositivi medici

Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (*II International Consensus Conference on Biomaterials*, Chester, Gran Bretagna, 1991).

È definito dispositivo medico uno strumento, un apparecchio, un impianto, una sostanza, o altro prodotto usato da solo o in combinazione, compreso il software informatico impiegato per il corretto funzionamento, e destinato dal fabbricante ad essere impiegato nell'uomo a scopo di:

- diagnosi, prevenzione, controllo, terapia o attenuazione di una malattia;
- diagnosi, controllo, terapia, attenuazione o compensazione di una ferita o di un handicap;
- studio, sostituzione e modifica dell'anatomia o di un processo fisiologico;
- intervento sul concepimento, purché non eserciti l'azione principale nel o sul corpo umano, cui è destinato, con mezzi farmacologici o immunologici, né mediante processo metabolico, ma la cui funzione possa essere coadiuvata da tali mezzi. (Direttiva 93/42/CEE) [1.18].

I biomateriali sono speciali materiali che operano in intimo contatto con i tessuti viventi, minimizzando le eventuali reazioni avverse o di rigetto da parte dell'organismo. L'utilizzo dei biomateriali nella fabbricazione di dispositivi medici è molto vasto. A seconda del tipo di applicazione vengono utilizzate diverse classi di materiali, scegliendo la più vantaggiosa in base alle caratteristiche chimico-strutturali. È possibile raggruppare i materiali in cinque categorie: metalli, polimeri, ceramici, compositi e materiali biologici [1.19]. Un materiale, per essere impiegato con successo in una certa applicazione, deve avere sia le caratteristiche fisiche e chimiche appropriate, sia le caratteristiche tecnologiche che consentono la trasformazione del materiale nel manufatto. La mancanza di caratteristiche tecnologiche rende talvolta inutilizzabili, in certe applicazioni, materiali che hanno invece le adatte proprietà fisiche e chimiche.

Materiali	Vantaggi	Svantaggi	Esempi
Polimeri (nylon, silicone, poliestere, PTFE)	Facile da fabbricare, elastico	Non forti, aumenta deformazione con tempo, possono degradare	Suture, protesi vascolari, hip socket, tessuti morbidi
Metalli (Ti è leghe, Co-Cr, acciaio inox, Au, Ag, Pt)	Forti, duttili, resistenti	Possono corrodere, dense, difficile da fabbricare	Sostituzione articolazioni, osso, impianti dentali, fili
Ceramiche (Al ₂ O ₃ , CaPO ₄ e idrossiapatite, carbone)	Altamente biocompatibile, inerte, resistente a compressione	Non elastico, fragile	Dentale, rivestimento impianti dentali e ortopediche
Compositi (Carbone-carbone, cemento osseo rinforzato)	Forti, possono essere fatti a misura	Difficile fabbricazione	Impianti articolazioni, valvole cardiache

figura 1.11: Classi dei materiali utilizzati in ambito medico.

La progettazione di un dispositivo medico differisce dal punto di vista metodologico e operativo da quella di un qualsiasi altro dispositivo, in quanto viene imposta una grande quantità di vincoli, non sempre completamente conosciuti. Ciò è dovuto principalmente a due fattori: la conoscenza dell'anatomia e della fisiologia umana è spesso qualitativa piuttosto che quantitativa, e ciò comporta la mancanza di informazioni precise; il secondo fattore è che, non essendo gli organi prodotti industriali, le caratteristiche anatomiche e funzionali possono variare da soggetto a soggetto.

Uno dei problemi peculiari che riguarda le applicazioni dei biomateriali è quello della compatibilità con l'ambiente biologico, che ha fondamentalmente tre aspetti:

- la compatibilità morfologica, legata a forma, dimensione e massa;
- la compatibilità funzionale, legata al ruolo svolto dal dispositivo rispetto al ruolo atteso;
- la compatibilità biologica o biocompatibilità, legata a tutti gli aspetti di natura chimica e biologica che possono indurre alterazioni dannose sia nei tessuti naturali sia nei materiali artificiali a contatto con i tessuti.

La compatibilità è quindi un insieme di proprietà legate all'interazione tra il dispositivo e l'organismo che occorre tenere in considerazione durante la progettazione. Inoltre le strutture biologiche evolvono nel tempo, in modo non sempre prevedibile, rendendo l'interazione un fenomeno dinamico.

Le esigenze di compatibilità e di affidabilità di un dispositivo crescono o diminuiscono in relazione a tre aspetti principali che sono il tempo, la posizione e la funzione.

- Il tempo: l'applicazione di un dispositivo medico può essere permanente come nel caso di una protesi di cui non si prevede l'espianto; può essere temporanea come nel caso di placche per osteosintesi che vengono rimosse o nel caso di dispositivi di ausilio alla chirurgia; può infine essere periodica come nel caso dei filtri per emodialisi.
- La posizione: un dispositivo medico può essere totalmente intracorporeo come nel caso delle protesi valvolari cardiache; può essere parzialmente intracorporeo come nel caso dei drenaggi chirurgici o nel caso dei fili di trazione per la riduzione delle fratture ossee; può infine essere totalmente extracorporeo come le apparecchiature di assistenza.
- La funzione: un dispositivo medico può assolvere una funzione da cui dipende la vita dell'organismo come nel caso del cuore artificiale; oppure può svolgere una funzione non vitale come nel caso di una protesi d'anca.

È evidente che l'affidabilità di un dispositivo deve essere superiore per un'apparecchiatura con funzione vitale impiantata permanentemente nell'organismo piuttosto che per un dispositivo extracorporeo non vitale di impiego temporaneo.

L'impianto di un qualsiasi materiale estraneo nell'organismo umano comporta una serie di effetti che potranno portare all'integrazione dell'impianto oppure, per varie cause, al suo fallimento. Tali effetti possono essere distinti essenzialmente in due grandi categorie: quelli provocati dall'impianto sul tessuto ospite e quelli invece provocati dal tessuto ospite sul dispositivo impiantato [1.18]. Gli effetti dell'impianto sull'ospite possono essere interazioni con il sangue (coagulazione, emolisi, attivazione dei leucociti), cito ed emotossicità, infiammazione, infezione, carcinogenesi, sensibilizzazione allergica, tossicità sistemica e reazioni immunitarie. Gli effetti dell'ospite sull'impianto possono essere fisico-meccanici (usura, fatica, corrosione, ossidazione, *surface cracking*, degradazione) o biologici (assorbimento di sostanze dai tessuti, degradazione enzimatica, calcificazione).

Le proprietà intrinseche (cioè di massa) di qualsiasi materiale dipendono dalla sua struttura atomica o molecolare interna ed è questa ad influire sul comportamento fisico-meccanico del materiale. Allo stesso tempo l'interfaccia con l'ambiente in cui il materiale deve operare gioca un ruolo cruciale nel determinare il tipo di interazione, ed in questo contesto sono di fondamentale importanza le proprietà della superficie del materiale (rugosità, composizione chimica, disomogeneità, rivestimento, trattamenti superficiali). Nella soluzione ottimale il materiale ed il tessuto dovrebbero interagire nel modo più appropriato possibile per garantire l'efficacia del dispositivo.

1.4.1 I metalli in medicina

L'impiego di materiali metallici in campo biomedico è legato alle loro buone proprietà meccaniche. Nell'applicazione più tradizionale, che è quella ortopedica, il materiale ha il compito di sostituire o integrare in modo permanente o temporaneo le funzioni di una struttura ossea. Deve quindi essere modellato nella forma prevista e dovrà interagire sia dal punto di vista meccanico sia da quello biologico con l'ambiente circostante. Sono quindi richieste buone caratteristiche meccaniche, facilità di lavorazione e biocompatibilità. Negli anni passati si è fatto ricorso a materiali tradizionali già sviluppati industrialmente, rispondenti ai primi due requisiti e dotati di una buona resistenza alla corrosione, come gli acciai inossidabili e leghe a base di cobalto e di titanio. Successivamente lo sviluppo delle ricerche sui biomateriali ha portato alla progettazione di nuove leghe e il perfezionamento di quelle esistenti, focalizzando l'interesse sulle leghe di titanio, sui materiali a memoria di forma e sulle tecnologie di trattamento superficiale.

I più importanti vantaggi dei biomateriali metallici sono i seguenti:

- elevato modulo elastico (circa 100- 200 GPa);
- elevato carico di snervamento (circa 300-1000 MPa), possono quindi sopportare carichi elevati senza rompersi né deformarsi;
- buona duttilità: se lo sforzo supera il limite di snervamento il materiale si deforma plasticamente anziché rompersi in maniera fragile, così può essere sostituito;
- assenza di viscoelasticità;
- elevata resistenza alla fatica meccanica.

D'altro canto presentano però i seguenti svantaggi:

- hanno mediamente un peso specifico superiore rispetto ai biomateriali polimerici e compositi;
- sono, in generale, più difficili da fabbricare rispetto ai polimeri;
- tendono a corrodarsi e ad usurarsi a causa del contatto con i liquidi biologici.

I biomateriali metallici possono essere lavorati utilizzando gran parte delle tecnologie tradizionali e spesso le loro proprietà meccaniche possono essere modificate opportunamente prima che il pezzo raggiunga la forma finale. Per garantire un'elevata biocompatibilità è

necessario curare le tecnologie di fabbricazione, soprattutto per quanto riguarda la finitura superficiale.

La biocompatibilità dei metalli è connessa al problema della corrosione in ambiente biologico, visto che i fluidi organici hanno un elevato potere corrosivo nei confronti dei metalli. Da questo punto di vista il corpo umano è assimilabile ad una soluzione acquosa, con temperatura attorno ai 37°C, contenente ioni cloruro e con un pH medio di circa 7,4. Tale soluzione è inoltre fortemente ossigenata e contiene un'elevata quantità di sali e composti organici ed inorganici e pertanto presenta una conducibilità elettrica abbastanza elevata. Per tutti questi fattori, l'organismo umano risulta l'ambiente ideale per l'instaurarsi di celle di corrosione. Le conseguenze sono la perdita di materiale metallico, con la possibilità di perdita di funzionalità dell'impianto e di contaminazione dei tessuti biologici. Gran parte di questi problemi sono relativi ai dispositivi impiantati, mentre, per quelli non impiantati, i metalli presentano inconvenienti minori e sono i materiali più impiegati laddove sono richieste proprietà meccaniche elevate ed affidabilità nel tempo.

1.4.2 I polimeri in medicina

Numerosi polimeri vengono attualmente impiegati nei dispositivi medici. I campi in cui trovano maggiore applicazione sono il controllo del flusso sanguigno e di altri fluidi corporei (cateteri, cannule, drenaggi), le superfici articolari nelle protesi ortopediche, le lenti a contatto ed intraoculari, le membrane per la somministrazione di farmaci, i rivestimenti per sensori e dispositivi elettronici impiantabili, la rigenerazione tessutale, le protesi vascolari e gli organi bioartificiali (dispositivi medici in cui si ha combinazione di materiali sintetici e di cellule o tessuti viventi) (figura 1.12) [1.20].

Polimero	Sigla	Principali applicazioni
Acido poliglicolico	PGA	Suture biodegradabili, placche e chiodi intramidollari, placche di frattura degradabili
Acido polilattico	PLA	Placche e chiodi intramidollari, legamento artificiali, placche di frattura degradabili, somministrazione controllata di farmaci
Copolimeri Butadiene-Stirene	BS	Articoli monouso, imballaggi
Copolimeri Stirene-Acrilonitrile	SAN	Aspiratori per sangue, componenti di emodializzatori
Poliacrilonitrile	PAN	Membrane per emodialisi
Poliammidi		Suture
Policarbonato	PC	Membrane per ossigenatori ed emodialisi, linee ematiche
Polidrossietilmetacrilato	PHEMA	Lenti a contatto, legamenti artificiali
Polietilene	PE; LDPE	Film, imballaggi, cateteri, tubi connettori, somministrazione controllata di farmaci
Polietilene (pm > 2000000)	UHMWPE	Superfici articolari, fibre per compositi, placche ortopediche, rivestimenti steli femorali
Polietilentereftalato	PET	Protesi vascolari, anelli di sutura, suture, passaggi transcutanei, componenti di protesi valvolari, componenti di assistenza cardiaca
Polimetilmetacrilato	PMMA	Cemento osseo, lenti a contatto, lenti intraoculari, membrane per emodialisi, materiali dentari
Polipropilene	PP	Imballaggi sterili, siringhe, connettori, membrane per ossigenatori, fili di sutura, anse di supporto lenti intraoculari
Polisolfone		Membrane per ossigenatori ed emodialisi
Poltetrafluoroetilene	PTFE	Protesi vascolari, componenti di protesi valvolari, legamenti artificiali, rivestimenti
Poliuretani	PURS	Cateteri, cannule, tubi endotracheali, protesi valvolari, membrane per emodialisi, sacche ventricolari, rivestimenti emocompatibili, dispositivi di assistenza cardiaca, somministrazione controllata di farmaci, protesi vascolari
Polivinilcloruro	PVC	Sacche per sangue, tubi indotracheali, guanti monouso, cateteri, accessori monouso
Siliconi		Cateteri, drenaggi, membrane, pelle artificiale, impianti per chirurgia plastica, protesi vascolari, protesi tracheali, rivestimenti, infusori, componenti di protesi valvolari

figura 1.12: Materiali polimerici maggiormente impiegati in campo medico e loro principali applicazioni.

I principali vantaggi che i polimeri presentano rispetto alle altre classi di materiali sono:

- una maggiore biocompatibilità;
- la possibilità di modificarne ampiamente la composizione e le proprietà fisico-meccaniche;

- bassi coefficienti di attrito;
- facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse;
- possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie;
- possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie.

Gli svantaggi principali sono:

- la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo (monomeri, catalizzatori, additivi, ecc.);
- la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante (anche nelle applicazioni in cui non è richiesto);
- le basse proprietà meccaniche;
- in alcuni casi, la difficoltà di sterilizzazione.

Le proprietà finali del dispositivo dipendono sia dalla struttura molecolare intrinseca del polimero sia dai processi chimici e fisici a cui è sottoposto. Le caratteristiche della zona superficiale del materiale, che si trova a diretto contatto con i fluidi ed i tessuti corporei, determinano la risposta biologica dell'organismo ospite perché sono responsabili della trasmissione delle sollecitazioni, dell'adesione, dell'attrito, dell'abrasione, della permeabilità a gas e a liquidi, della compatibilità con l'ambiente organico corrosivo circostante, ecc.

1.5 Breve presentazione delle diverse problematiche affrontate

In questo paragrafo sono introdotte brevemente le varie problematiche affrontate nel lavoro di tesi. Lo studio ha preso in esame l'applicazione di differenti metodi e tecnologie in funzione della variazione della scala dimensionale. A questo scopo è stato utile fare riferimento a dei dispositivi esemplificativi, il cui studio sarà poi sviluppato in modo più esteso ed articolato nei capitoli successivi.

Interfaccia con i tessuti – $L \approx 1\text{ cm}-1\text{ mm}$ (dispositivo bulk)

La prima problematica è stata sviluppata attraverso l'esame della progettazione e fabbricazione di alcune parti di una capsula endoscopica robotica. In questo caso il problema è stato affrontato inizialmente a livello di dispositivo *bulk*, focalizzando l'attenzione sul tipo di materiale e sulle caratteristiche meccaniche, piuttosto che sulle proprietà superficiali. Successivamente è stato approfondito il design della struttura superficiale.

Il primo approccio è stato la fabbricazione di alcune parti di una capsula endoscopica dotata di zampe. Il progetto, in cui questo lavoro è inserito, mira a sviluppare capsule robotiche a locomozione attiva per diagnosi e terapia del tratto gastro-intestinale con l'obiettivo di migliorare le capsule endoscopiche attualmente in commercio che si muovono passivamente, spinte dalla peristalsi.

Inizialmente è stato condotto uno studio del dispositivo *bulk*, analizzando la fabbricazione dei singoli pezzi. In questo contesto il requisito principale è la funzionalità del dispositivo: come nel caso delle macchine macro, è importante la resistenza del materiale, la facilità con la quale possono essere assemblati i pezzi in fase di montaggio e l'affidabilità piuttosto che la finitura superficiale; a differenza dei componenti macro, però, nella scala mini cominciano a giocare un ruolo significativo anche le forze di superficie. Inoltre in questo *range* dimensionale le tecniche di fabbricazione devono essere scelte con cura perché le tolleranze ammesse influiscono in modo significativo sul risultato. Inoltre molti componenti non sono disponibili in commercio e devono essere progettati e realizzati in base alle specifiche richieste. Nel caso preso in esame, il dispositivo deve entrare in contatto con un tessuto. È fondamentale valutare le forze in gioco ed è essenziale che il tessuto non sia danneggiato; tuttavia non avvengono scambi chimici o biologici significativi tra le due superfici.

Nell'ambito di questa applicazione, descritta dettagliatamente nel capitolo 2, è stato curato il design delle zampe, che sono l'elemento di interfaccia tra la capsula e il tessuto intestinale, attraverso la progettazione, la simulazione agli elementi finiti e la scelta delle tecniche di micro fabbricazione, seguite da test di caratterizzazione meccanica e prove del dispositivo finale su tessuto in ambiente sia *ex-vivo* sia *in-vivo*. Oltre al design delle zampe, è stato approfondito lo studio delle tecniche di fabbricazione per realizzare le varie parti del sistema robotico. Un tale dispositivo richiede tecnologie avanzate per lavorare pezzi di piccole dimensioni e l'affidabilità necessaria ad un sistema robotico, unite alla capacità di non danneggiare l'ambiente fisiologico nel quale il dispositivo è inserito. In questo contesto i materiali prescelti sono stati soprattutto metalli, viste le loro buone proprietà meccaniche e la loro ottima lavorabilità alle macchine utensili, quali ad esempio *wire-EDM*, *milling machine*, *CNC machine*.

Interfaccia con i tessuti – $L \approx 1\text{ cm}-1\text{ mm}$ (struttura superficiale)

Approfondendo lo studio dell'interfaccia zampe/tessuto è sorta la necessità di sviluppare una struttura superficiale che aumentasse l'attrito della capsula endoscopica con il tessuto intestinale, molto scivoloso a causa dello strato di muco che ricopre la mucosa. Sono state realizzate diverse soluzioni: micro-uncini metallici e membrane polimeriche. La prima, sebbene funzionante, si è rivelata poco sicura perché capace di danneggiare le pareti intestinali. Sono state quindi studiate più nel dettaglio le superfici polimeriche. L'uso dei metalli è richiesto nel sistema *bulk* per ottenere determinate resistenze e garantire il corretto assemblaggio dei pezzi. In questo ambito, essendo l'interfaccia tessuto/membrana il *focus* principale, una struttura polimerica riesce a garantire migliori *compliance*, elasticità e adattabilità. I materiali polimerici offrono vari vantaggi, poiché le loro caratteristiche meccaniche possono essere modulate ed esiste una vasta gamma di polimeri biocompatibili. Le tecniche di lavorazione dei polimeri sono state inoltre standardizzate per fabbricare o replicare strutture nella scala micrometrica (alcuni esempi sono la *soft-lithography*, la *photolithography* e il *casting*), ciò permette di svincolarsi dalle macchine utensili e dal problema delle tolleranze.

In questo contesto, l'attenzione è focalizzata sulle interfacce superficiali, dove le forze in gioco da valutare sono l'adesione, la capillarità e l'attrito. È stata realizzata una struttura polimerica e biocompatibile, descritta nel capitolo 3, utilizzata per aumentare l'attrito tra la capsula e le pareti intestinali. La superficie di un film polimerico è stata micro-strutturata in modo da favorire un meccanismo di interconnessione tra tessuto e interfaccia e aumentare l'adesione tra i due. Successivi test sperimentali hanno mirato a dimostrare l'efficacia di questo metodo nell'aumentare l'aderenza del dispositivo alle pareti intestinali e la totale assenza di danni al tessuto.

Interfaccia con le cellule – $L \approx 1\text{ mm}-10\ \mu\text{m}$

Nel terzo scenario, trattato nel capitolo 4, l'interfaccia biologica è costituita da cellule. Per quanto riguarda i materiali utilizzati, la scelta cade ancora sui polimeri. Il fattore principale che differenzia questo caso dai precedenti è il tipo di interfaccia biologica, costituita non più da un tessuto, ma da coltivazioni di cellule. In questo contesto la biocompatibilità e la non citotossicità diventano un elemento fondamentale, le cellule sono infatti molto selettive riguardo al tipo di substrato su cui crescere e riprodursi. La difficoltà tecnologica risiede nella necessità di creare una struttura che risponda a tutte le specifiche biologiche, ma che abbia allo stesso tempo funzionalità ingegneristiche. A questo livello le forze di superficie sono predominanti, non ha quindi molto senso distinguere tra parte *bulk* e parte superficiale del dispositivo.

Il dispositivo realizzato consiste in una piattaforma di studio del sistema tattile, nella quale l'obiettivo è costruire un sistema ibrido artificiale/biologico che riproduca il senso del tatto.

La struttura è pensata sia come piattaforma di studio sia come primo passo nella realizzazione del sensore bio-ibrido, nel quale la parte biologica (le cellule) fornisce spontaneamente un segnale a seguito di uno stimolo esterno e la parte artificiale è in grado di registrare, analizzare e trasmettere ad un PC questa risposta. La struttura deve essere progettata in modo da ospitare colture cellulari e da permettere il monitoraggio costante dell'attività delle cellule. In particolare, sono stati realizzati elettrodi deformabili costituiti da un substrato polimerico e da uno strato metallico conduttivo. Oltre alla lavorazione dei polimeri, sono state approfondite le tecniche di deposizione di film metallici e di *bonding* all'interfaccia polimero/metallo. È stato inoltre esaminato il fenomeno dell'adesione delle cellule all'elettrodo, cioè l'interazione tra la parte biologica e quella artificiale. Gli elettrodi sono stati testati per verificare l'affidabilità e la capacità di rilevare, attraverso l'analisi dell'impedenza, l'eventuale presenza di cellule sopra la struttura. Infine, la piattaforma realizzata è dotata di canali microfluidici che forniscono alle cellule il nutrimento necessario e garantiscono un efficiente scambio gassoso.

Interfaccia con i fluidi – $L < 10 \mu\text{m}$

Nel quarto e ultimo esempio, descritto nel capitolo 5, le tecniche apprese in precedenza sono state ulteriormente sviluppate per creare un dispositivo che entri in contatto con fluidi biologici. In questo ambito il lavoro svolto ha contribuito alla realizzazione di chip microfluidici dotati di micro-valvole e micro-pompe, da integrare in un sistema *lab-on-chip* per l'analisi delle proteine nel sangue. I sistemi *lab-on-chip* costituiscono una nuova frontiera della ricerca che mira a concentrare tutte le operazioni che attualmente si svolgono nei laboratori di analisi all'interno di un chip grande pochi centimetri, in modo da ridurre i tempi ed i costi dell'analisi. Sono stati realizzati diversi tipi di attuatori e valvole integrati nella struttura grazie all'utilizzo di tecniche di micro-fabbricazione litografiche e di lavorazione dei polimeri.

Anche in questo caso le forze predominanti sono quelle superficiali. Il dispositivo *bulk* non richiede particolari caratteristiche meccaniche (resistenza, durezza...), piuttosto la superficie deve essere biocompatibile, priva di difetti e adeguata per permettere alla struttura artificiale di entrare in contatto con la parte biologica. I microattuatori polimerici sviluppati sono stati testati al fine di valutare la capacità di gestire il flusso di fluidi all'interno del sistema *lab-on-chip* e la loro compatibilità con liquidi biologici (siero, sangue).

Bibliografia I

- [1.1] Feddema J T, Xavier P and Brown R 1999 Micro-Assembly Planning with van der Waals Force *Proceedings of the 1999 IEEE International Symposium on Assembly and Task Planning* Porto, Portugal
- [1.2] Wautelet M 2001 Scaling laws in the macro-, micro- and nanoworlds *Eur. J. Phys.* **22** 601-611
- [1.3] Arzt E, Gorb S and Spolenak R 2003 From micro to nano contacts in biological attachment devices *PNAS* **100** 10603-10606
- [1.4] Squires T M, Quake S R 2005 Microfluidics: Fluid Physics at the Nanoliter Scale *Rev. Mod. Phys.* **77** 977
- [1.5] Schmidt-Nielsen K 1984 Scaling: Why is Animal Size so Important? *Cambridge University Press* UK
- [1.6] Genet C and Ebbesen T W 2007 Light in tiny holes *Nature* **445**
- [1.7] Corbett J, McKeon P A, Peggs G N and Whatmore R 2000 Nanotechnology: international developments and emerging products *Annals of CIRP* **49** 523-546
- [1.8] Lang W 1999 Reflexions on the future of microsystems *Sensor and Actuators* **72** 1-15
- [1.9] Hsu T R 2002 MEMS and Microsystems –design and manufacture *McGraw Hill*
- [1.10] Madou M 1998 Facilitating choices of manufacturing tools and materials for miniaturization scende: a review *Tribology issues and opportunities in MEMS* Bushan Kulwer Academic Publisher pp. 31-51
- [1.11] Madou M J 1997 Fundamentals of Microfabrication *CRC Press* Boca Raton
- [1.12] Chase J G and Smith B W 2001 Overview of Modern Lithography Techniques and a MEMS-Based Approach to High Throughput Rate Electron Beam Lithography *Journal of intelligent material systems and structures* **12**
- [1.13] Xia Y and Whitesides G M 1998 Soft Lithography *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28** 153-84
- [1.14] Masuzawa T 2000 State of the art of micromachining *Annals of CIRP* **49** 473-488
- [1.15] Ehmann K F, DeVor R E and Kapoor S G 2002 Micro/meso-scale mechanical manufacturing – opportunities and challenges- *JSME/ASME International Conference on Materials and Processing* October 15-18, Honolulu HI, **1** 6-13
- [1.16] Chae J, Park S S and Freiheit T 2006 Investigation of micro-cutting operations *International Journal of Machine Tools & Manufacture* **46** 313-332
- [1.17] Kussul E, Baidyk T, Ruiz-Huerta L, Caballero-Ruiz A, Velasco G and Kasatkina L 2002 Development of micromachine tool prototypes for microfactories *Journal of Micromechanics and Microengineering* **12** 795-812
- [1.18] Pietrabissa R 1996 Biomateriali per organi artificiali *Pàtron* Bologna, Italia
- [1.19] Ratner B D 2004 Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine *Elsevier Academic Press* California, USA
- [1.20] Chiellini E, Giusti P 1983 Polymers in medicine: biomedical and pharmacological applications *Plenum Press* New York, USA

Capitolo 2

Sistemi di interfaccia con i tessuti – dispositivo bulk

2.1 Introduzione

La scala “mini” cade tra la tradizionale scala macro e la microscala, dalle centinaia di micrometri/millimetro al centimetro [2.1] [2.2]. Questa scala presenta una serie di sfide di progettazione e fabbricazione peculiari e spesso la creazione di un singolo pezzo richiede un processo composto da più fasi e/o l’uso combinato di più tecnologie. Ottenere un corretto assemblaggio dei diversi componenti in un dispositivo complesso è strettamente legato alla precisione delle tolleranze dei singoli pezzi. In questo lavoro sono state studiate ed applicate varie tecniche per la fabbricazione di una capsula endoscopica robotica. Questo caso di studio serve come esempio per descrivere le problematiche e le possibili soluzioni coinvolte nella creazione di dispositivi composti da più parti nella scala mini.

In questo capitolo vengono descritte la progettazione, la fabbricazione e l’assemblaggio di una capsula endoscopica robotica sviluppata per la diagnosi ed il trattamento dei disturbi del tratto gastro-intestinale [2.3]. Le capsule endoscopiche devono avere dimensioni ridotte per poter essere ingoiate, ma allo stesso tempo necessitano di meccanismi miniaturizzati complessi che ne controllino la posizione ed il movimento. Il prototipo discusso rispetta quasi fedelmente le dimensioni delle pillole commerciali, approvate dalla *Food and Drug Administration* (FDA) [2.4]. Esso è composto da un involucro esterno cilindrico (11.1 mm in diametro e 27 mm in lunghezza) che contiene 72 parti. La fabbricazione di questi componenti richiede la combinazione di più tecniche di fabbricazione, incluse macchine a controllo numerico (*CNC machines*), macchine elettroerosione a filo e a tuffo (*sink* e *wire EDM*) e macchine a taglio laser (*laser cutting*).

Il capitolo è così organizzato: nel paragrafo 2.2 vengono presentati l’applicazione medica del dispositivo, un breve stato dell’arte sulle capsule endoscopiche ed una descrizione della capsula realizzata; nel paragrafo 2.3 viene inizialmente esposto il background delle tecniche di fabbricazione nella scala mini, sono poi descritti i componenti più significativi (scelta dei materiali e procedure di fabbricazione) e le procedure di assemblaggio dei pezzi in un unico dispositivo; nel paragrafo 2.4 sono esposte le misure sperimentali e la valutazione dell’accuratezza ottenuta; un paragrafo a parte (2.5) è dedicato allo studio delle zampe, che costituiscono l’interfaccia con il tessuto e sono quindi l’elemento su cui è stato focalizzato maggiormente l’interesse. L’ultimo paragrafo presenta una discussione dei risultati e sintetizza le lezioni imparate tramite questo caso di studio per quanto riguarda la progettazione e realizzazione nella scala mini.

2.2 Applicazione

2.2.1 Le capsule endoscopiche come strumento diagnostico nei disturbi del tratto gastrointestinale

Il cancro del colon-retto è una delle neoplasie a più elevata incidenza nel mondo occidentale e rappresenta la seconda causa di mortalità per neoplasia in ambedue i sessi sia in Europa che negli Stati Uniti [2.5] [2.6]. È una tipologia di tumore prevenibile nelle fasi preneoplastiche maligne e precocemente diagnosticabile, per cui numerosi sforzi sono stati profusi dal mondo scientifico per attivare nuove tecniche nel campo dell’analisi endoscopica. I risultati hanno

portato sia a migliorare strumenti in parte già adottati nella pratica clinica, sia a progetti di ricerca rivoluzionari che mirano a rendere il compito del medico sempre più una sinergia tra operatore, paziente e macchina “intelligente”. Infatti negli ultimi anni si è passati da modelli sempre più evoluti di endoscopi, a capsule ingeribili munite di video-camera, fino ai “futuristici” robot autonomi, di forma capsulare, bio-ispirati, capaci di esplorare il tratto gastrointestinale inviando all'esterno dati e immagini ed addirittura di intervenire chirurgicamente. Dal punto di vista ingegneristico il tubo digerente rappresenta un distretto relativamente conveniente in quanto gli orifizi naturali costituiscono delle porte di accesso ed inoltre i dispositivi introdotti non necessitano di particolari procedure di sterilizzazione.

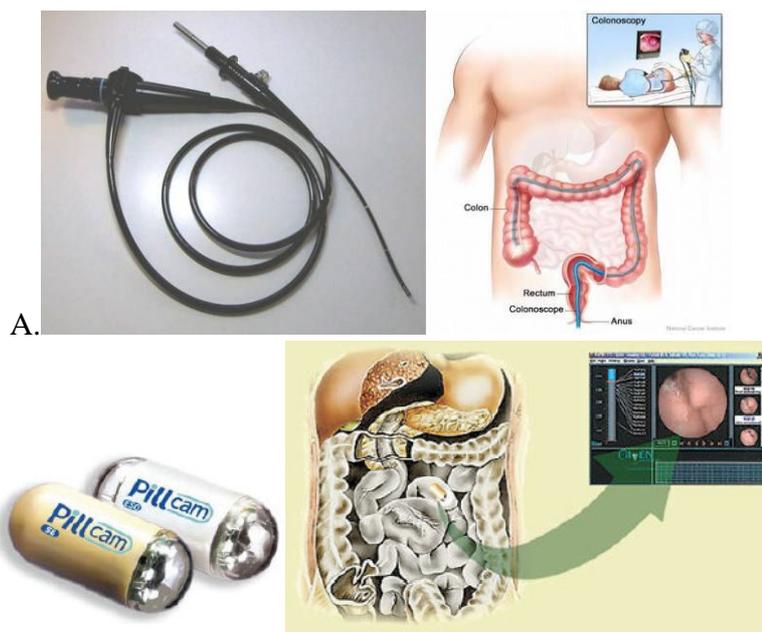


figura 2.1: L'evoluzione delle tecniche di diagnostica endoscopica, dagli endoscopi tradizionali (A) alle capsule endoscopiche *wireless* (B).

L'integrazione di telecamere all'interno di pillole endoscopiche è un'innovazione recente nel campo delle tecnologie mediche che rende possibile la diagnosi visiva all'interno del tratto gastro-intestinale in modo non invasivo [2.7]. Le immagini fornite da queste capsule *wireless* sono altamente significative dal punto di vista medico: possono rivelare la posizione e la gravità di lesioni o sanguinamenti, permettendo l'ispezione di escrescenze della parete intestinale potenzialmente cancerogene e la valutazione della salute generale di tutto il sistema digerente. Una discussione dettagliata del valore clinico delle capsule endoscopiche può essere consultata in [2.8] [2.9].

La maggiore debolezza delle attuali capsule endoscopiche è l'incapacità di controllare direttamente la loro posizione e il loro orientamento nel tratto gastro-intestinale. Si muovono, infatti, passivamente spinte dalla peristalsi (contrazione muscolare involontaria che muove il cibo durante la digestione). In questo modo non è possibile fermare la capsula e neppure cambiare la velocità e la direzione del moto; questo limita sia la quantità che la qualità delle immagini ottenute. Queste limitazioni sono particolarmente evidenti nel colon, dove la capsula si muove e ruota in modo imprevedibile data la grande differenza tra il diametro del canale (~ 4 cm) e della capsula (~ 1 cm). Una possibile soluzione a questi problemi consiste nel dotare la capsula di un sistema di locomozione [2.10]. Esistono principalmente due tipi di approcci: uno esterno ed uno interno. Nel primo caso la capsula, contenente dei magneti permanenti, viene guidata tramite campi magnetici esterni generati da magneti e/o bobine [2.11] [2.12] [2.13], in modo da ridurre il peso e l'ingombro della capsula. Il secondo approccio si basa sull'integrazione di sistemi di locomozione autonomi all'interno del

dispositivo, portando vantaggi in termini di precisione ed affidabilità del moto. Seguendo quest'ultimo metodo, è stata sviluppata una capsula dotata di zampe bioispirata agli insetti, visto che essi riescono a camminare su terreni disconnessi ed irregolari che possono essere paragonati alle pareti intestinali [2.14].

2.2.2 Il dispositivo preso in esame

Il lavoro si inserisce nell'ambito dello sviluppo di una capsula endoscopica robotica a zampe: nel corso del progetto sono stati sviluppati diversi prototipi [2.15] [2.16], il più avanzato dei quali è il modello dotato di 12 zampe [2.17]. La capsula, mostrata in figura 2.2, contiene due motori (Namiki Precision Jewel Co. Ltd), ognuno dei quali controlla in modo indipendente un set di 6 zampe. Ogni motore è collegato ad una vite senza fine attraverso un sistema di trasmissione a ruote dentate. Quando la vite ruota una slitta interna, collegata ai porta-zampe, trasla assialmente in modo da far aprire e chiudere i set di zampe con un movimento simile a quello di un ombrello. La capsula è composta di 72 parti diverse, con componenti caratterizzati da dettagli nella scala mini e micro. Nel presente lavoro vengono descritte la progettazione e fabbricazione dei singoli pezzi, come esempio di studio delle problematiche tecnologiche che si incontrano nella scala mini.

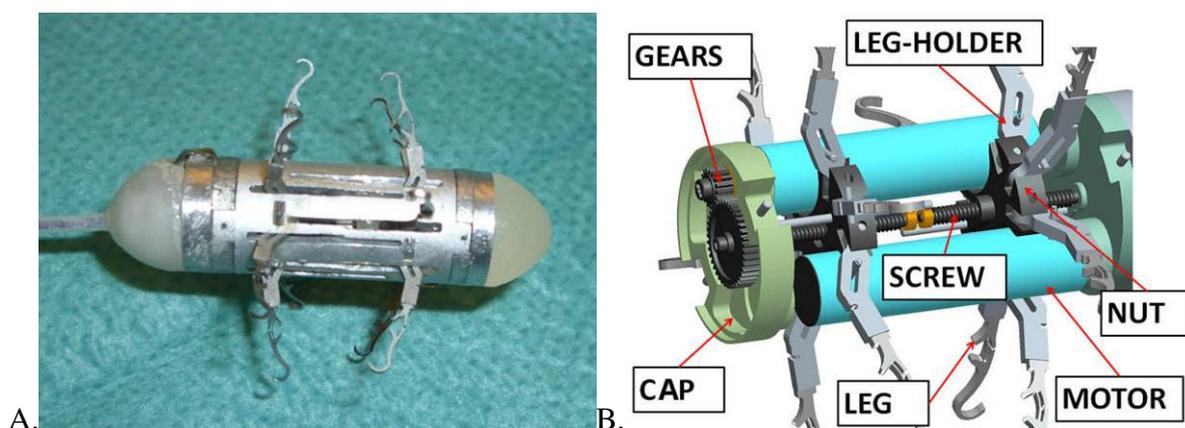


figura 2.2: A. Foto della capsula endoscopica robotica; B. Sketch CAD dei vari componenti all'interno della capsula.

2.3 Tecniche di fabbricazione

2.3.1 Stato dell'arte sulla fabbricazione nella scala mini

La richiesta di componenti di dimensioni millimetriche con caratteristiche complesse sta aumentando negli ultimi anni nei settori aerospaziale, elettronico, biomedico e delle telecomunicazioni solo per citarne alcuni. Le tecniche attualmente utilizzate per questa scala dimensionale sono principalmente due: applicare le tecnologie proprie della micro-scala (ad esempio MEMS, *MicroElectroMechanical Systems*) oppure adottare quelle della macro-scala cercando di ottenere lavorazioni ad alta precisione [2.18]. Le tecniche MEMS sono di solito usate per la microfabbricazione e si limitano a strutture 2D, più uno spessore sull'asse z, e sono applicabili ad una ristretta classe di materiali (soprattutto silicio, quindi molto fragile) [2.19]. Dall'altro lato le macchine ad alta precisione possono superare questo problema, dato che sono in grado di lavorare geometrie 3D impiegando una vasta gamma di materiali. Tuttavia esse non ammettono una produzione in serie, allungando i tempi per riprodurre molte copie di un pezzo caratterizzato da dettagli complessi. Alcuni approcci innovativi possono costituire una soluzione, ma non sono ancora molto diffusi. Un esempio è dato dalla tecnica *Shape Deposition Manufacturing* (SDM) che permette di creare stampi con forme complesse per realizzare dispositivi multi-materiale [2.20] [2.21].

Un'altra sfida che si incontra nell'adattare le tecniche tipiche della scala macro è quella di ottenere un'accuratezza sufficientemente alta per i componenti miniaturizzati. Infatti la mancanza di attrezzatura piccola e precisa e l'inerzia delle macchine possono portare ad errori non trascurabili in questo *range* dimensionale. Inoltre alcuni effetti trascurabili nella macroscala, ad esempio la microstruttura o gli effetti di superficie, possono costituire un punto critico.

Allo scopo di superare i limiti delle tecnologie attuali molti gruppi di ricerca stanno sviluppando nuove macchine ed attrezzature specificatamente progettati per prodotti miniaturizzati [2.22] [2.23] [2.24], mirando allo sviluppo di vere e proprie micro-fabbriche [2.25], eventualmente assistite da tecnologie robotiche [2.26]. È possibile trovare una panoramica dei recenti sviluppi nella ricerca sulla micro-fabbricazione meccanica in [2.27].

Fino a quando questo campo di ricerca tecnologica non avrà raggiunto l'opportuna maturità, la migliore opzione disponibile è l'utilizzo di macchine ad ultra-precisione, innovative per quanto riguarda le prestazioni ma pur sempre tradizionali per quanto riguarda il tipo di tecnologia.

In questo lavoro vengono presentate le tecniche di fabbricazione utilizzate per la costruzione di un robot grande complessivamente un centimetro e composto da 72 pezzi, con dettagli mini e micrometrici. Lo scopo principale non è quello di studiare le caratteristiche delle singole macchine, ma piuttosto è investigare come combinare l'uso di diverse tecnologie per produrre dispositivi miniaturizzati complessi.

2.3.2 Fabbricazione dei singoli componenti

In questo paragrafo sono descritte le procedure di fabbricazione dei vari componenti, mostrati in figura 2.3. Partendo dal corpo e dai tappi della capsula, che costituiscono l'involucro esterno, procederemo poi all'interno lungo la catena cinematica, dalle serie di ingranaggi fino ai motori. Oltre ad una breve descrizione dei componenti più significativi, saranno descritte le strategie utilizzate e le motivazioni dietro ogni accorgimento. La maggior parte dei 72 componenti sono stati realizzati usando una o più di queste macchine:

- (1) Tornio (17D, EMCOMAT, Germany);
- (2) CNC 5 axis milling machine (HSPC, KERN, Germany);
- (3) Elettroerosione a tuffo - Sink EDM (T1-T4 SR-HPM, Sarix, Switzerland);
- (4) Elettroerosione a filo - Wire EDM (AP 200 L, Sodick, Japan);
- (5) Laser (Nd-YAG laser, Trumpf, Germany).

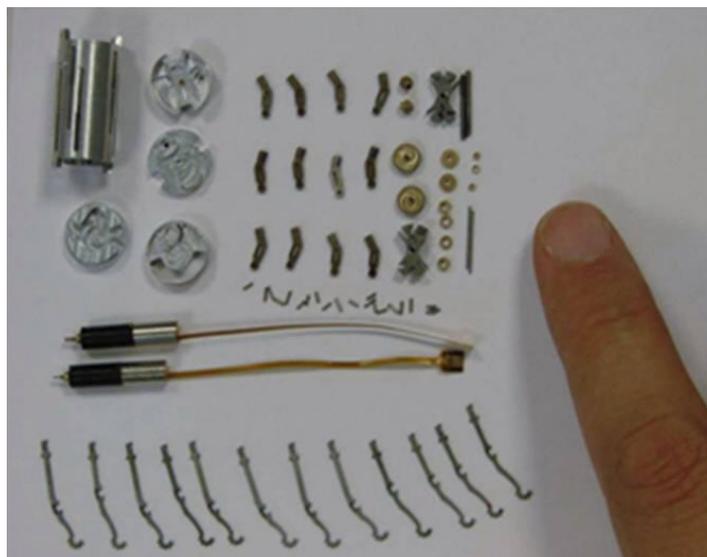


figura 2.3: Le varie parti che compongono la capsula.

Il tappo

Ci sono quattro tappi, due per ogni lato della capsula. Ognuno ha un diametro di 11.1 mm ed è stato lavorato in modo da ospitare gli ingranaggi e i circuiti elettronici (figura 2.4). I tappi contengono anche due superfici di riferimento che garantiscono un aggancio ripetibile con il corpo della capsula. I tappi ed il corpo sono fabbricati in Ergal 7075 usando la HSPC KERN *milling machine*. L'Ergal è semplice da lavorare, resistente all'usura e leggero, il che lo rende un materiale comunemente utilizzato nel campo aeronautico. Il tappo è stato lavorato partendo da un cilindro metallico, che è stato fissato al mandrino della macchina mentre su uno dei lati venivano lavorate le superfici esterne e interne. Il pezzo è stato poi tagliato alla lunghezza desiderata con il tornio, ruotato e fissato nuovamente sulla macchina per lavorare la faccia opposta.

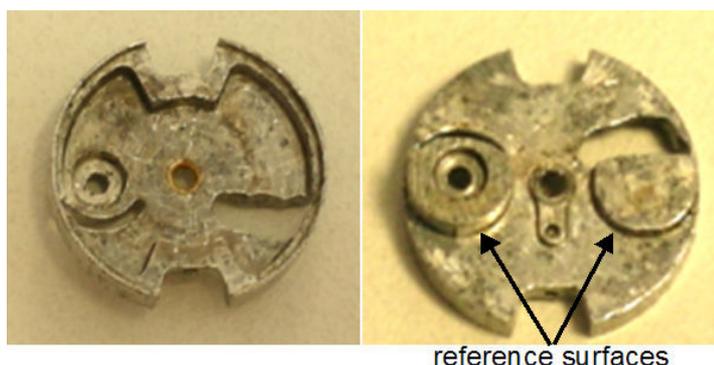


figura 2.4: Le due facce di uno dei tappi. Le due protrusioni cilindriche costituiscono le superfici di riferimento (hanno un diametro di 3.85 mm e uno spazio di interasse di 6.8 mm)

Per fare questo passaggio mantenendo i riferimenti corretti è stata realizzata un'attrezzatura di fissaggio direttamente sulla KERN, usando un pezzo cilindrico, nel quale è stato ricavato il profilo negativo del tappo (figura 2.5). Successivamente questa attrezzatura è rimasta fissata alla macchina, in modo da eliminare eventuali errori dovuti al posizionamento, vi è stato incollato sopra il tappo semilavorato usando cianoacrilato, ed è stata lavorata la seconda faccia. Per separare il tappo dall'attrezzatura i pezzi sono stati immersi in acetone in modo da sciogliere la colla. I dettagli più critici dell'attrezzatura sono due fori che garantiscono il corretto assemblaggio con il tappo. La distanza tra i centri dei fori è stata progettata in modo da essere leggermente maggiore rispetto a quella nei tappi, in modo da ottenere un aggancio facile e accurato; è stata scelta una tolleranza di -0.03 mm, quindi l'interferenza con i tappi non deve superare gli 0.06 mm.

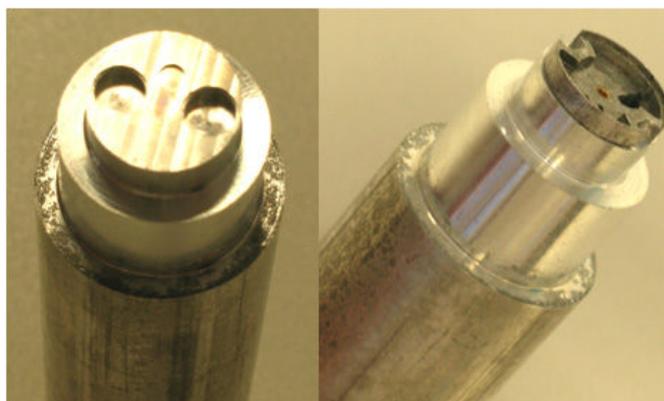


figura 2.5: L'attrezzatura utilizzata per fissare il tappo alla macchina. I fori hanno un diametro di 3.95 mm, l'immagine a destra mostra l'attrezzatura con un tappo fissato sopra, subito dopo la lavorazione della seconda faccia.

Una difficoltà aggiuntiva nella fabbricazione dei tappi è stata la lavorazione di alcune regioni sottili (spessore circa 150 μm). Tramite un procedimento *trial ad error* è stato possibile eliminare la deformazione del materiale riducendo l'alimentazione dello strumento del 30% rispetto ai valori raccomandati.

Il corpo della capsula

Il corpo della capsula ha un diametro di 11.1 mm e una lunghezza di 23.6 mm e contiene tutti gli altri componenti. Sulla superficie esterna sono state realizzate 12 fessure di 14.1 mm per il passaggio delle zampe e fori di 0.4 mm in diametro per ciascuna delle spine che connettono i porta-zampe alla parete del corpo (figura 2.6A). La realizzazione dei vari dettagli interni del corpo richiede un processo in due *step*, uno per ogni lato. Questo è dovuto in primis al fatto che i dettagli miniaturizzati richiedono frese di diametro piccolo che hanno di conseguenza un lunghezza ridotta per evitare la rottura dell'attrezzatura; inoltre il corpo non è cavo, ma all'interno si trova una superficie di spessore 1.5 mm sulla quale sono fissati gli ingranaggi e gli assi dei motori.

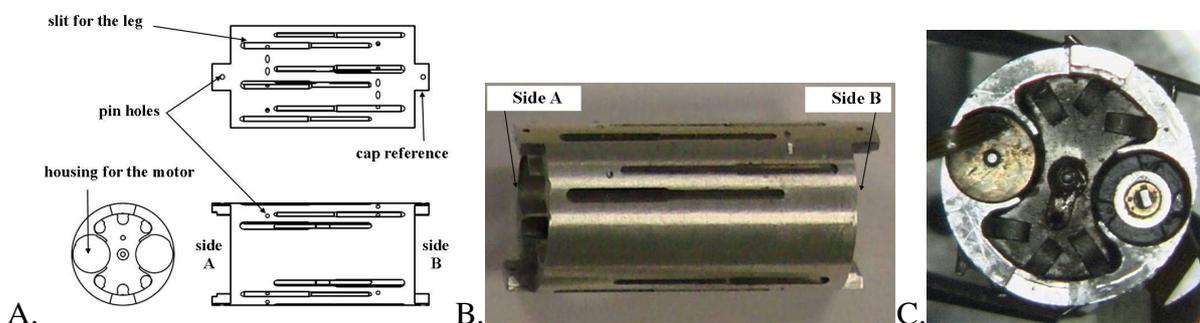


figura 2.6: A. Il corpo della capsula (11.1 mm dia diametro, 23.6 mm in lunghezza, i dettagli più piccoli sono 12 fori di diametro 0.4); B. il corpo realizzato in Ergal; C. una vista assiale della capsula già assemblata con parti interne e motori.

Il corpo è costruito a partire da un cilindro in Ergal di 11.1 mm in diametro, che è stato lavorato da un lato alla HSPC KERN per ottenere il profilo mostrato in figura 2.6C. Successivamente il pezzo è stato tagliato e riposizionato sulla macchina per lavorare il lato opposto. Per assicurare un posizionamento accurato sulla macchina, è stata realizzata un'attrezzatura che ha il profilo negativo del pezzo. Utilizzando lo stesso metodo già descritto per il tappo, l'attrezzatura è rimasta fissa sulla macchina mentre il pezzo è stato ruotato e riposizionato per lavorare il secondo lato. Questa procedura permette di ottenere dei riferimenti accurati e assicura che i due lati siano allineati sia assialmente sia radialmente. Successivamente, sfruttando i 5 assi di lavoro della macchina, sono stati realizzati i tagli per il passaggio delle zampe lungo la superficie del cilindro e i fori che alloggiavano le spine di supporto per i porta-zampe. A causa della curvatura della superficie della capsula non è stato banale creare i fori; prima le zone interessate sono state livellate con una fresa di piccolo diametro, successivamente sono stati realizzati fori per evitare la deflessione della punta (figura 2.7).

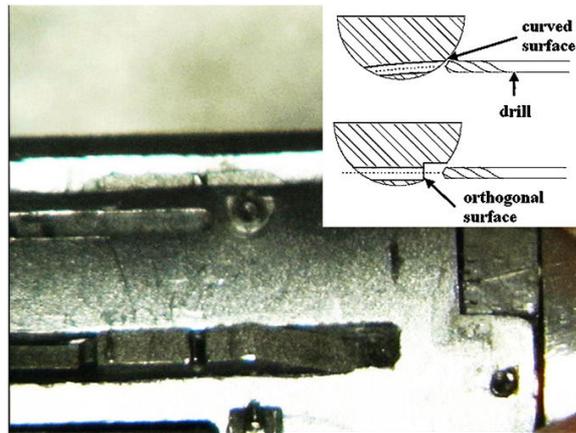


figura 2.7: La figura mostra le problematiche incontrate nella realizzazione dei fori dovute alla diversa traiettoria della punta su superfici curve e piane. Nella foto è possibile vedere uno dei fori realizzati grazie all'accorgimento di rendere piana la zona tramite fresatura.

Il porta-zampe

Ripercorrendo a ritroso la catena cinematica, l'ultimo elemento è costituito dalle zampe, ognuna delle quali è inserita in un porta-zampa (figura 2.8A) connesso tramite alcune spine sia alle pareti del corpo sia alle slitte interne che scorrono lungo la vite senza fine. Il porta-zampe è fabbricato in acciaio, infatti tutti i componenti che sono soggetti a forti stress meccanici o ad attrito sono stati realizzati in acciaio per ridurre l'usura e allungare la vita della capsula.

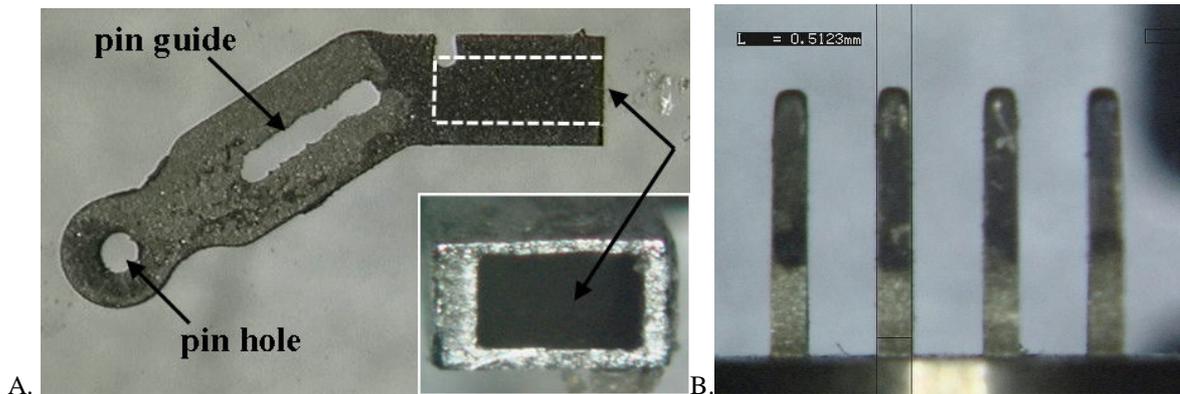


figura 2.8: Sezione longitudinale di un porta-zampe; la sua lunghezza totale è 7.38 mm, mentre il dettaglio più piccolo, il foro per la spina, è 0.4 mm in diametro. Il particolare mostra un ingrandimento della sede in cui sono inserite le zampe; B. serie di elettrodi utilizzati per realizzare i fori delle sedi (larghezza 0.9 mm, spessore 0.5 mm), è possibile notare la forma arrotondata dovuta all'erosione dei pezzi.

Il profilo esterno è stato tagliato utilizzando la macchina a elettroerosione a filo (*wire EDM*), mentre le sedi nelle quali vengono inserite le zampe sono state lavorate tramite elettroerosione a tuffo (*sink EDM*). La *sink EDM* necessita di un elettrodo di forma negativa rispetto al foro da realizzare (profilo rettangolare largo 0.9 mm e spesso 0.5 mm). Esso è stato fabbricato tramite HPSC KERN (pezzo grezzo) e *wire EDM* (definizione dell'elettrodo), il risultato finale è mostrato in figura 2.8B. Questa macchina utilizza archi elettrici che man mano erodono il materiale dell'elettrodo, in particolare per ottenere una sede delle zampe di dimensioni accurate è necessario utilizzare tre elettrodi per ogni porta-zampe, perciò è stata realizzata una serie di elettrodi.

Il foro per la spina di connessione è stato lavorato tramite *wire EDM* partendo da un foro di piccolo diametro. Per ottenere un'alta qualità della finitura superficiale, dopo la prima passata di taglio, la forma è stata rifinita attraverso molti tagli di precisione successivi.

La vite senza fine

Due viti senza fine sono utilizzate per far scorrere le slitte che trasmettono il moto ai portazampe. Questo componente nasce a partire da una vite commerciale (ISO M1 a profilo triangolare), in modo da poter utilizzare attrezzature per la filettatura standard. Le due estremità della vite sono state lavorate in modo da poter essere inserite da una parte negli ingranaggi al centro della capsula e dall'altra negli appositi riferimenti nei tappi. Il profilo della punta è composto da una prima parte cilindrica di diametro 0.45 mm e da una parte finale piatta di spessore 0.28 mm, che viene inserita direttamente nelle ruote dentate. È stato creato appositamente un gioco (0.05 mm) tra vite e ruota dentata in modo da rendere l'assemblaggio meno sensibile ad eventuali disallineamenti tra il corpo e i tappi della capsula. Un primo tentativo è stato fatto utilizzando la HPSC KERN, questo metodo creava però delle deformazioni sui pezzi, si è scelto quindi di utilizzare anche per questo componente la *wire* EDM.

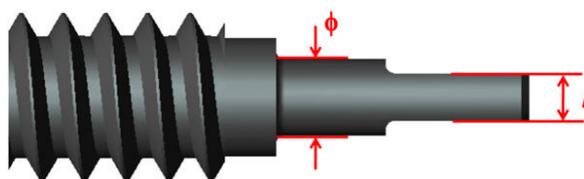
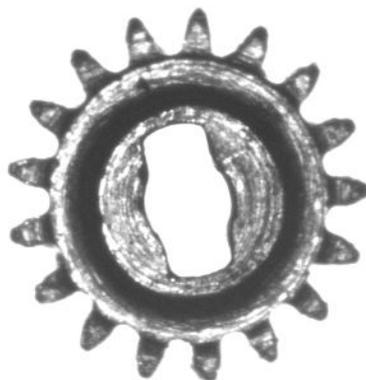


figura 2.9: Design della punta della vite senza fine: diametro $\phi = 0.45$ mm; spessore $l = 0.28$ mm.

Le ruote dentate

Tra il motore e la vite senza fine è inserita una catena di trasmissione a ruote dentate che trasmette e amplifica il momento torcente imposto dagli attuatori. Sono state appositamente realizzate diverse ruote dentate, a 40 e 17 denti. Dato che le tecniche di fabbricazione utilizzate sono le stesse per tutte le ruote, verrà descritta nel dettaglio solo la più piccola, che è connessa all'asse del motore tramite il foro centrale (figura 2.10).



A.
figura 2.10: La ruota dentata a 17 denti in ottone.

L'approccio tradizionale alla fabbricazione di ruote dentate prevede l'utilizzo di attrezzature dedicate con moduli standard. A causa dei limiti dimensionali imposti dal design complessivo della capsula, sono necessarie ruote con moduli minori di quelli comunemente disponibili a livello commerciale. Fabbricare attrezzature dedicate richiederebbe tempi e costi elevati, quindi è stato scelto di realizzare gli ingranaggi direttamente tramite *wire* EDM. Inizialmente una piastra di ottone è stata tagliata alla HSPC KERN per ottenere il foro centrale, che è stato poi lavorato alla *wire* EDM per ottenere la forma finale, sagomata in modo da permettere l'inserimento dell'asta del motore direttamente all'interno del foro. Per quanto riguarda i denti della ruota è stato scelto un modulo di 0.12 mm, che costituisce un compromesso tra i vincoli dimensionali della ruota e la facilità di lavorazione. Le coordinate dei profili della ruota sono

state calcolate tramite software e poi inserite direttamente nella macchina. Infine come tolleranza è stata stabilita una massima deviazione di $-5 \mu\text{m}$ rispetto ai valori nominali calcolati, in modo da creare un piccolo gioco che permette di connettere facilmente tutta la catena cinematica, garantendo il corretto funzionamento del dispositivo finale.

2.3.3 Assemblaggio del dispositivo

La fase di assemblaggio di così tanti pezzi di dimensioni millimetriche richiede particolari accorgimenti al fine di non danneggiare i vari componenti e soprattutto di consentire il funzionamento delle parti in movimento. Lo sketch di figura 2.11 mostra come le diverse componenti si combinano insieme. Inizialmente i motori vengono inseriti ed incollati nel corpo della capsula, contemporaneamente i porta-zampe vengono connessi alla slitta e alla vite senza fine che viene successivamente inserita nel corpo. Intanto le ruote dentate vengono fissate sui tappi e quindi questi vengono chiusi sul corpo facendo attenzione a non applicare una forza eccessiva per non rompere i componenti più fragili e a mantenere i corretti allineamenti per permettere il funzionamento della catena cinematica. Attenzione deve essere anche posta nell'uso della colla che, se troppa, può ostruire i fori o, se poca, può non essere sufficiente a mantenere i pezzi nella sede esatta. La correttezza dell'operazione di assemblaggio è testimoniata dal funzionamento del dispositivo finale [2.28].

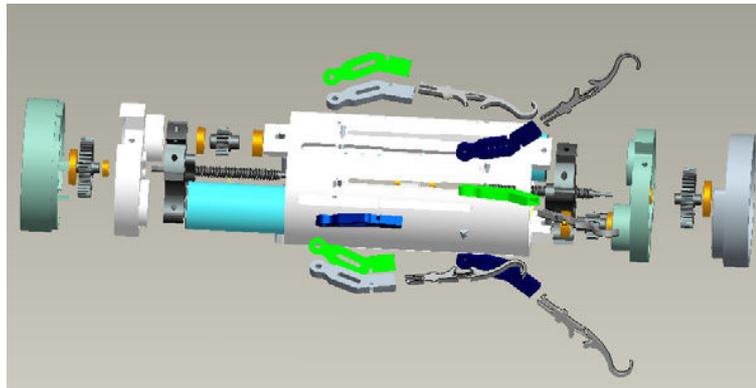


figura 2.11: Sketch dell'assemblaggio dei vari componenti all'interno della capsula.

2.4 Test sperimentali e verifica dei risultati

Dopo la fabbricazione dei singoli componenti, come descritto nel paragrafo 3, sono state condotte una serie di misure per valutare l'eventuale presenza di errori sulle parti essenziali al corretto funzionamento del dispositivo robotico. Sono stati utilizzati come strumenti di misura un microscopio ottico (MX-5040 RZ, Hirox, USA) e un *Multisensor coordinate measurement machine* (Benchtop VideoCheck[®] EA 400, Werth, Germany). In questo paragrafo sono descritti i risultati di questi test di valutazione.

Il tappo

Utilizzando il Video Check[®] sono stati misurati sia i tappi che le attrezzature progettate per fissare i pezzi sulla macchina HSPC KERN.

Il valore di interferenza misurato è:

$$In = \left(C - \frac{A+B}{2} \right) - \left(F - \frac{D+E}{2} \right) = 0.0039\text{mm}$$

Questa interferenza permette un accurato posizionamento assiale ed un fissaggio rigido del tappo sull'attrezzatura (combinato con l'uso della colla come descritto nel paragrafo 2.3).

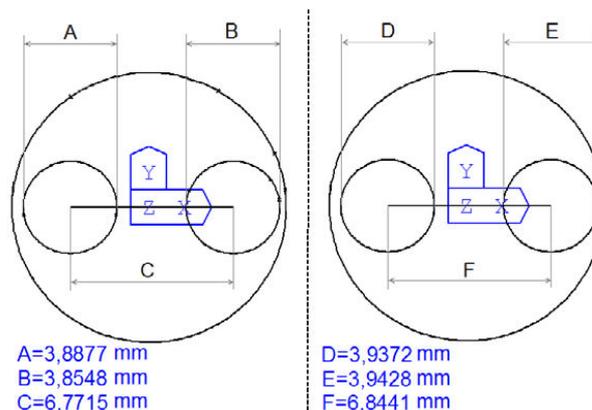


figura 2.12: dati ricavati dalla macchina di misura: il tappo (sinistra) e l'attrezzatura (destra).

Il porta-zampe

Per monitorare la qualità di fabbricazione dei porta-zampe sono state effettuate alcune misure sui dettagli presenti nel pezzo. La figura 2.13 mostra le dimensioni misurate e la tabella riassume i risultati ottenuti, ogni misura è stata ripetuta su sei porta zampe per avere una rilevanza statistica. Il foro per le spine (C) e la larghezza delle guide (A) risultano avere una buona precisione. La lunghezza delle guide (B) presenta una certa variabilità, ma questo non inficia il corretto funzionamento del meccanismo, in quanto la spina non raggiunge mai la parte finale della guida durante il funzionamento. Anche le dimensioni della sede per le zampe non costituiscono un elemento critico in quanto l'aggancio è garantito da un elemento elastico e deformabile presente sulle zampe.

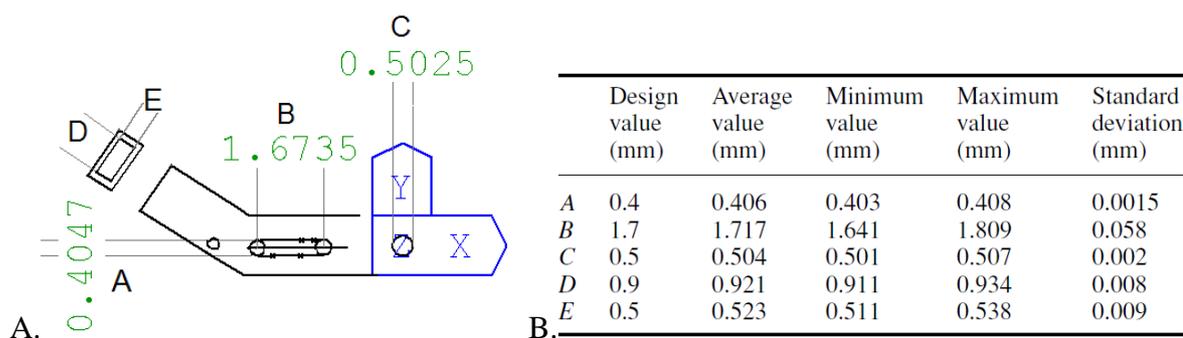


figura 2.13: Parametri misurati con il Video Check® e tabella riassuntiva dei risultati ottenuti.

La vite senza fine

Le misure si sono concentrate sulla punta della vite senza fine che è la zona che viene inserita nella ruota dentata. Le osservazioni a microscopio ottico (figura 2.14), effettuate su entrambe le viti, hanno rivelato un valore reale di φ di 0.452 mm, invece del valore di design di 0.450 mm, ma questo non crea problemi in quanto la punta deve essere inserita in una boccia di diametro interno 0.455 mm. Per quanto riguarda l il valore reale di 0.27 mm, invece di 0.28 mm, crea un certo gioco con il foro della ruota dentata (0.29 mm) che facilita la fase di assemblaggio e riduce il rischio di danneggiare la punta della vite durante l'inserimento.

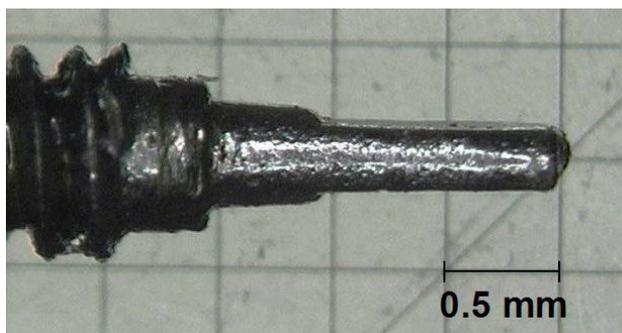


figura 2.14: Immagine della punta della vite senza fine ottenuta tramite microscopio ottico.

La ruota dentata

La precisione nella realizzazione della ruota dentata è stata verificata utilizzando lo strumento Video Check[®] già menzionato. I vari parametri sono stati misurati e confrontati con quelli nominali. Uno degli errori osservati è che il profilo della ruota non è perfettamente centrato con l’asse di rotazione, questo è dovuto probabilmente al passaggio dalla HSPC KERN alla *wire* EDM durante la fabbricazione del pezzo. Inoltre i denti sono leggermente più piccoli di quanto progettato, questo è legato ad un’erosione eccessiva dei pezzi durante l’uso della *wire* EDM, che può essere ridotta variando i parametri della macchina. Tuttavia, ai fini del funzionamento della catena cinematica, una ruota sottodimensionata è preferibile ad una sovradimensionata, in quanto i denti riescono comunque ad ingranare senza problemi. Il corretto movimento del sistema di ingranaggi dopo l’assemblaggio è un’ulteriore verifica della bontà del pezzo.

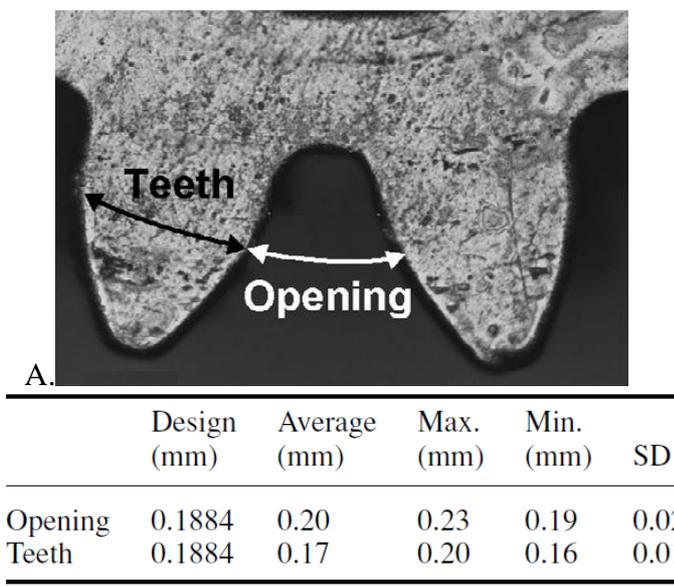


figura 2.15: A. Immagine del profilo del dente; B. tabella riassuntiva dei risultati ottenuti.

2.5 Progettazione ed analisi della zampa della capsula

Le zampe sono un componente essenziale del dispositivo. Esse costituiscono l’elemento di interfaccia tra la capsula e le pareti intestinali, quindi devono sia garantire la locomozione sia scongiurare possibili danni ai tessuti. Al fine di trovare il miglior compromesso tra questi obiettivi, la zampa deve soddisfare i seguenti requisiti:

- essere elastica e deformabile, ma allo stesso tempo abbastanza forte da superare la resistenza del tessuto;
- essere fabbricata in materiale biocompatibile;

- interagire con il tessuto senza provocare danni.

La sua progettazione è stata quindi curata molto più nel dettaglio rispetto agli altri pezzi [2.29]; in questo paragrafo sono descritti sia il design, che i test di verifica successivi.

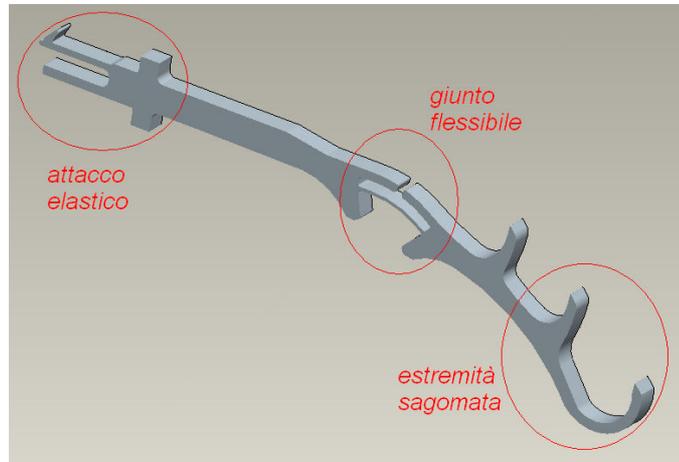


figura 2.16: Design della zampa.

Le punte delle zampe costituiscono l'elemento di contatto con le pareti intestinali e consentono la locomozione della capsula grazie all'attrito con le pareti. Al fine di adattare le zampe al diametro variabile del tratto gastro-intestinale e di scongiurare danni alle pareti, le zampe sono state fabbricate in Nitinol (NiTi), una lega a memoria di forma in nickel e titanio. Questo materiale è molto conosciuto per le sue proprietà di biocompatibilità ed è utilizzato in molte applicazioni in ambito ortopedico e cardiologico (ad esempio fili guida per cateteri, stent, clip chirurgiche, filtri per le vene e strumenti chirurgici) [2.30]. Quando appropriatamente trattato, il Nitinol esibisce proprietà superelastiche a temperatura sia ambiente sia corporea (se deformato fino a circa l'8÷10%, rimuovendo la causa della deformazione, ritorna nella configurazione precedente senza lasciare traccia delle deformazioni inelastiche). L'elasticità, combinata al design di giunti flessibili, permette di ottenere una zampa che allo stesso tempo sia "gentile" con il tessuto e fornisca forze normale e di attrito sufficienti per far muovere la capsula. La superelasticità è causata da un cambiamento di fase nella struttura cristallina del materiale, che passa da una fase austenitica (ordinata) ad una martensitica (meno ordinata) quando viene applicata una deformazione, in modo reversibile. Imponendo una forza (per esempio la zampa si flette per la resistenza delle pareti intestinali), mentre la deformazione aumenta, lo stress raggiunge un plateau e poi rimane costante; questo permette di ridurre le tensioni applicate sul tessuto e diminuisce i rischi di danni all'interfaccia biologica.

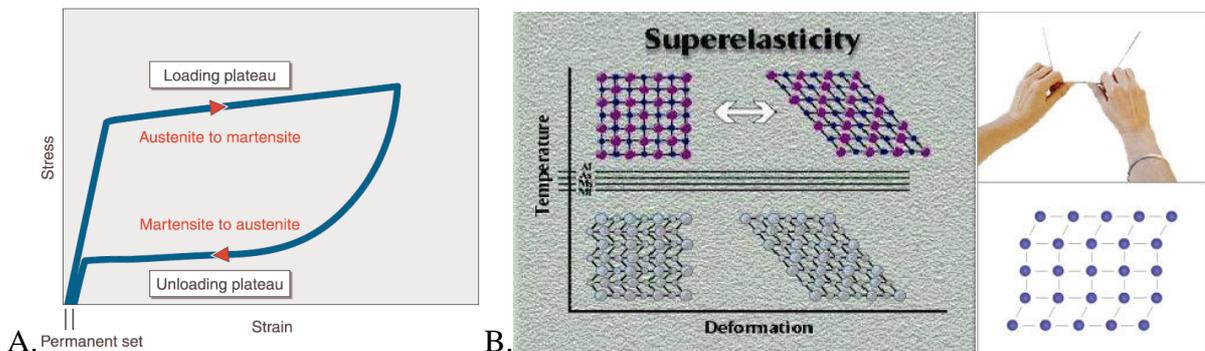


figura 2.17: A. Diagramma stress-strain che mostra il plateau di stress a seguito dell'aumento delle deformazione; B. schema del cambiamento di fase della struttura a seguito di una deformazione.

In figura 2.18 sono schematizzate le fasi successive di un passo della capsula. La zampa si piega in modo passivo grazie al giunto del ginocchio, una volta che la pressione esterna esercitata dal tessuto viene rimossa, la zampa torna nella sua configurazione di riposo (cioè dritta).

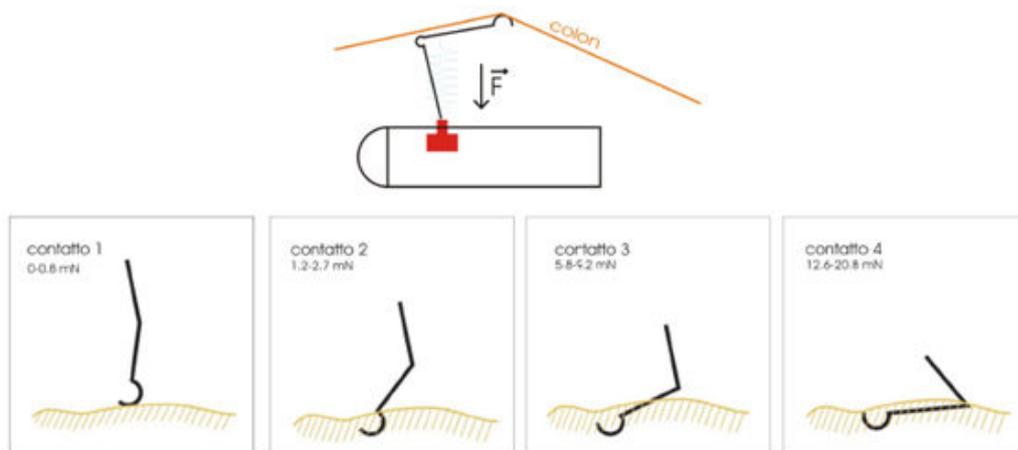
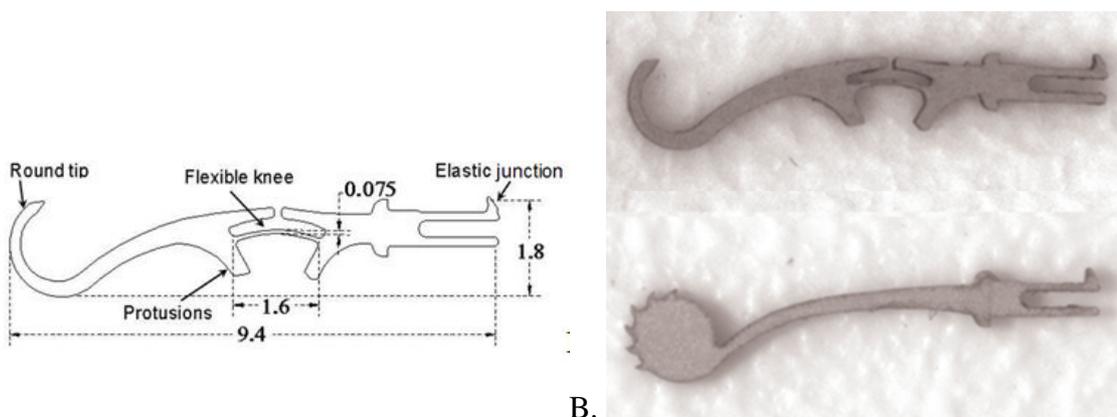


figura 2.18: Schema di momenti successivi durante un “passo” della capsula, la zampa si flette passivamente incontrando la resistenza delle pareti intestinali.

Il design e le dimensioni della zampa sono mostrate in figura 2.19A; la lunghezza è 9.4 mm e lo spessore 0.5 mm.



A. B. figura 2.19: A. Design della zampa (tutte le dimensioni sono in millimetri); B. due esempi di zampe realizzate.

La zampa è stata tagliata a partire da una lastra in Nitinol (*alloy S-superelasticstandard alloy, Memory-Metalle GmbH, Germany*) usando la *wire EDM*. Sono stati realizzati diversi design della zampa, due dei quali sono mostrati in figura 2.19B. In una delle opzioni la zampa comprende un “ginocchio” flessibile di spessore 0.075 mm che può flettersi fino ad un angolo di 75°, fornendo un grado di libertà passivo aggiuntivo. In una seconda forma la zampa comprende una punta ricoperta di micro-uncini (lunghi circa 100 μm) che aumentano l’attrito con le pareti intestinali (questo argomento verrà ripreso e approfondito nel capitolo 3).

Uno dei primi obiettivi nella fabbricazione della zampa è stato il design del ginocchio. La flessibilità della zampa è proporzionale alla terza potenza della larghezza, quindi piccole imprecisioni nella fabbricazione possono avere un effetto significativo sulla rigidità totale. Questo problema è stato risolto tagliando la zampa sulla EDM inizialmente con un primo taglio grezzo seguito poi da varie passate di rifinitura che permettono di ottenere le dimensioni desiderate in modo più accurato. Come tecnica alternativa è stato considerato anche il taglio laser, soprattutto per la sua alta velocità in confronto alla EDM. La qualità delle due diverse tecniche è stata valutata per scegliere quella più adatta alla realizzazione del

pezzo. Una prima valutazione qualitativa è stata effettuata osservando le due zampe con un microscopio ottico (figura 2.20), successivamente le due zampe sono state esaminate con un *focused ion beam (FIB) microscope* (la figura 2.21 mostra una sezione trasversale del ginocchio). Il ginocchio della zampa realizzata alla *wire EDM* ha una sezione rettangolare, come progettato, mentre quello della zampa tagliata con il laser presenta una sezione triangolare. Se consideriamo la zona del ginocchio come una trave sottoposta a flessione, applicando la teoria delle travi, la relazione tra il momento flettente applicato M e la curvatura della trave κ risulta:

$$\kappa = \frac{M}{EI}$$

dove E è il modulo elastico del materiale e I è l'inerzia della sezione trasversale della trave. Dato che le proprietà del materiale ed il momento applicato sono gli stessi, la trave a profilo triangolare ha una rigidità (data dal prodotto EI al denominatore) 1/3 inferiore a quella a profilo rettangolare. Una tale riduzione di rigidità rende il ginocchio troppo poco rigido e resistente per la nostra applicazione; è stato quindi scelto di utilizzare la tecnica dell'elettroerosione.

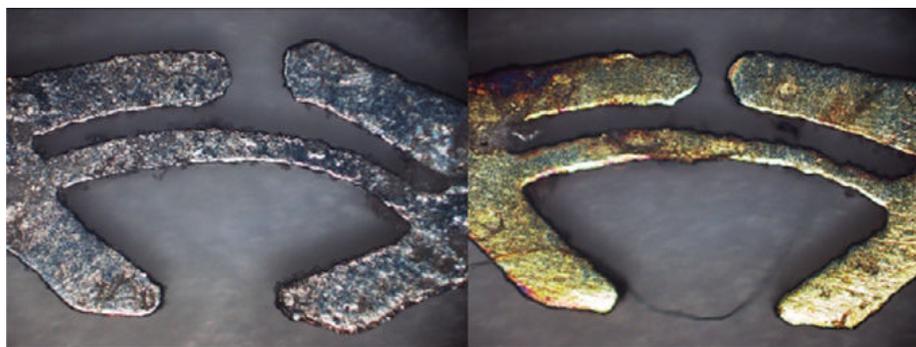


figura 2.20 : Particolare della zona del ginocchio di due zampe fabbricate con tecniche diverse: *wire EDM* (sinistra) e *laser cutting* (destra).

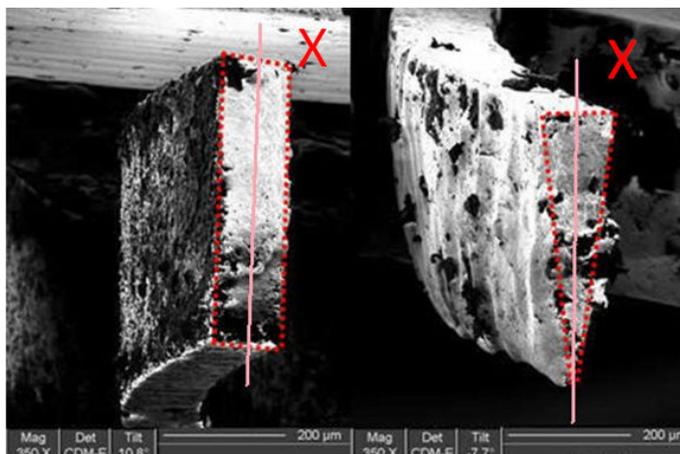


figura 2.21: Sezione trasversale del giunto flessibile di zampe fabbricate tramite *wire EDM* (sinistra) e *laser cutting* (destra).

Un problema riscontrato frequentemente durante le prove sperimentali è la rottura della gamba in corrispondenza del giunto. Questo inconveniente incide sulla capacità di movimento della capsula e può compromettere l'esito dell'esame in quanto il dispositivo non riesce ad eseguire correttamente le operazioni richieste. Inoltre, in caso di rottura, le zampe non riescono a far presa in modo uniforme sul tessuto, la locomozione viene rallentata e il tempo necessario per portare a termine l'esame aumenta notevolmente. È stato osservato che la rottura avviene dopo circa 35 cicli di apertura/chiusura della zampa, mentre per portare a

terminare l'ispezione dell'intero colon sono necessari circa 140 cicli, considerando una lunghezza media del colon di 140 cm e una distanza coperta ad ogni ciclo di circa 1 cm. Al fine di ridurre i rischi di rottura della zampa è stata condotta un'attenta analisi del design e una caratterizzazione meccanica del materiale. Ottenere dati quantitativi da prove sperimentali permette di creare un modello che simuli il comportamento della zampa in modo efficiente; attraverso delle prove a trazione sperimentali è stata ricavata la curva caratteristica *stress/strain* del materiale. Da questa curva sono stati estratti i parametri caratteristici del materiale, come il modulo elastico e le tensioni di transizione di fase. È possibile notare dal grafico ottenuto (figura 2.22) che i parametri caratteristici del materiale variano con l'aumentare del numero dei cicli, quindi una progettazione che tenga conto solo dei valori iniziali non può raggiungere dei risultati soddisfacenti.

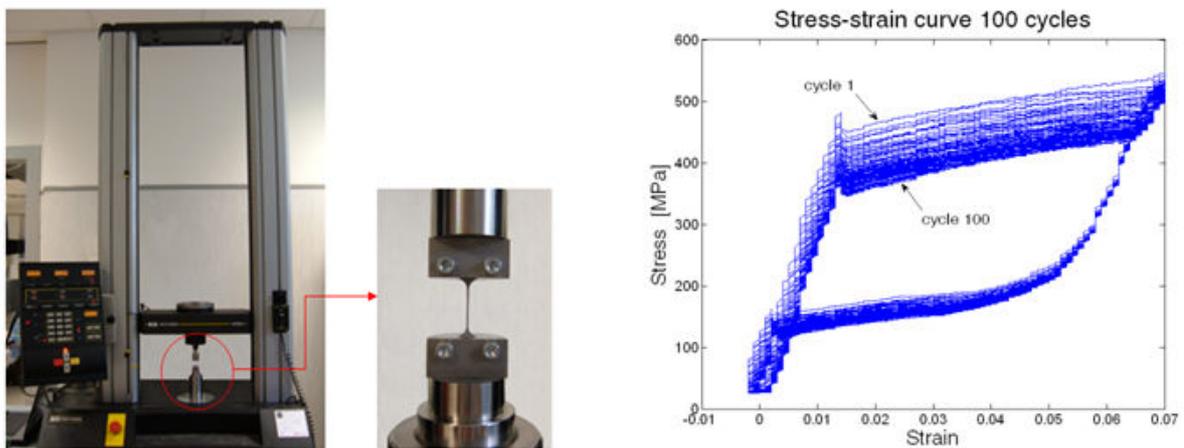


figura 2.22: Prove a trazione sperimentali dalle quale è stata ricavata la curva stress/strain del materiale.

I valori ricavati dai test sono stati utilizzati per creare un modello del giunto flessibile e simulare il suo comportamento con il software per l'analisi agli elementi finiti (FEM) ANSYS (figura 2.23). L'analisi numerica permette di simulare comportamenti non lineari (come quello delle leghe a memoria di forma) e geometrie complesse (come quella della zampa) dei quali non sarebbe altrimenti possibile conoscere lo stato interno di tensione e deformazione. In questo modo sono stati calcolati gli *stress* e gli *strain* agenti sul giunto.

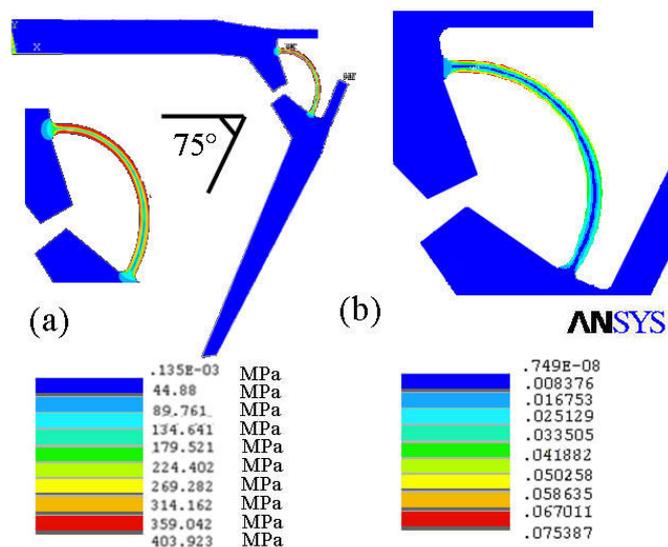


figura 2.23: Modello agli elementi finiti della zampa durante una simulazione in cui è applicata una certa deformazione. Le due immagini mostrano rispettivamente i valori di stress e di strain che si verificano nella zona del giunto flessibile del ginocchio.

La distribuzione degli stress è stata ottimizzata attraverso varie simulazioni nelle quali sono stati variati in maniera iterativa i parametri geometrici del giunto (ad esempio spessore e lunghezza). Grazie a questo processo di ottimizzazione è stata ottenuta una riduzione del 10% del valore di stress massimo (che è passato da 403 Mpa a 360 Mpa). Il nuovo prototipo di zampa così ottenuto ha dimostrato sperimentalmente di raggiungere un numero di circa 150 cicli prima di arrivare a rottura, garantendo quindi un'ispezione completa del colon.

2.6 Conclusioni

Questo capitolo ha presentato la fabbricazione di un robot grande nel complesso un centimetro, con molti componenti di dimensioni millimetriche o inferiori. Questo è un esempio dell'uso combinato di macchine di ultra-precisione, tipiche dell'ambito macro, adoperate con opportuni accorgimenti al fine di realizzare parti 3D complesse con dettagli micrometrici. La tabella in figura 2.24 riassume i diversi pezzi, le loro caratteristiche, le tecniche utilizzate, i vantaggi e/o svantaggi di ciascun metodo e gli errori misurati. È possibile notare che molte parti necessitano dell'uso combinato di più tecniche, in questo caso la difficoltà maggiore è quella di mantenere dei riferimenti affidabili durante il trasferimento tra le diverse macchine. I test di misura e il successivo assemblaggio dei vari componenti in un unico robot hanno dimostrato la qualità della fabbricazione.

Capsule part	Dimensional features	Manufacturing techniques	Advantages/disadvantages	Fabrication errors
Cap	$\Phi = 11.1$ mm; smallest features: several 150 μ m thick regions	Two HSCP KERN processes, one per side	–Particular care was required for part refixturing	28 μ m error in 6.8 mm inter-axis spacing
Body	$\Phi = 11.1$ mm; $l = 23.6$ mm; smallest features: 12 holes of 0.4 mm diameter around the external surface	Two HSCP KERN processes, one per side	–Particular care was required for part refixturing; –Drilling lateral holes on the external surface required a surface levelling procedure.	N/A—no features in the body required exceptionally high tolerances for overall device function
Leg	$l = 9.4$ mm; smallest features: 0.075 mm thick flexible knee. 0.1 mm hooks	Wire EDM	+ Rectangular profile; –Rougher surface than laser	N/A—legs functioned according to design objectives
Leg	$l = 9.4$ mm; smallest features: 0.075 mm wide flexible knee	Laser cutting	+ Faster than Wire EDM; –Triangular profile	Material erosion impaired correct knee shaping
Leg holder	$l = 7.38$ mm; smallest features: 0.4 mm wide pin guide	Wire EDM, Sink EDM; The Sink EDM electrode required HSPC KERN and Wire EDM	–3 Sink EDM electrodes are required to machine 1 leg-holder	8 μ m error in 0.4 mm pin guide width; 7 μ m error for the 0.5 mm hole
Lead screw	Relevant features: $\phi = 0.45$ mm; $l = 0.28$ mm	Wire EDM	+ Plastic deformation was avoided thanks to the selected fabrication process	2 μ m on ϕ ; 10 μ m on l
Gears	Addendum radius = 1.140 mm; module = 0.12 mm	HSPC KERN and Wire EDM	+ This procedure enabled completely customizable gear modules; –A purposely developed spreadsheet was required to input the Cartesian coordinates to the Wire EDM	41 μ m error for the 0.1884 mm half pitch

figura 2.24: Tabella riassuntiva delle caratteristiche dei vari componenti della capsula endoscopica realizzati.

La prova finale è comunque data dai test in cui il dispositivo è stato utilizzato per effettuare un'ispezione di un tratto di intestino porcino sia in ambiente *ex-vivo* che *in-vivo* [2.28] [2.31] (figura 2.25). La capsula endoscopica ha raggiunto una velocità di 50 mm min⁻¹ che può essere ritenuta accettabile per effettuare una colonscopia completa in tempi paragonabili a quelli di un esame tradizionale. La capsula ha inoltre dimostrato di poter “camminare” in ogni direzione e inclinazione, compresa quella verticale, contrastando la forza di gravità.

I risultati presentati in questo capitolo sulla fabbricazione e l'assemblaggio dei componenti della capsula illustrano i limiti e le opportunità legate ai componenti miniaturizzati. Inoltre, vengono mostrati una serie di esempi e soluzioni pratiche che, unite a quelli di numerosi altri studi nel settore, possono contribuire ad aumentare la conoscenza in questo intervallo dimensionale.

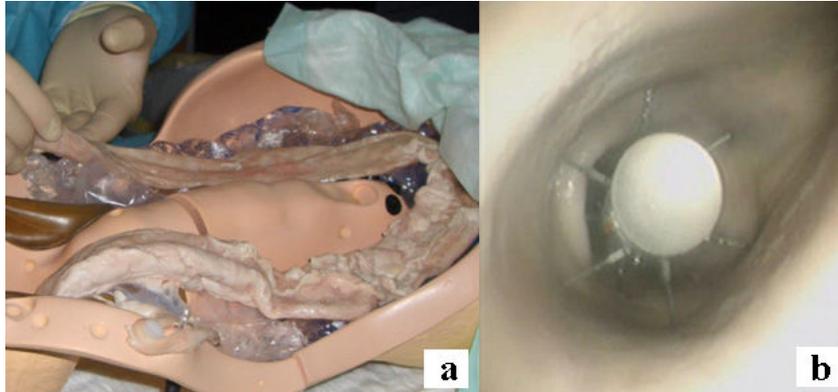


figura 2.25: La capsula in movimento durante i test *ex-vivo* su intestino porcino: immagine esterna del simulatore (a), immagine interna scattata tramite un endoscopio (b).

Bibliografia II

- [2.1] Receveur R A M, Lindemans F W and de Rooij N F 2007 Microsystem technologies for implantable applications *J. Micromech. Microeng.* **17** R50–80
- [2.2] Fujimasa I 1996 *Micromachines: A New Era in Mechanical Engineering* (New York: Oxford University Press)
- [2.3] Quaglia C, Buselli E, Webster R J III, Valdastri P, Menciassi A and Dario P 2009 An endoscopic capsule robot: meso-scale engineering case study *J. Micromech. Microeng.* **19** 105007
- [2.4] <http://www.givenimaging.com>
- [2.5] Neugut AI, Jacobson JS and Rella VA 1997 Prevalence and incidence of colorectal adenomas and cancer in asymptomatic persons *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* **7** 387-99
- [2.6] Trends in screening for colorectal cancer in United States, 1997 and 1999 MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report 2001 **50** 162-6
- [2.7] Iddan G, Meron G, Glukhovskiy A and Swain P 2000 Wireless capsule endoscopy *Nature* **405** 417
- [2.8] Waterman M and Eliakim R 2008 Capsule enteroscopy of the small intestine *Abdom. Imag.* **34** 452–8
- [2.9] Moglia A, Menciassi A, Dario P and Cuschieri A 2009 Capsule endoscopy: progress update and challenges ahead *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **6** 353-362
- [2.10] Park H, Park S, Yoon E, Kim B, Park J and Park S 2007 Paddling based microrobot for capsule endoscopes *IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation* pp 3377–82
- [2.11] Carpi F, Kastelein N, Talcott M and Pappone C 2011 Magnetically Controllable Gastrointestinal Steering of Video Capsules *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* **58** 231-234
- [2.12] Ciuti G, Valdastri P, Menciassi A and Dario P 2010 Robotic magnetic steering and locomotion of capsule endoscope for diagnostic and surgical endoluminal procedures,” *Robotica* **28** 199-207
- [2.13] Valdastri P, Quaglia C, Buselli E, Arezzo A, Di Lorenzo N, Morino M, Menciassi A and Dario P 2010 A Magnetic Internal Mechanism for Camera Steering in Wireless Endoluminal Applications *Endoscopy* **42** 481-486
- [2.14] Dario P, Ciarletta P, Menciassi A and Kim B 2004 Modeling and experimental validation of the locomotion of endoscopic robots in the colon *Int. J. Robot. Res.* **23** 549–56
- [2.15] Quirini M, Menciassi A, Scapellato S, Stefanini C and Dario P 2008 Design and fabrication of a motor legged capsule for the active exploration of the gastrointestinal tract *IEEE-ASME Trans. Mechatronics* **13** 169–79
- [2.16] Quirini M, Menciassi A, Scapellato S, Dario P, Rieber F, Ho C N, Schostek S and Schurr M O 2008 Feasibility proof of a legged locomotion capsule for the GI tract *Gastrointest. Endosc.* **67** 1153–8
- [2.17] Quirini M, Webster R J III, Menciassi A and Dario P 2007 Design of a pill-sized 12-legged endoscopic capsule robot *IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation* pp 1856–62
- [2.18] Suryaprakash M V 2004 *Precision Engineering* (Oxford: Alpha Science International)
- [2.19] Madou M J 2002 *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization* (Boca Raton, FL: CRC Press)
- [2.20] Cheng Y and Lai J 2008 Fabrication of meso-scale underwater vehicle components by rapid prototyping process *J. Mater. Process. Technol.* **201** 640–4
- [2.21] Cham J G, Bailey S A, Clark J E, Full R J and Cutkosky M R 2002 Fast and robust: hexapedal robots via shape deposition manufacturing *Int. J. Robot. Res.* **21** 869–82
- [2.22] Vogler M P, Liu X, Kapoor S G, DeVor R E and Ehmann K F 2002 Development of meso-scale machine tool (mMT) systems *Trans. NAMRI/SME* **30** 653–61

- [2.23] Kim Y T, Park S J and Lee S J 2005 Micro/meso-scale shapes machining by micro EDM process *Int. J. Precis. Eng. Manuf.* **6** 5–11
- [2.24] Chae J and Park S S 2007 High frequency bandwidth measurements of micro cutting forces *Int. J. Mach. Tools Manuf.* **47** 1433–41
- [2.25] Okazaki Y, Mishima N and Ashida K 2002 Microfactory and micro machine tools *1st Korea Japan Conf. Positioning Technol.* pp 150–5
- [2.26] Eisinberg A, Menciassi A, Dario P, Seyfried J, Estana R and Woern H 2006 Teleoperated assembly of a micro-lens system by means of a micro-manipulation workstation *Assem. Autom.* **27** 123–33
- [2.27] Chae J, Park S S and Freiheit T 2006 Investigation of micro-cutting operations *Int. J. Mach. Tools Manuf.* **46** 313-32
- [2.28] Valdastrì P, Webster R J III, Quaglia C, Quirini M, Menciassi A and Dario P 2009 A new mechanism for meso-scale legged locomotion in compliant tubular environments *IEEE Trans. on Robot.* **25** 1047-57
- [2.29] Buselli E, Valdastrì P, Quirini M, Menciassi A and Dario P 2009 Superelastic leg design optimization for an endoscopic capsule with active locomotion *Smart Mater. Struct.* **18** 015001
- [2.30] Morgan N B 2004 Medical shape memory alloy applications-the market and its product *Mater. Sci. Eng. A* **378** 16–23
- [2.31] Menciassi A, Valdastrì P, Harada K and Dario P 2008 Single and multiple robotic capsules for endoluminal diagnosis and surgery *IEEE/RAS-EMBS Int. Conf. on Biomedical Robotics and Biomechatronics* pp 238-43.

Capitolo 3

Sistemi di interfaccia con i tessuti – struttura superficiale

3.1 Introduzione

La scala mini è compresa tra la tradizionale scala macro e la microscala. In questo intervallo dimensionale il trattamento superficiale comincia a giocare un ruolo importante: la topologia della superficie esterna può influenzare il comportamento della struttura in quanto le forze superficiali non sono trascurabili come per sistemi macroscopici. Creare una microstruttura superficiale richiede l'utilizzo di tecniche di micro-fabbricazione, ma permette notevoli vantaggi perché sfrutta proprietà fisiche diverse da quelle tipiche del campo macroscopico. Questo caso di studio serve come esempio per descrivere le problematiche e le possibili soluzioni coinvolte nella corretta gestione delle forze di attrito e di adesione superficiale in dispositivi miniaturizzati che interferiscono con tessuti biologici.

In questo capitolo vengono descritte diverse tecniche adottate per favorire la corretta adesione tra le pareti intestinali e le zampe della capsula endoscopica, descritta dettagliatamente nel capitolo precedente. Lo scopo del lavoro è quello di realizzare una struttura superficiale che possa aumentare l'attrito e allo stesso tempo non danneggi i tessuti. Sono state proposte diverse tecniche tra cui l'utilizzo di microuncini metallici e lo sviluppo di membrane polimeriche micro-strutturate. Il presente capitolo descrive il design, la fabbricazione e le prove sperimentali di queste strutture, evidenziando come l'utilizzo di polimeri e di tecniche di micro fabbricazione riesca a produrre risultati irraggiungibili con l'utilizzo dei metalli [3.1].

Il capitolo è così organizzato: nel paragrafo 3.2 sono presentate l'applicazione ed una panoramica sulle soluzioni adottate in altri sistemi endoscopici; il paragrafo 3.3 presenta le tecniche, i materiali utilizzati e la realizzazione dei prototipi; il paragrafo 3.4 mostra le prove sperimentali effettuate sui campioni ed i risultati ottenuti. Infine le conclusioni sono esposte nel paragrafo 3.5.

3.2 Applicazione: la morfologia del tessuto intestinale e l'approccio a soluzioni bioispirate

Per i sistemi a locomozione attiva il tratto gastro-intestinale rappresenta un ambiente molto complesso. Il tessuto è, infatti, deformabile, viscoelastico ed estremamente cedevole, inoltre la sua morfologia varia da zona a zona. La superficie è resa scivolosa da uno strato di muco di circa 1 mm che ricopre la mucosa intestinale e che varia sia in spessore sia in viscosità lungo il canale digerente [3.2] (figura 3.1).

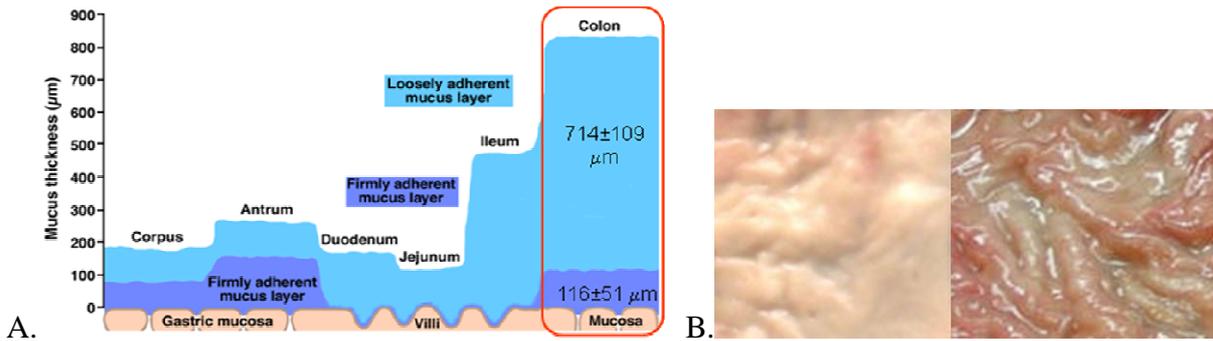


figura 3.1: A. Distribuzione dello strato di muco lungo il tratto gastro-intestinale [3.2]; B. foto scattate su due diversi tratti di intestino, è possibile notare la difformità sia nella struttura del tessuto che nella presenza di muco.

In questo tipo di ambiente le zampe scivolano sulle pareti intestinali, compromettendo il controllo della capsula e riducendone la velocità. Per questo motivo ricoprire la superficie esterna della zampa con strutture che possano favorire un aggancio efficace alle pareti è essenziale per migliorare le performance del dispositivo. Le strategie adottate in natura per assistere la locomozione si basano su una vasta gamma di meccanismi, come ventose, uncini o attrito (figura 3.2) [3.3]. In molti casi l'adesione è prodotta da particolari geometrie che aumentano l'interconnessione meccanica con il substrato. Diversi tipi di interfaccia possono essere adeguate per l'adesione: per esempio alcuni tipi di grillo presentano sulle zampe delle strutture flessibili capaci di adattarsi a diverse rugosità superficiali [3.4]; allo stesso tempo superfici non strutturate ricoperte di materiale adesivo possono essere adatte ad alcuni tipi di terreno, come accade per la locomozione dei serpenti. L'analisi delle forze di interazione e dell'efficacia di strutture biologiche mini e micro-metriche deputate all'adesione rappresenta uno dei maggiori indirizzi di ricerca interdisciplinare nella biologia animale [3.5] in quanto la biomeccanica e la biotribologia animale possono fornire spunti per la realizzazione di strutture artificiali innovative [3.6].

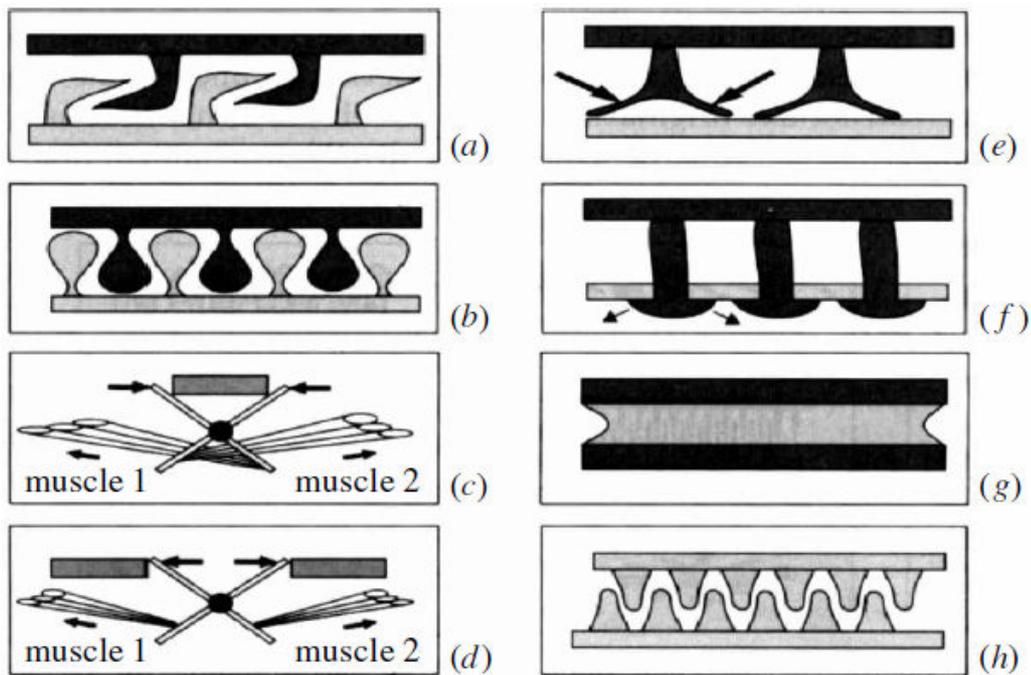


figura 3.2: Principali classi dei meccanismi di adesione: (a) uncini; (b) incastrici; (c) pinze; (d) spaziatori; (e) ventose; (f) ancoraggio ad espansione; (g) secrezioni adesive; (h) attrito [3.3].

Tornando al caso in esame, un possibile approccio è quello di equipaggiare la zampa con degli uncini che possano “arpionare” il tessuto. Questo tipo di soluzione, sviluppato e

descritto nei prossimi paragrafi, è molto efficace, ma allo stesso tempo è rischioso dal punto di vista medico, dato che gli uncini metallici, per quanto ben progettati, rappresentano una possibile fonte di danno per il tessuto; un'applicazione di questo tipo è stata utilizzata in [3.7]. Al fine di trovare una soluzione alternativa che garantisca l'assenza di danni al tessuto, la ricerca si è poi orientata verso l'utilizzo di superfici polimeriche. L'utilizzo di polimeri elastici e biocompatibili, modificati in modo da presentare una micro-struttura superficiale, permette sia di aumentare l'attrito sia di garantire la sicurezza per la mucosa.

Partendo dall'osservazione della natura, gli studiosi hanno notato che le zampe di molti animali (ad esempio ragnelle, cavallette e mosche) hanno una struttura superficiale caratterizzata da un design microscopico e che spesso viene secreto un fluido nell'area di contatto con il terreno [3.8] [3.9]. Mentre uno strato continuo di fluido agirebbe come lubrificante, la micro-struttura aumenta l'adesione grazie alla sua capacità di conformarsi alle superfici rugose [3.10] [3.11]. In questo contesto è stato dimostrato che l'utilizzo di *pillars* (piccole colonne o cilindri) di dimensioni micrometriche con opportuno *aspect ratio* (rapporto altezza/diametro) aumenta l'adesione in confronto a superfici lisce [3.12]. Negli ultimi anni diversi gruppi hanno sviluppato strutture sintetiche che mimano le strategie utilizzate dagli animali [3.13]. Tuttavia solo pochi studi si sono focalizzati sull'interazione con tessuti biologici molli in ambiente umido o coperto da muco. In campo endoscopico sono state presentate capsule con zone micro-strutturate per l'esofago e l'intestino tenue [3.14] [3.15]. Questi lavori mostrano come sia possibile aumentare l'attrito sul tessuto gastro-intestinale grazie a superfici ricoperte da *pillars* polimerici. Un altro studio interessante è stato condotto su un endoscopio ricoperto da film di materiale muco-adesivo, anche se questa soluzione è efficace solo per un'applicazione e quindi sono necessarie decine di film [3.16]. Per aumentare l'attrito è stato anche utilizzato un materiale bioceramico poroso, dimostrando che la forza d'attrito varia in funzione della dimensione dei pori del materiale [3.17]. Un altro lavoro presenta un'analisi dell'influenza della conformazione superficiale sull'attrito: campioni strutturati con forme diverse (triangoli, rettangoli e cilindri) sono stati testati su pezzi di tessuto intestinale, dimostrando che la forma superficiale influenza l'attrito con il tessuto [3.18].

Nel paragrafo 3.3 sono descritti inizialmente la fabbricazione degli uncini metallici e poi, più nel dettaglio, lo sviluppo di superfici polimeriche bio-ispirate. Nel paragrafo 3.4 saranno poi analizzati i risultati ottenuti dalle prove sperimentali sui vari prototipi.

3.3 Tecniche di fabbricazione

3.3.1 Realizzazione di microuncini metallici

L'obiettivo è quello di migliorare l'aggancio tra la zampa e il tessuto, in modo da impedire che la capsula scivoli e aumentandone quindi la velocità. La prima soluzione adottata è stata quella di inserire degli uncini in punta alle zampe. Dal punto di vista della fabbricazione, sulla punta della zampa vengono disegnati gli uncini già in fase di progettazione. La zampa, uncini compresi, viene poi tagliata alla macchina ad elettroerosione a filo (*wire EDM*). La figura 3.3 mostra i diversi tipi di punta realizzati: liscia, dotata di un unico grande uncino e dotata di alcuni micro-uncini. La soluzione con un unico uncino è pensata per arpionare il tessuto ed è disegnata con un'angolazione tale da favorire l'avanzamento della capsula: l'uncino favorisce il moto in avanti della capsula, mentre in direzione contraria scivola sul tessuto senza agganciarsi. L'ingrandimento della punta della zampa in figura 3.3D mostra alcuni degli uncini, di lunghezza circa 100 μm . Questa dimensione dovrebbe garantire un ancoraggio sicuro al tessuto, eliminando il rischio che gli uncini rimangano intrappolati nelle pieghe del tessuto, che hanno dimensioni maggiori. La forma degli uncini arrotondata su un lato garantisce l'unidirezionalità del moto, come nel caso precedente.

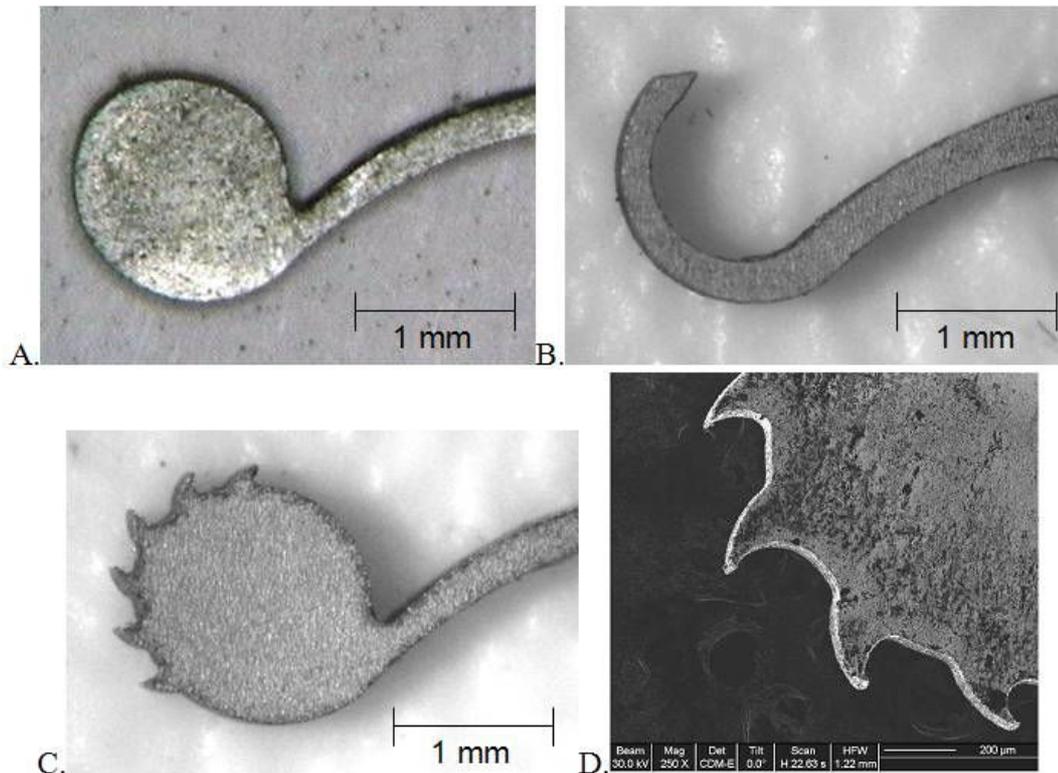


figura 3.3: A. Zampa liscia; B. zampa dotata di un unico grande uncino; C. zampa dotata di micro-uncini; D. immagine dei microuncini in punta alle zampe ottenuta tramite *Focus Ion Beam* (FIB).

3.3.2 La soft-lithography

Nella *soft-lithography*, il processo litografico standard è utilizzato come punto di partenza per la realizzazione di strutture non-rigide con risoluzioni micrometriche. Con un processo litografico è realizzato un *master* o stampo (che ha la forma negativa del prodotto finale), con risoluzione dell'ordine del micron o inferiore, dal quale ricavare una copia nel materiale più opportuno.

Di seguito vengono brevemente introdotte la litografia standard e le diverse varianti di soft-litografia [3.19]. Tendenzialmente si utilizzano wafer di silicio, sui quali vengono depositi dei materiali polimerici sensibili a diverse forme di energia, i più utilizzati sono i materiali fotosensibili (*photoresist*), cioè sensibili ai raggi UV. I *photoresist* si distinguono in positivi e negativi, in funzione della reazione innescata dai raggi: quando esposti ai raggi UV i *photoresist* positivi avviano una reazione di reticolazione, mentre quelli negativi modificano la chimica del polimero impedendone una reticolazione durante le fasi successive.

Di seguito vengono trattate le varie fasi del processo.

1. Trattamento chimico per lucidare la superficie del wafer di silicio (togliendo ogni possibile impurezza superficiale).
2. *Casting* di materiale fotosensibile a spessore controllato. Solitamente è usato uno *spin-coater* con velocità di rotazione nota; in base alla viscosità del materiale ed alla velocità di rotazione è possibile valutare lo spessore del materiale depositato.
3. *Soft Bake*, necessario per fissare il materiale sulla superficie del wafer di silicio.
4. Copertura con una maschera ad elevata risoluzione per la definizione delle regioni del wafer da esporre ai raggi UV. Per evitare che i raggi incidano con linee oblique sul materiale di *casting*, è opportuno che la maschera aderisca omogeneamente su tutta la superficie del wafer e che la distanza tra maschera e materiale depositato sia minima.
5. Esposizione alla luce UV tramite *mask-aligner* per impressionare il materiale nelle regioni esposte dalla maschera.
6. *Post Exposure Bake*, riscaldamento finale su piastra calda.

7. Sviluppo, il materiale depositato e non impressionato viene rimosso dal wafer di silicio. Pertanto durante i processi che utilizzano *photoresist* positivo sarà rimosso il materiale non impressionato, mentre per i *photoresist* negativi verrà rimosso il materiale impressionato.

8. Pulitura del wafer ottenuto.

Il prodotto ottenuto viene utilizzato come stampo, sul quale vengono colati materiali elastomerici per ottenere una replica della topologia in materiale non rigido e biocompatibile. La risoluzione delle strutture ottenute è funzione non soltanto delle dimensioni della maschera, ma anche dell'interazione tra materiale elastomerico e wafer di silicio e del metodo di esposizione dell'elastomero.

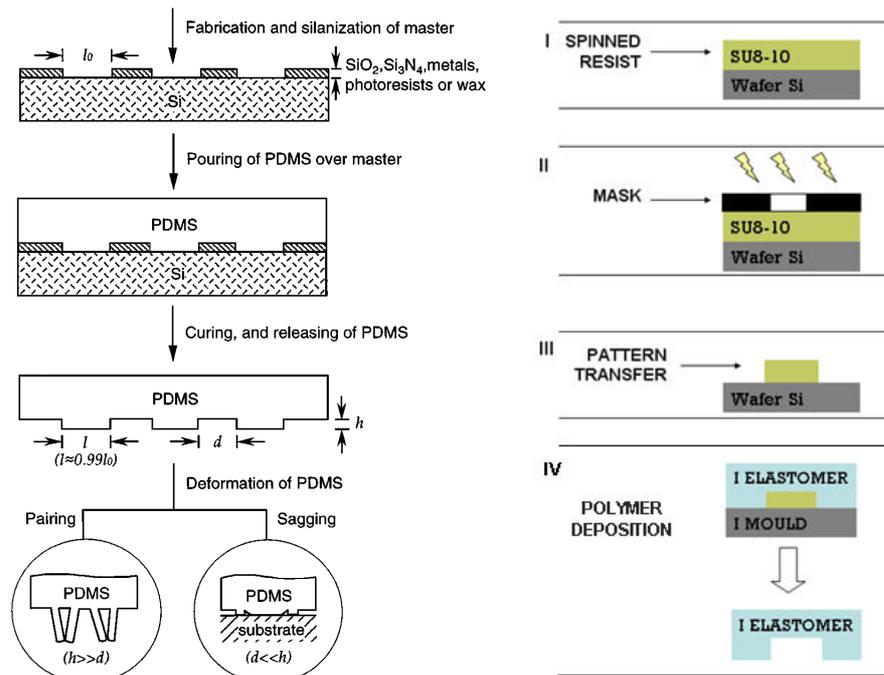


figura 3.4: Schema dei passi successivi nella realizzazione di una struttura polimerica tramite uno stampo litografico.

Esistono diverse tecniche di deposizione del materiale elastomerico sul master, e tutte hanno il fine di ottimizzare l'adesione superficiale [3.20].

- **Micro-Molding**, procedura standard di deposizione di materiale elastomerico sul master. È possibile realizzare la deposizione attraverso diverse tecniche:
 - **Casting**, tecnica più comunemente utilizzata. Il materiale elastomerico viene colato direttamente sul *master* (wafer di silicio), terminata la reazione di polimerizzazione è possibile separare il materiale elastomerico dal *master*, ottenendo una replica negativa esatta della topologia presente sul wafer di silicio.
 - **Spin-Coating**, tecnica che utilizza la forza centrifuga di rotazione dello stampo per favorire l'adesione del polimero. Attraverso questa realizzazione è possibile ottenere delle strutture con spessore variabile (da qualche millimetro a pochi micron), in funzione della velocità con cui è fatto ruotare lo stampo.
 - **Microfluidodinamica**, tecnica che utilizza un sistema ingresso-uscita per promuovere il riempimento dello stampo con il polimero attraverso lo stampo in silicio. Per realizzare questa tecnica occorre definire lo spessore della struttura da realizzare con una superficie liscia, creare un imbocco per la soluzione polimerica e porre sul lato opposto una pompa a vuoto in modo da orientare il moto del materiale elastomerico.
- **Micro-Replica Molding**, procedura utilizzata per ottenere dei negativi in materiale elastomerico a partire da master in materiale elastomerico. Nei primi tre passaggi è

analoga alla *Micro-Molding*, mentre l'ultima fase prevede una seconda deposizione di materiale elastomerico sul negativo ottenuto nel processo di *Micro-Molding*. Per consentire una corretta separazione dei due stampi in materiale elastomerico è necessario pretrattare il primo *molding* (negativo) per modificare temporaneamente la chimica superficiale del master (es. con plasma). In questo modo è possibile evitare una reticolazione del polimero depositato sull'interfaccia *master/mold*, facilitando la separazione dei due negativi per ottenere replica positiva in materiale non-rigido dello stampo prodotto con la tecnica litografica.

- *Micro-Contact Printing*, procedura che utilizza il materiale non rigido come timbro. Per la realizzazione del timbro è utilizzata la procedura della *Replica-Molding*. Il negativo in materiale elastomerico ottenuto è utilizzato come stampo, una volta passato nel liquido funzionalizzante (inchiostro) lo stampo viene posto sulla superficie da funzionalizzare (carta), ottenendo una topologia definita con caratteristiche chimiche superficiali desiderate (definite dal timbro).

Generalmente nella tecnica di *soft-lithography* sono utilizzati *photoresist* negativi, in quanto consentono la realizzazione di strutture micrometriche con spessori significativi (da pochi micron a qualche centinaio) e precisioni sub-micrometriche. Mentre il materiale elastomerico più frequentemente utilizzato è il polydimethylsiloxane (PDMS), un materiale biocompatibile, inerte, non-infiammabile, non-tossico, che mantiene la propria forma una volta finita la reazione di reticolazione. Presenta inoltre facilità di utilizzo, buona interazione con la superficie del master in silicio e rapida reazione di reticolazione. Ha un modulo elastico compreso tra 500 kPa e 3 MPa, una superficie idrofobica che può essere resa temporaneamente idrofila con opportuni trattamenti superficiali (per la modificazione dei gruppi silani esposti in superficie).

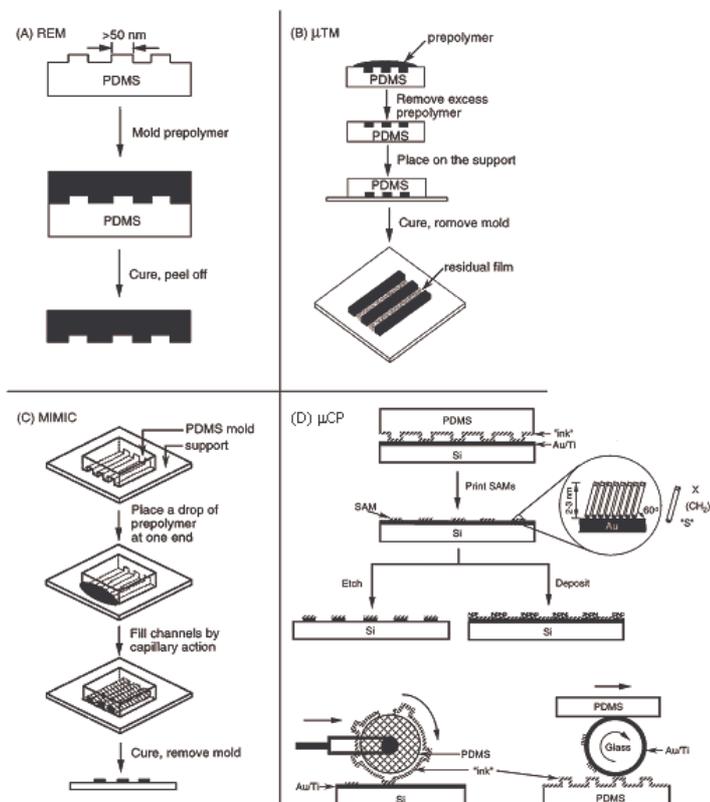


figura 3.5: Schema delle diverse tecniche di deposizione del polimero sullo stampo per la *soft-lithography*: (a) *replica molding* (REM), (b) *microtransfer molding* (μTM), (c) *micromolding in capillaries* (MIMIC) e (d) *micro-contact printing* (μCP) [3.20].

3.3.3 Realizzazione di superfici polimeriche micro-strutturate

Nella ricerca di una soluzione migliore rispetto ai micro-uncini, un secondo approccio è stato quello di fabbricare una membrana contenente una matrice di *pillars*, cioè di una serie di cilindretti polimerici fabbricati tramite la tecnica della *soft-lithography*. L'idea di base è quella di applicare queste superfici sulle punte delle zampe al posto dei micro-uncini metallici. Alla fine di tutta l'attività sarà scelta, tra le diverse geometrie ad uncini o a *pillars*, la soluzione ottimale come compromesso tra efficienza e sicurezza. Per quanto riguarda la superficie polimerica sono state sviluppate diverse geometrie con *pillars* che variano da 15 μm a 180 μm in diametro, con l'obiettivo di trovare la migliore configurazione per studiare il comportamento della forza d'attrito.

Per la realizzazione delle matrici di *pillars* sono stati scelti due materiali polimerici elastici e biocompatibili: il polydimethylsiloxane (PDMS, bicomponente, Sylgard 184, Dow Corning Inc.) e il perfluoropolyether (PFPE, bicomponente, 5112X, Solvay Solexis). Entrambi sono ampiamente utilizzati per la realizzazione di micro-strutture grazie alla loro elasticità ($E_{\text{PDMS}} \approx 0.5\text{--}3\text{MPa}$, $E_{\text{PFPE}} \approx 3\text{--}4\text{MPa}$) e alla facilità di lavorazione. Il primo polimero è ampiamente diffuso nell'ambito della microfluidica, il secondo è usato in applicazioni in cui sono richieste alta fedeltà di riproduzione e inerzia chimica [3.21]. I film polimerici sono stati realizzati tramite *soft-lithography*. Gli stampi sono stati ottenuti con il *photoresist* negativo SU-8 (SU-8 50, MicroChem Corp.), che è stato depositato tramite *spin-coating* su un wafer di silicio con uno spessore di 100 μm ; lo spessore di SU-8 determina l'altezza dei *pillars* che verranno realizzati. Sono state disegnate, tramite programmi CAD, delle maschere litografiche ad alta risoluzione che sono state utilizzate per trasferire il design desiderato sul wafer durante la fase di esposizione alla luce ultravioletta (UV). Gli stampi sono stati poi risciacquati nella soluzione di sviluppo per far affiorare il disegno ed esposti per alcuni minuti ai vapori di trimethylchlorosilane (TMCS), in modo da rendere più facile la separazione tra il polimero e lo stampo nelle fasi successive. Una replica positiva della matrice di *pillars* è stata ottenuta depositando il PDMS (preparato in un rapporto standard monomero/catalizzatore 10:1) sopra gli stampi con uno *spinner* a 500 rpm per 60 s per ottenere film spessi 100 μm . Portando la temperatura a 80°C il PDMS polimerizza e può essere rimosso dagli stampi; a questo punto la superficie ottenuta è ricoperta dalla matrice di *pillars*.

I campioni di PFPE sono stati preparati ad una concentrazione del 4% dei due componenti e depositati tramite *spin-coating* sugli stampi preparati in precedenza. Infine il polimero è stato fatto polimerizzare tramite luce UV.

Sono stati prodotti *pillars* con dimensioni variabili, tra i 15 μm e i 180 μm in diametro, con una distanza spigolo-spigolo del 75% rispetto al diametro. Il diametro massimo è stato fissato a 180 μm per avere almeno due file di *pillars* sul profilo della zampa (spessore 500 μm). L'altezza è stata fissata a 100 μm per tutti i campioni [3.15]. Una sintesi delle diverse geometrie è riportata nella tabella di figura 3.6.

Pillar diameter (μm)	Spacing (edge-to-edge) (μm)	Height (μm)
Flat surface	–	–
15	11.5	100
60	45	100
100	75	100
140	105	100
180	135	100

figura 3.6: Sintesi delle diverse geometrie dei *pillars* realizzate.

La forma finale del film è una membrana (di spessore 100 μm) con una zona centrale micro-strutturata di area 2.25 cm^2 (figura 3.7A). È inoltre opportuno notare che il rapporto

altezza/diametro e il rapporto diametro/spaziatura sono due parametri fondamentali. *Pillars* troppo “snelli” tendono infatti ad essere deboli, mentre la zona di membrana in mezzo a *pillars* troppo distanti tra loro tende a cedere (figura 3.7B)

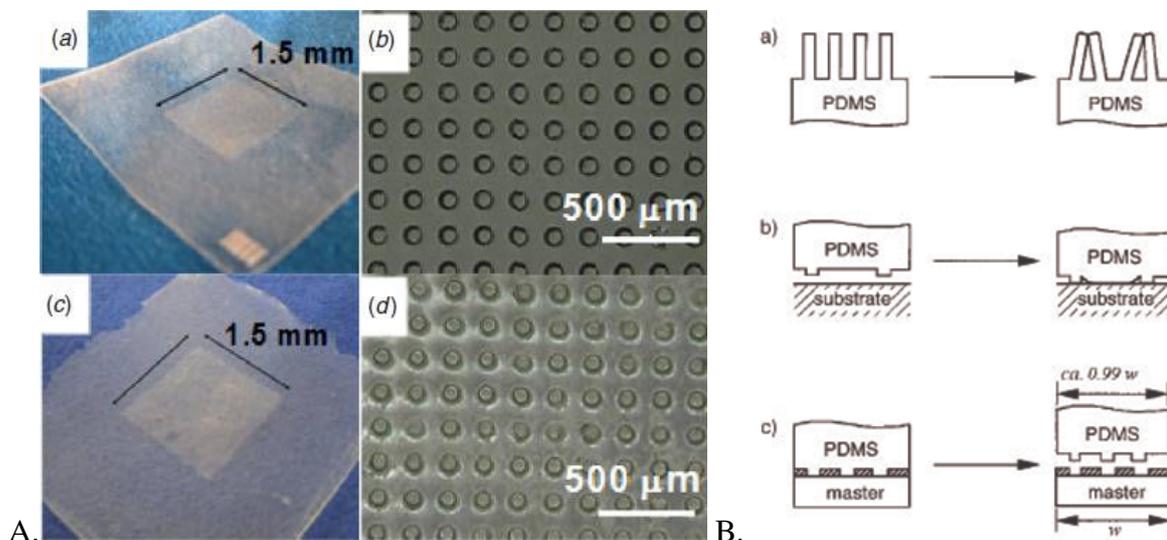


figura 3.7: A. Film polimerici micro-strutturati e ingrandimento ottenuto al microscopio ottico della matrice di *pillars* (diametro $100\ \mu\text{m}$) per il PDMS (a), (b), e il PFPE (c), (d). B. Possibili problemi connessi alla geometria dei *pillars*.

La topologia dei campioni è stata caratterizzata tramite un profilometro: l’altezza media dei *pillars* varia dello 0.65% rispetto al valore nominale. Attraverso un microscopio a forza atomica (AFM) è stato ricavato un valore quadratico medio della rugosità di 1.51 nm.

Alla fine della fase di caratterizzazione, i film sono stati attaccati sopra la punta della zampa, in modo da coprire la zona che entra in contatto con il tessuto intestinale durante il movimento della capsula endoscopica. Sono state utilizzate due tecniche, inizialmente è stato depositato SiO_2 tramite *sputtering* sulla zampa e successivamente il polimero è stato legato tramite *plasma cleaning*. Un altro metodo, rivelatosi più efficace, consiste nel depositare sul retro del film uno strato sottile di Titanio (circa 20 nm) in modo da facilitare l’incollaggio sulla zampa tramite colla a cianoacrilato.

La configurazione finale della zampa, ricoperta dalla membrana micro-strutturata, è mostrata in figura 3.8.

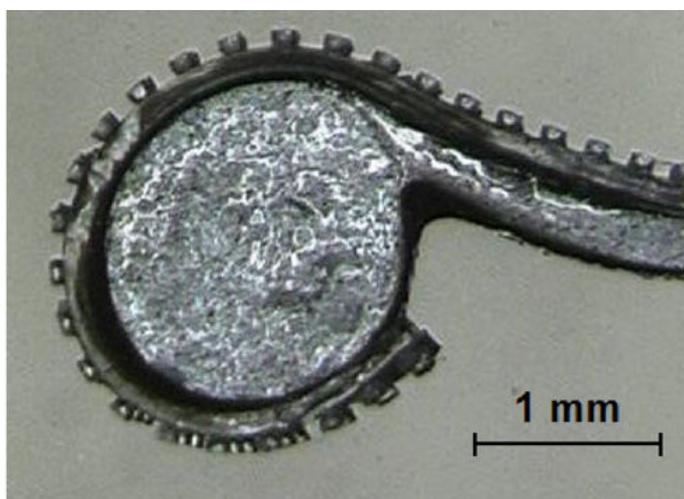


figura 3.8: La zampa ricoperta con il film polimerico micro-strutturato.

3.4 Test sperimentali e verifica dei risultati

3.4.1 Test delle zampe con microuncini metallici

La capsula endoscopica è stata testata in ambiente *ex-vivo* su un tratto di intestino porcino, in collaborazione con un'equipe medica che ne ha valutato l'efficacia e la sicurezza. I test sono stati ripetuti con le diverse geometrie della zampa e hanno rivelato come il loro design influisca sul comportamento complessivo del dispositivo. La zampa con punta liscia non è stata in grado di garantire una buona presa sul tessuto, questo ha influito sulla capacità di locomozione della capsula, che è scivolata sul tessuto e non è stata in grado di raggiungere la fine del percorso. La zampa con un unico uncino ha portato a terminare il *task* stabilito con un moto regolare e una velocità accettabile, anche se talvolta il tessuto è rimasto impigliato nell'uncino. La zampa con la serie di micro-uncini ha permesso alla capsula di avanzare alla velocità più alta registrata durante i test (5 cm/min) grazie ad un appiglio costante al tessuto, senza mai rimare intrappolata nelle pieghe dell'intestino e riuscendo anche a compiere efficacemente le curve. La ripetibilità dei risultati è stata verificata ripetendo varie sessioni di prova con tratti diversi di intestino. In figura 3.9 sono mostrati il set-up delle prove ed un'immagine ripresa da un endoscopio interno. Un'ispezione visiva successiva ai test ha rilevato la presenza sulla mucosa di piccole macchie rossastre nei punti dove gli uncini hanno fatto presa sul tessuto, tuttavia non si sono verificati sanguinamenti.

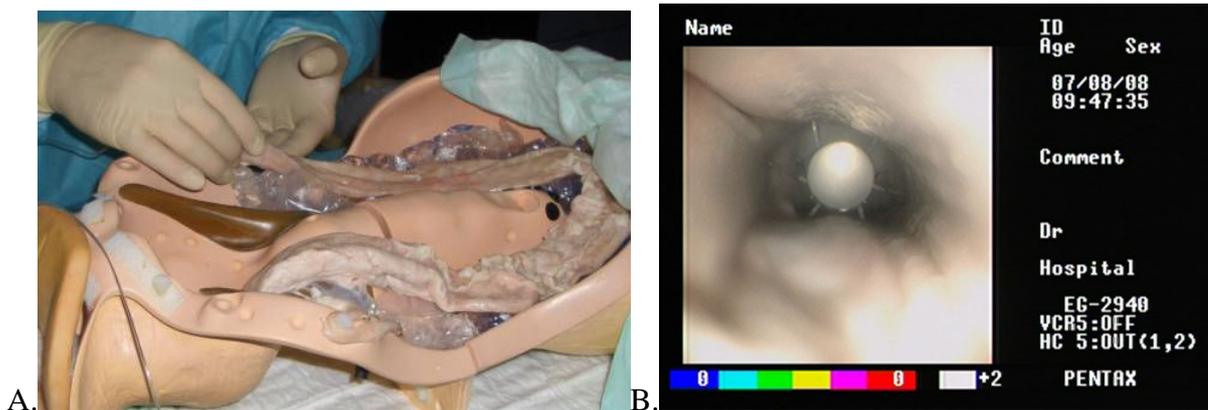


figura 3.9: Immagine dei test effettuati sulla capsula: A. simulatore esterno; B. immagine interna ripresa tramite endoscopio.

3.4.2 Test delle zampe con superfici polimeriche micro-strutturate

Al fine di valutare l'efficacia dei film polimerici realizzati, sono state effettuate delle prove sperimentali *in-vitro* su pezzi di tessuti porcino. Per riprodurre il più fedelmente possibile le condizioni *in-vivo*, l'intestino è stato lavato con soluzione fisiologica a temperatura ambiente, facendo attenzione a non eliminare lo strato di muco presente sulla mucosa, che gioca un ruolo importante sull'attrito. I test di adesione e di attrito sono presentati nel prossimo paragrafo: le prove sono state effettuate su entrambi i materiali (PDMS e PFPE) e ogni singola misura è stata ripetuta 8 volte su ogni campione sostituendo il tessuto usato come substrato. Dopo ogni esperimento è stata fatta un'ispezione visiva sul tessuto per verificare che la struttura non avesse recato danni all'interfaccia biologica.

Test di adesione

Per quanto riguarda i test di adesione, i film micro-strutturati sono stati attaccati su una piastra connessa ad una cella di carico a sei assi (Nano 17, ATI, risoluzione 1/1280 N); essa è montata su una slitta motorizzata (M-111.1DG, PI, Germany), che si muove ad una velocità di 0.7 mm s⁻¹. Il movimento della slitta e l'acquisizione dei dati dalla cella di carico vengono gestiti su PC tramite un'interfaccia Labview. Il tessuto è stato fissato alla base e il film

polimerico è stato mantenuto in contatto con il tessuto per 10 s a 10 mN prima dell'inizio dei singoli test, in modo da fornire un precarico costante. La figura 3.10 mostra un'immagine del set-up ed un esempio della tipica curva che si ottiene da questo tipo di prove; nel grafico il picco massimo rappresenta la forza di distacco.

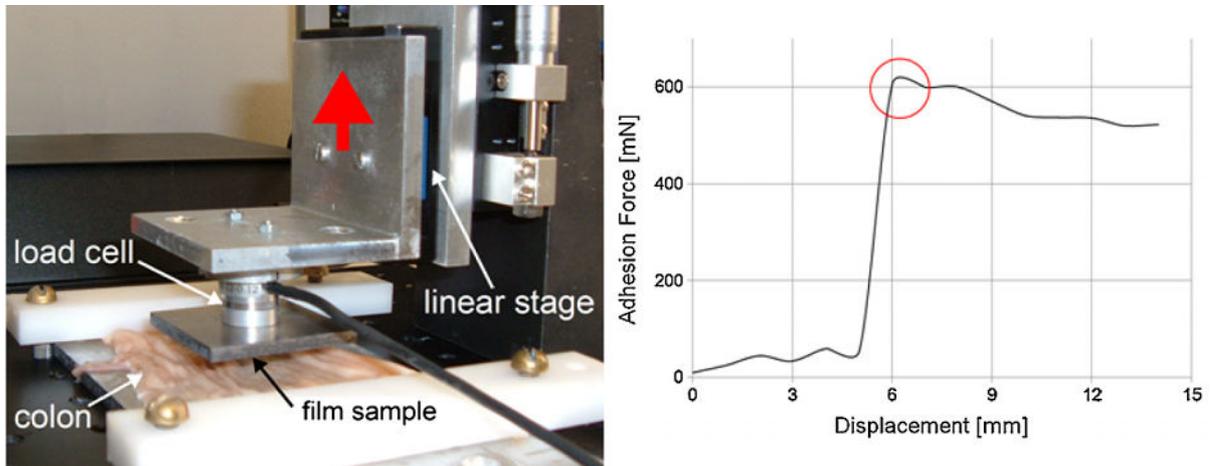


figura 3.10: Prove di adesione e tipica curva della forza di adesione in funzione dello spostamento.

I dati ricavati permettono di derivare la relazione sperimentale tra la forza di adesione e il diametro dei *pillars* per entrambi i materiali (figura 3.11A). I due materiali mostrano un andamento simile. Il campione liscio presenta una adesione abbastanza elevata dovuta alla maggiore area di contatto con il tessuto. Per quanto riguarda gli altri substrati, sotto la pressione applicata il tessuto molle si conforma alla superficie micro-strutturata [3.22]; questa indentazione, sebbene difficile da misurare, è proporzionale alla pressione agente sul campione, calcolabile dividendo la forza normale per la somma delle superfici superiori dei *pillars* (figura 3.11B). La pressione mostra un andamento simile a quello della curva della forza di adesione; questa analogia evidenzia la dipendenza dei due parametri. Inoltre è possibile notare che più alta è la pressione, più elevata è l'indentazione nel tessuto e, come conseguenza, si nota un aumento della forza di adesione. Alla fine delle prove sperimentali non è stato rilevato nessun danno visibile al tessuto.

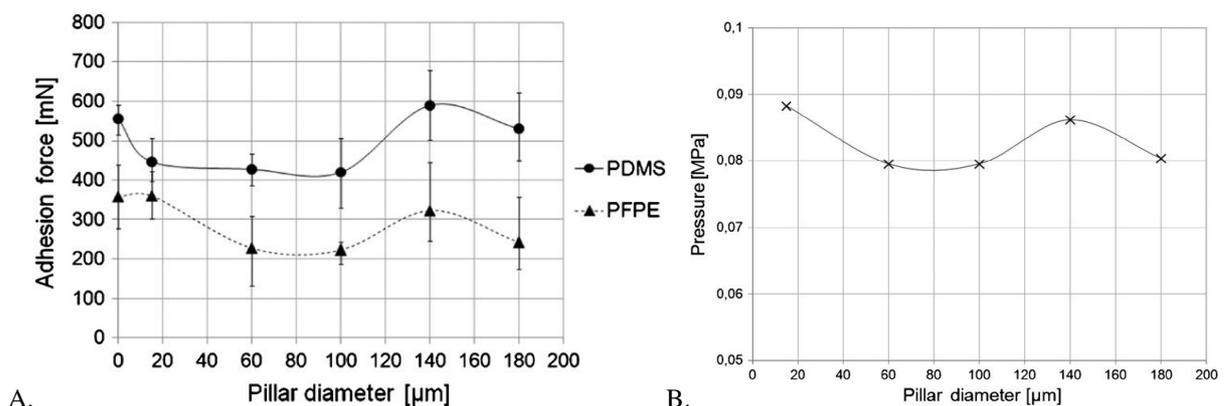


figura 3.11: A. Grafico della forza di adesione in funzione del diametro dei *pillars*; B. grafico della pressione applicata in funzione del diametro dei *pillars*.

Test di attrito

Ci si aspetta di trovare le linee guida più significative dai test di attrito, visto che la zampa striscia sul tessuto durante il movimento della capsula. Il film polimerico è stato attaccato sotto la base di un cestello che viene fatto strisciare sul tessuto fissato alla base. Il contenitore ospita dei pesi e ha una base con spigoli arrotondati per evitare l'intensificazione degli sforzi

sul tessuto lungo i bordi. Il cestello è collegato, tramite un sottile filo in nylon, ad una cella di carico fissata a sua volta ad una slitta motorizzata (M-410.CG, PI, Germany) che fa scorrere la capsula a velocità controllata lungo il suo asse longitudinale, in modo da riprodurre le condizioni *in-vivo*. Il peso applicato è stato variato tra 0.1 N e 1 N, questo intervallo comprende anche il valore di forza medio esercitato dalla zampa sulle pareti intestinali che è circa 0.6 N [3.23]. Alla slitta è stata imposta una velocità di 0.35 mm s^{-1} che è all'incirca la velocità media della peristalsi (variabile tra 0.16 e 0.5 mm s^{-1} [3.24]). Sono stati comunque effettuati altri test variando la velocità tra 0.2 e 0.7 mm s^{-1} , ma queste prove non hanno mostrato cambiamenti significativi nell'andamento delle forze d'attrito. La figura 3.12 mostra il banco di prova dei test e una tipica curva ricavata da queste prove; nel grafico il picco massimo rappresenta la forza di attrito statico.

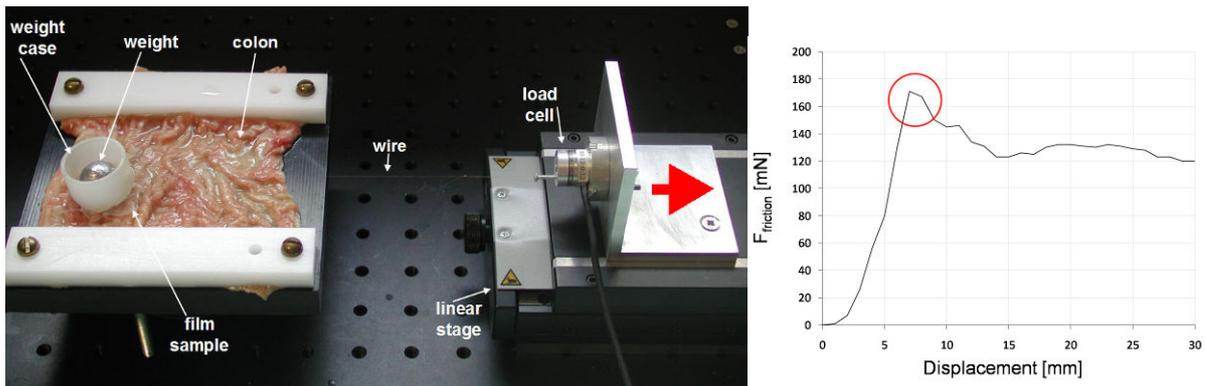


figura 3.12: Prove di attrito e tipica curva della forza di attrito in funzione dello spostamento.

Dai dati ottenuti è stato inoltre ricavato l'andamento della forza di attrito statico in funzione della forza applicata; il grafico per i campioni in PDMS è mostrato in figura 3.13, un grafico analogo è stato ricavato anche per i campioni in PFPE. È possibile notare che la forza di attrito statico aumenta con la forza applicata, come previsto dalla legge di Coulomb ($F = \mu \cdot N$), dove N è la forza normale e μ è il coefficiente di attrito statico, che viene ricavato graficamente dalla pendenza del *fitting* lineare dei dati. Prolungando la curva in condizioni di carico zero, essa non passa attraverso l'origine, come predetto dalla legge; quindi l'espressione per la forza di attrito totale può essere così modificata:

$$F_{\text{Tot}} = \mu \cdot N + F_v,$$

dove $\mu \cdot N$ (attrito di Coulomb) è proporzionale al carico normale e la costante F_v rappresenta il contributo della forza di visco-adesione. Essa dipende dalle proprietà fisico-chimiche del tessuto e del muco e contribuisce alla forza totale per un valore compreso tra 27 e 47 mN.

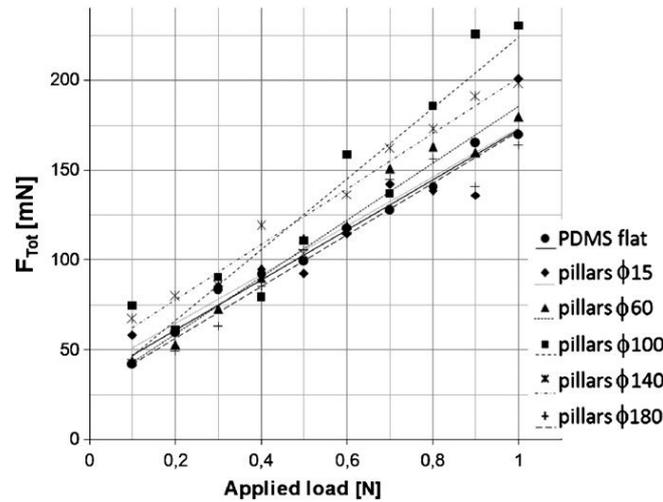


figura 3.13: Grafico della forza di attrito statico in funzione del carico applicato.

Per entrambi i materiali sono stati ricavati l'andamento della forza di attrito e del coefficiente di attrito in funzione del diametro dei *pillars* (figura 3.14).

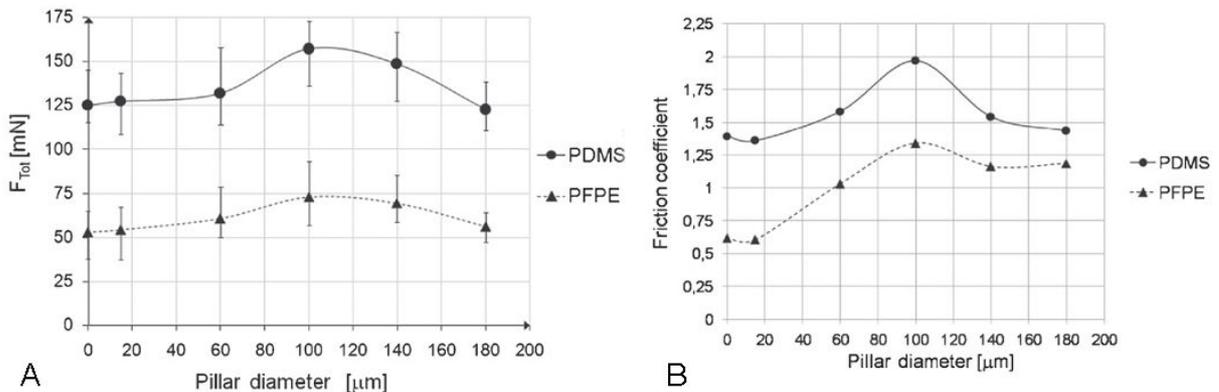


figura 3.14: Grafico della forza di attrito (A) e del coefficiente di attrito (B) in funzione del diametro dei *pillars*. La forza di attrito è stata calcolata per una forza normale di 0.6 N che è quella esercitata dalla zampa sul tessuto.

È possibile osservare come la presenza della matrice micro-strutturata aumenti l'attrito rispetto alla superficie liscia, in entrambi i materiali. Il basso attrito registrato per il campione liscio può essere associato con la presenza del muco, che forma uno strato continuo di fluido che agisce da lubrificante. Al contrario, le scanalature presenti nei campioni micro-strutturati permettono al muco di riempire gli spazi vuoti tra i *pillars*; in questo modo viene favorito un contatto diretto tra la superficie superiore dei *pillars* ed il tessuto ed è evitato il fenomeno dell'*hydroplaning* [3.25]. Il coefficiente d'attrito massimo ($\mu=1.97$) è stato registrato per i campioni con *pillars* di diametro 100 μm . Questo corrisponde ad un *aspect ratio* di:

$$\alpha = h/d \approx 1,$$

dove h è l'altezza e d il diametro dei *pillars*. Quindi α può essere usato come un parametro empirico che evidenzia la capacità della superficie micro-strutturata di aumentare l'attrito con il tessuto. Il fatto che quello intestinale sia un tessuto molle ($E_{tessuto} \approx 1-2$ Kpa) implica che esso si adatti alla forma della più rigida matrice polimerica [3.22]. I *pillars* con un *aspect ratio* $\alpha \approx 1$ rappresentano una sorta di compromesso tra il bisogno di massimizzare sia l'ampiezza delle scanalature sia il numero di discontinuità, e quindi il numero di *pillars*, nell'unità di superficie. Infatti, mentre i campioni a basso *aspect ratio* ($\alpha < 1$) presentano poche discontinuità (considerando la stessa area), quelli ad alto *aspect ratio* ($\alpha > 1$) hanno scanalature

molto strette; inoltre essi si flettono sotto alti carichi essendo fabbricati con polimeri elastomerici dalle basse proprietà meccaniche. Alle fine delle prove di attrito il tessuto non ha mostrato nessun tipo di danno.

Test sulla morfologia del tessuto

È stato condotto un secondo test di attrito per investigare la relazione tra la morfologia del tessuto e la micro-struttura della matrice. La topologia superficiale del colon è caratterizzata da pieghe e rugosità di dimensioni millimetriche dovute sia alla struttura interna del tessuto sia alla forma esterna dell'intestino. Il profilo medio della morfologia del tessuto, δ , è stato misurato grazie ad un sensore laser (optoNCDT 1401, Micro-Epsilon, Germany) ed è stato definito come la massima altezza picco-picco (figura 3.15A)

$$\delta = h_{\max} - h_{\min}$$

Queste prove sperimentali sono state condotte sui campioni con *pillars* da 100 μm , che hanno dimostrato di produrre l'attrito più alto nei test precedenti. Il banco di prova utilizzato è lo stesso dei primi test di attrito. Il campione è stato fatto scorrere su due diversi tratti di intestino porcino caratterizzati da diverse morfologie ($\delta = 1.181 \text{ mm}$, $\delta = 0.717 \text{ mm}$) che corrispondono alla zona iniziale e finale del colon (figura 3.15A). Come elemento di confronto le prove sono state ripetute anche su un vetrino ($\delta \approx 0$) ricoperto da uno strato di muco. In generale, l'attrito raggiunge un massimo quando le due superfici che scorrono l'una sull'altra presentano una rugosità simile. L'intestino è caratterizzato da valori di δ che sono molto più alti di quelli dei *pillars* ($0.7 < \delta < 1.8 \text{ mm}$ contro $h = 0.1 \text{ mm}$). D'altra parte, se consideriamo la rugosità microscopica del tessuto, essa è significativamente inferiore (intorno alle centinaia di nanometri) rispetto a quella della superficie micro-strutturata. Considerando tutti questi fattori, non è banale definire una relazione specifica tra la morfologia del tessuto, la dimensione dei *pillars* e il comportamento dell'attrito.

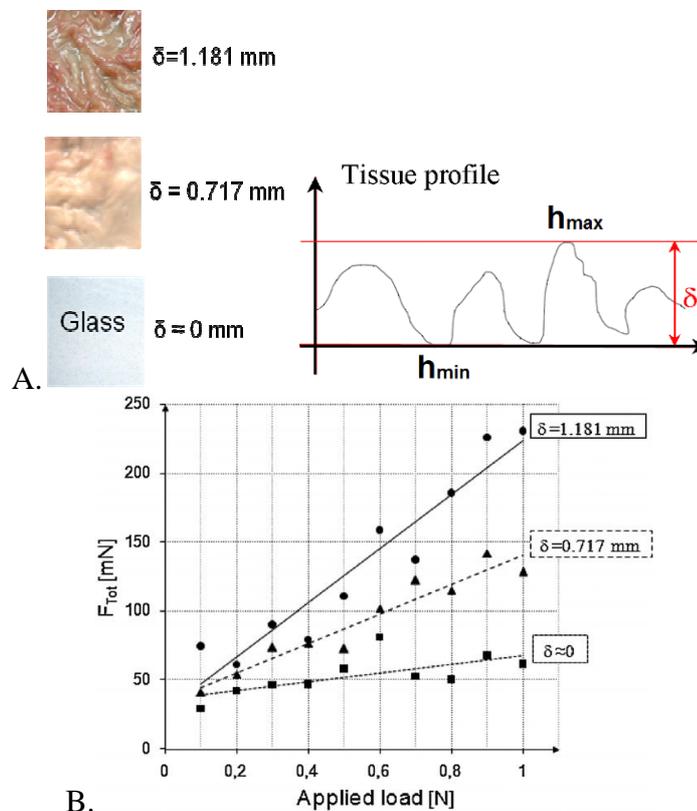


figura 3.15: A. Campioni dei diversi tipi di tessuto utilizzati e grafico che mostra come viene calcolato il δ dal valore picco-picco ottenuto dal sensore laser; B. grafico della forza di attrito in funzione della morfologia del tessuto.

I risultati delle prove mostrano che la forza di attrito massima è stata raggiunta per i valori di δ più alti (figura 3.15B). L'elemento più significativo non è tanto il valore numerico ottenuto, quanto la forte dipendenza dell'attrito dalla morfologia superficiale del tessuto. La variabilità fisiologica del tratto gastro-intestinale implica che l'efficacia della superficie micro-strutturata in caso di applicazioni su paziente dipende molto dal tratto di intestino che deve essere esaminato. Sfortunatamente non è possibile conoscere in anticipo l'esatta morfologia dell'intestino di ogni singolo paziente, tuttavia ogni tratto intestinale presenta una rugosità media che può essere prevista ed in base alla quale possono essere scelte le membrane più adatte.

3.5 Conclusioni

Questo capitolo ha presentato lo studio dell'interfaccia tra un dispositivo artificiale e un tessuto biologico, con particolare attenzione all'analisi dei fenomeni di attrito e di adesione. Sono state realizzate delle strutture di dimensioni variabili dalle decine alle centinaia di micrometri utilizzando sia macchine a controllo numerico per le strutture metalliche sia metodi fotolitografici per le membrane polimeriche.

Sono stati realizzati e testati film di polimero elastico micro-strutturati con matrici di *pillars*. Prove *in-vitro* hanno dimostrato come la micro-struttura influenzi l'interazione con il tessuto. In particolare l'attrito aumenta con l'*aspect ratio* dei *pillars*. La micro-struttura permette al tessuto molle di adattarsi alla superficie polimerica creando un'interconnessione meccanica tra le due interfacce; inoltre il muco ha la possibilità di fluire attraverso gli spazi vuoti tra i *pillars* minimizzando le sue proprietà di lubrificante. Un controllo visivo effettuato su tutti i tratti di tessuto utilizzati non ha rivelato ferite nella mucosa intestinale. Questo conferma che la struttura realizzata è sicura e compatibile con l'applicazione in ambito medico.

Questo caso di studio evidenzia come l'uso di metodiche di micro-fabbricazione, la scelta dei materiali e lo studio delle proprietà superficiali sia fondamentale per lo sviluppo di nuovi sistemi che possano migliorare le performance dei dispositivi esistenti. In questo caso, ricoprire la zampa della capsula con una membrana micro-strutturata ha permesso di mantenere alti valori di attrito senza rinunciare alla sicurezza per i tessuti biologici.

Bibliografia III

- [3.1] Buselli E, Pensabene V, Castrataro P, Valdastri P, Menciassi A and Dario P 2010 Evaluation of friction enhancement through soft polymer micro-patterns in active capsule endoscopy *Meas. Sci. Technol.* **21** 105802
- [3.2] Atuma C, Strugala V, Allen A and Holm L 2001 The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280** G922–29
- [3.3] Scherge M and Gorb S 2001 *Biological micro- and nanotribology: nature's solutions* Springer.
- [3.4] Scherge M and Gorb S 2000 Using biological principles to design MEMS *J. Micromech. Microeng.* **10** 359-364
- [3.5] Dickinson M H, Farley C T, Full R J, Koehl M A, Kram R and Lehman S 2000 How animals move: an integrative view *Science* **288** 100-106.
- [3.6] Menciassi A and Dario P 2003 Bio-inspired solutions for locomotion in the gastrointestinal tract: background and perspectives *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* **361** 2287-2298
- [3.7] La Spina G, Stefanini C, Menciassi A and Dario P 2005 A novel technological process for fabricating micro-tips for biomimetic adhesion *J. Micromech. Microeng.* **15** 1576–87
- [3.8] Scherge M and Gorb S N 2001 *Biological Micro- and Nanotribology: Nature's Solutions* (Berlin: Springer)
- [3.9] Federle W, Barnes W J P, Baumgartner W, Drechsler P and Smith J M 2006 Wet but not slippery: boundary friction in tree frog adhesive toe pads *J. R. Soc. Interface* **3** 689–97
- [3.10] Hui C Y, Glassmaker N J, Tang T and Jagota A 2004 Design of biomimetic fibrillar interfaces: 2 mechanics of enhanced adhesion *J. R. Soc. Interface* **1** 35–48
- [3.11] Chung J Y and Chaudhury M K 2005 Roles of discontinuities in bio-inspired adhesive pads *J. R. Soc. Interface* **2** 55–61
- [3.12] Crosby A J, Hageman M and Duncan A 2005 Controlling polymer adhesion with “pancakes” *Langmuir* **21** 11738–43
- [3.13] Gorb S N, Sinha M, Peressadko A, Daltorio K A and Quinn R D 2007 Insects did it first: a micropatterned adhesive tape for robotic applications *Bionsp. Biomim.* **2** S117–25
- [3.14] Glass P, Cheung E, Wang H, Appasamy R and Sitti M 2008 A motorized anchoring mechanism for a tethered capsule robot using fibrillar adhesives for interventions in the esophagus *Proc. 2nd IEEE/RAS BIOROB* (Scottsdale) pp 19–22
- [3.15] Kwon J, Cheung E, Park S and Sitti M 2006 Friction enhancement via micro-patterned wet elastomer adhesives on small intestinal surfaces *Biomed. Mater.* **1** 216–20
- [3.16] Dodou D, del Campo A and Artz E 2007 Mucoadhesive micropatterns for enhanced grip *Proc 29th IEEE EMBS* (Lyon) pp 1457–62
- [3.17] Wang X, Han Y, Jiang X, Dai H and Li S 2006 Static friction of porous bioceramic â-TCP on intestinal mucus film *Biomed. Mater.* **1** 124–6
- [3.18] Wang K D and Yan G Z 2009 Research on measurement and modelling of the gastro intestine's frictional characteristics *Meas. Sci. Technol.* **20** 015803
- [3.19] Madou M J 2001 *Fundamentals of Microfabrication* (CRC Press LLC)
- [3.20] Xia Y and Whitesides G M 1998 Soft Lithography *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28** 153–84
- [3.21] Rolland J P, Van Dam R M, Schorzman D A, Quake S Q and De Simone J M 2004 Solvent-resistant photocurable “liquid Teflon” for microfluidic device fabrication *J. Am. Chem. Soc.* **126** 2322–3
- [3.22] Mahdavi A et al 2008 A biodegradable and biocompatible gecko-inspired tissue adhesive *Proc. Natl Acad. Sci.* **105** 2307–12

- [3.23] Valdastri P, Webster R J III, Quaglia C, Quirini M, Menciassi A and Dario P 2009 A new mechanism for meso-scale legged locomotion in compliant tubular environments *IEEE Trans. Robot* **25** 1047–57
- [3.24] Martini F H 1995 *Fundamentals of Anatomy & Physiology* (Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall)
- [3.25] Varenberg M and Gorb S N 2009 Hexagonal surface micropattern for dry and wet friction *Adv. Mater.* **21** 483–6

Capitolo 4

Sistemi di interfaccia con le cellule

4.1 Introduzione

La scala microscopica comprende sistemi di dimensioni sub-millimetriche. In questo intervallo le forze di superficie sono preponderanti su quelle di massa, le tecniche di fabbricazione utilizzate sono quelle tipiche delle microtecnologie e l'attenzione viene posta sulla lavorazione superficiale piuttosto che sulla parte *bulk* dei dispositivi. L'interfaccia con i sistemi biologici, in particolare con popolazioni di cellule, richiede sia un'ottima biocompatibilità dei materiali utilizzati, sia la scelta di strutture adeguate che favoriscano la crescita cellulare.

In questo capitolo è descritta la realizzazione di una piattaforma per lo studio del sistema tattile che ha come obiettivo finale lo sviluppo di un sistema ibrido artificiale/biologico che riproduca il senso del tatto [4.1] [4.2]. La struttura può ospitare colture cellulari ed è pensata sia come piattaforma di studio sia come primo passo nella costruzione del sensore bio-ibrido. In particolare, in questo contesto, è descritta la realizzazione di elettrodi deformabili costituiti da un substrato polimerico, con un *layer* conduttivo metallico integrato, e da uno strato microfluidico per contenere le cellule e regolare il nutrimento e lo scambio di gas. È stato inoltre condotto uno studio sull'adesione delle cellule al substrato e sulla loro capacità di reagire a stimoli meccanici esterni.

Il capitolo è così organizzato: il paragrafo 4.2 tratta l'interfaccia tra cellula e biomateriale, descrive brevemente il dispositivo sul quale viene condotto lo studio e presenta uno stato dell'arte dei sistemi usati per le colture cellulari; il paragrafo 4.3 comprende la descrizione dei materiali e delle tecniche di fabbricazione utilizzati e la realizzazione del dispositivo; nel paragrafo 4.4 sono discussi i risultati ottenuti dalle prove sperimentali. Infine le conclusioni sono esposte nel paragrafo 4.5.

4.2 Applicazione

4.2.1 L'interfaccia tra le cellule e il materiale artificiale

La capacità di una cellula di riconoscere ed interagire con il substrato rappresenta il primo indispensabile passo senza il quale processi come proliferazione, migrazione e differenziamento cellulare non sarebbero possibili. Uno dei requisiti fondamentali di un biomateriale è la capacità di promuovere efficientemente l'adesione delle cellule da cui verrà colonizzato. Pertanto la comprensione dei meccanismi che determinano le fasi dell'adesione cellula-materiale, nonché il loro controllo, è indispensabile per la progettazione dei biomateriali. L'adesione cellulare ad un materiale avviene tramite un meccanismo specifico, mediato da proteine di membrana dette integrine. Sia le proprietà meccaniche che biochimiche del materiale determinano l'efficacia e l'avidità con cui le cellule riconoscono il substrato.

L'adesione prevede una fase precoce in cui la cellula riconosce il materiale, quindi le integrine trasmettono il segnale dalla superficie cellulare alla fitta rete di filamenti citoscheletrici che costituiscono l'impalcatura della cellula. Dall'interazione delle integrine con la matrice si originano cascate di segnali che determinano la riorganizzazione del citoscheletro di actina ed il cambiamento della morfologia cellulare. Inizialmente si formano

delle protrusioni citoplasmatiche e dei filamenti tra cellula e substrato, poi si creano adesioni focali all'apice di queste formazioni, fino ad arrivare allo stadio finale in cui le protrusioni si appiattiscono e si allargano fino a far assumere alla cellula una forma completamente appiattita (figura 4.1) [4.3].

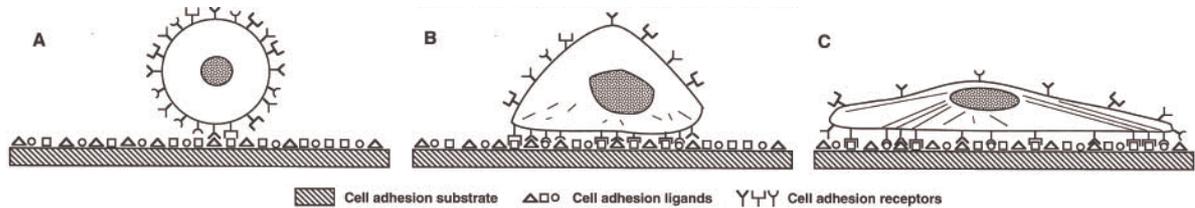


figura 4.1: Meccanismo di adesione della cellula ad un substrato: la cellula crea dei legami superficiali e si appiattisce.

Molti fattori influenzano l'interazione di un materiale con la cellula, non solo le sue caratteristiche chimiche e fisiche, ma anche la sua topologia superficiale. Considerato che le membrane basali possiedono una complessa topografia tridimensionale, è ragionevole ipotizzare che anche la struttura della loro superficie contribuisca a determinare comportamenti cellulari specifici [4.4]. Similmente a quanto accade per substrati di origine naturale, anche per le superfici di materiale sintetico le caratteristiche superficiali possono influenzare il comportamento cellulare. Le tecniche di fabbricazione che consentono di produrre substrati sintetici aventi una topografia superficiale controllata sono numerose (fotolitografia, *casting*, deposizione fisica o chimica, ecc.). Gli elementi topografici riproducibili sulla superficie di un materiale possono avere forme e dimensioni diverse, i più utilizzati per esperimenti con le cellule viventi sono i canali, seguiti da fori, pozzi, *pillars*, rilievi e, in generale, qualsiasi tipo di depressione o rilievo superficiale.

L'interfacciamento tra cellule viventi e componenti elettronici ha portato allo sviluppo di due vaste categorie di dispositivi. La prima comprende attrezzature che monitorano l'attività cellulare attraverso la trasduzione dei segnali biochimici, prodotti dai sistemi biologici, in segnali elettrici. La seconda classe di dispositivi permette il controllo dei processi cellulari grazie alla trasduzione dei segnali elettronici in stimoli biofisici [4.5].

I metodi per monitorare direttamente l'attività elettrica delle cellule coltivate su substrato includono:

- misure trans-membrana fatte inserendo uno degli elettrodi all'interno della cellula (tecnica del "*patch clamp*");
- misure extracellulari per mezzo di microtrasduttori esterni;
- metodi indiretti come le misure ottiche che utilizzano coloranti fluorescenti o dipendenti dal voltaggio.

Con la tecnica del *patch clamp* si ottengono informazioni molto accurate sulle proprietà elettrofisiologiche dell'intera cellula e sulle correnti che attraversano i singoli canali ionici. Tuttavia questo metodo è invasivo, causa la morte cellulare ed non può essere applicato a popolazioni di cellule [4.6]. Al contrario l'uso di microelettrodi esterni per la misura di impedenza è non invasivo, in quanto gli elettrodi costituiscono il substrato su cui le cellule crescono. Questo metodo si basa sul fatto che la membrana cellulare agisce come un dielettrico: l'area dell'elettrodo ricoperta aumenta a seguito dell'adesione o della crescita cellulare e questo causa una variazione d'impedenza che può essere registrata [4.7].

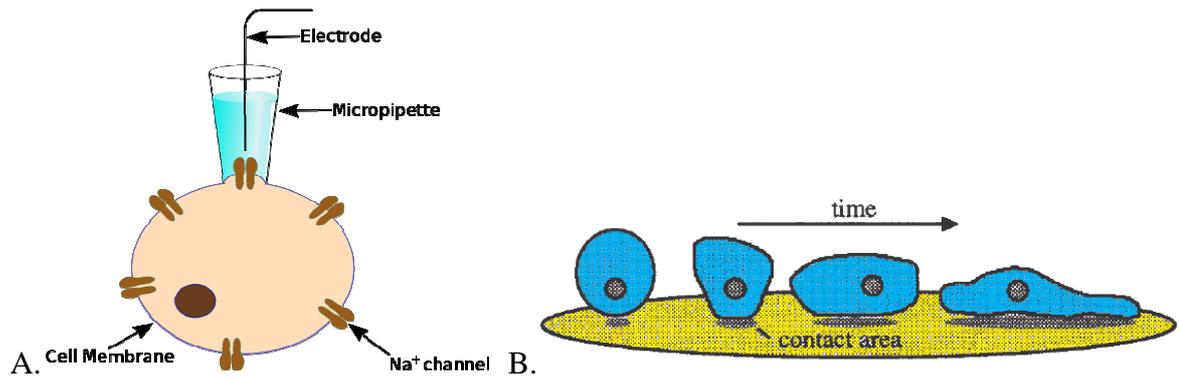


figura 4.2: Schema dei metodi di misura A. *Patch clamp*: l'elettrodo è inserito nella cellula; B. Microelettrodo: l'aumento dell'area coperta dalla cellula viene registrato come variazione di impedenza.

4.2.2 Il dispositivo preso in esame

Il presente lavoro si inserisce in un progetto più ampio che ha lo scopo di studiare, comprendere e riprodurre il senso tattile umano ed i meccanismi di trasduzione alla sua base [4.8].

L'obiettivo del dispositivo preso in esame è quello di sviluppare un sistema ibrido artificiale/biologico con caratteristiche *skin-like* (simili a quelle della pelle). Per raggiungere questo scopo è necessario progettare una struttura adeguata (biocompatibile, deformabile) che possa ospitare colture cellulari di recettori tattili. Questa struttura è pensata sia come piattaforma di studio che come primo passo nella costruzione di un sensore bio-ibrido, nel quale la parte biologica (le cellule) fornisca spontaneamente un segnale a seguito di uno stimolo esterno e la parte artificiale sia in grado di registrare, analizzare e trasmettere ad un PC questa risposta. Il dispositivo sarà dotato di canali microfluidici che forniranno alle cellule il nutrimento necessario e garantiranno lo scambio di gas in modo automatico e ripetibile, conterrà inoltre elettrodi deformabili che monitoreranno il comportamento delle cellule ed estrarranno informazioni sensoriali utili (figura 4.3).

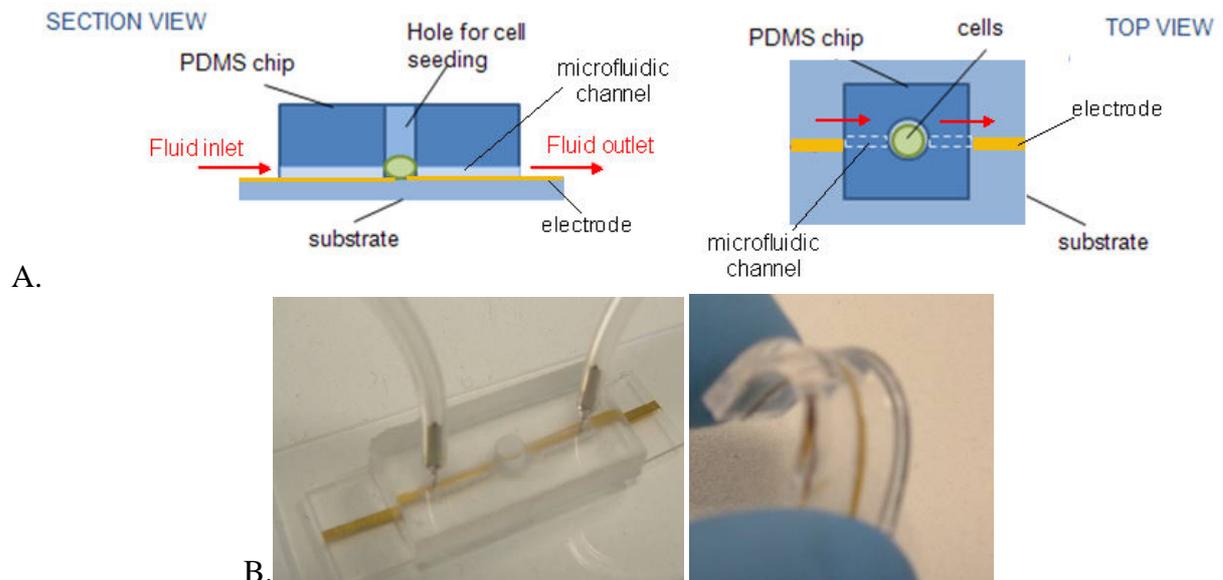


figura 4.3: A. Sketch della struttura per il monitoraggio delle cellule composta da canali fluidici ed elettrodi; B. uno dei prototipi realizzati.

Nella prima fase dello studio è necessario validare un approccio tecnologico per lo sviluppo di una piattaforma composta da un substrato elastomerico con elettrodi integrati (figura 4.4) sulla quale verranno coltivate delle popolazioni cellulari. Una volta ottenuta la coltura,

applicando degli stimoli meccanici al substrato, questi verranno trasferiti anche alle cellule che risponderanno variando il potenziale di membrana. Questo cambiamento è causato da una modifica della concentrazione intracellulare degli ioni Ca^{2+} [4.9]. La variazione del potenziale elettrico sarà registrata attraverso gli elettrodi integrati. Inoltre la variazione di impedenza registrata potrà essere utilizzata per rilevare la presenza di cellule sul substrato e per studiare l'influenza dello stretching sul comportamento cellulare.

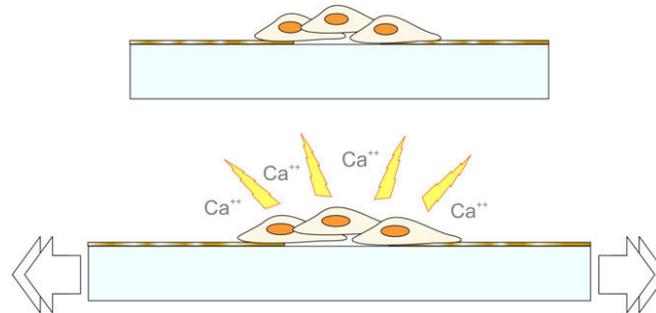


figura 4.4: Meccanismo alla base della piattaforma sensoriale bio-ibrida.

In questo lavoro la sfida tecnologica è quella di fabbricare un elettrodo, deformabile ed estensibile, con tecniche standard e veloci, utilizzando macchinari disponibili nella maggioranza delle *clean room*. Nei prossimi paragrafi saranno descritti la fabbricazione dell'elettrodo e della struttura microfluidica, gli studi biomeccanici sul comportamento delle cellule e sulla loro adesione al substrato; infine verranno presentate la caratterizzazione elettromeccanica degli elettrodi e le misure preliminari di impedenza sulle cellule.

4.2.3 Il monitoraggio automatizzato delle colture cellulari

Attualmente lo studio sui sistemi di colture cellulari e di rigenerazione tessutale è un settore in continua crescita. Il crescente numero di applicazioni ha portato alla necessità di creare sistemi per automatizzare questo tipo di processi, monitorare le colture e rendere il meccanismo ripetibile e affidabile. Questo sia al fine di ridurre gli spazi, i tempi, i costi e la quantità di lavoro umano, sia per ottenere maggiori dati quantitativi ed estrarre segnali utili per ulteriori analisi. Al fine di ricreare microambienti di rilevanza fisiologica per lo sviluppo di piattaforme per analisi cellulare sono stati sviluppati diversi tipi di strutture microfluidiche polimeriche [4.10] [4.11] [4.12] [4.13] [4.14]. Esse comprendono sistemi per la crescita di diversi tipi di cellule, la regolazione dei nutrienti e la conduzione di analisi e misure sui campioni.

Il Polydimethylsiloxane (PDMS) è il materiale più comunemente utilizzato per la creazione di tali sistemi nella microscala, essendo biocompatibile, non citotossico, permeabile ai gas (O_2 e CO_2 sono necessari per la respirazione cellulare), trasparente, chimicamente inerte e adatto a tecnologie di *soft-lithography* [4.10]. L'elasticità e la *compliance* di questo materiale sono inoltre fattori fondamentali nella presente applicazione. Infatti il dispositivo finale richiede l'integrazione di materiali che possono essere deformati reversibilmente e adattarsi a superfici curve e irregolari come quelle biologiche.

Al fine sia di monitorare le colture cellulari sia di investigare la loro risposta ad una forza esterna è necessario integrare degli elettrodi nella struttura polimerica. I MEAs (*Micro Electrode Arrays*) sono ormai una tecnologia ben sviluppata; nonostante ciò essi sono solitamente costruiti usando materiali rigidi o fragili (ad esempio silicio o vetro). Esistono anche MEAs basati su polimeri (ad esempio polymethylmethacrylate or polymide) [4.15] [4.16], comunque essi non soddisfano completamente tutte le caratteristiche meccaniche (elasticità e deformabilità) necessarie per il sensore tattile *skin-like* finale. In questo contesto recentemente sono stati ottenuti risultati promettenti nell'ambito delle pelli artificiali

sensorizzate [4.17], cioè di superfici macroscopiche dotate di elettrodi e/o sensori di diverso tipo e capaci di sopportare alte deformazioni.

L'ottimizzazione delle tecniche di microfabbricazione sugli elastomeri è un campo ancora in evoluzione. Studi recenti sulla deposizione di sottili film metallici su substrati elastomerici hanno dimostrato la fattibilità di questo tipo di approccio e la possibilità di ottenere strutture deformabili che mantengano la conduttività a seguito di una deformazione [4.18] [4.19] [4.20] [4.21]. Seguendo questo tipo di approccio è stato realizzato il dispositivo descritto in questo capitolo.

4.3 Tecniche di fabbricazione

4.3.1 Fabbricazione della struttura microfluidica

Il chip microfluidico consiste di una struttura polimerica con integrati dei canali per la semina delle cellule. La struttura preliminare è aperta (cioè presenta canali aperti nella parte superiore per facilitare la manipolazione delle cellule), mentre la struttura finale è chiusa e ha dei fori che permettono di accedere ai canali.

La struttura in PDMS è stata realizzata tramite *soft-lithography*. Questa tecnica rappresenta una strategia efficiente e a basso costo basata sulla replica di micro-strutture. Inizialmente viene creato uno stampo con dettagli di dimensioni micrometriche tramite litografia standard, il quale è poi utilizzato per replicare il design su un elastomero. Come materiale è stato utilizzato il PDMS visto che è trasparente, permeabile ai gas, flessibile ed elastico.

Il primo passo della fabbricazione riguarda il design di maschere litografiche ad alta risoluzione, con il disegno dei canali. Gli stampi sono stati ottenuti tramite un processo basato sul *photoresist* negativo SU-8 (SU-8 50, MicroChem Corp.). Uno strato di *resist* di spessore 100 μm , che determina l'altezza dei successivi canali, è stato depositato tramite *spin-coating* su un wafer di silicio, quindi le maschere sono state utilizzate per trasferire il design durante l'esposizione ai raggi UV.

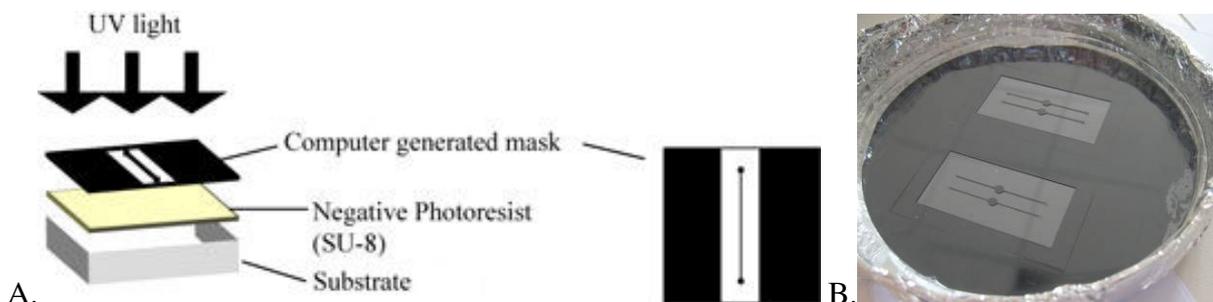


figura 4.5: A. Fabbricazione dello stampo: esposizione UV attraverso la maschera litografica; B. uno degli stampi prodotti in SU-8.

Una replica dei canali è stata ottenuta depositando, tramite *spin-coating*, il PDMS sugli stampi in SU-8. Il PDMS è stato preparato con un rapporto 10:1 tra la base dell'elastomero e l'agente reticolante e poi fatto polimerizzare a 80°C per 3 ore. Una volta tolto dallo stampo, il chip di PDMS presenta i canali al suo interno.

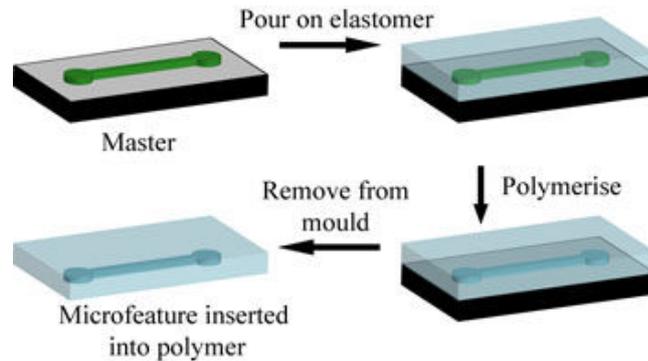


figura 4.6: Fase di *casting* del polimero nello stampo, polimerizzazione e ottenimento del chip microfluidico finale.

Come mostrato nella figura 4.7, il chip fabbricato può sopportare alti livelli di sollecitazione a flessione; infatti, nel sistema da realizzare, è richiesta l'applicazione di stimoli meccanici al substrato al fine di stimolare le cellule.

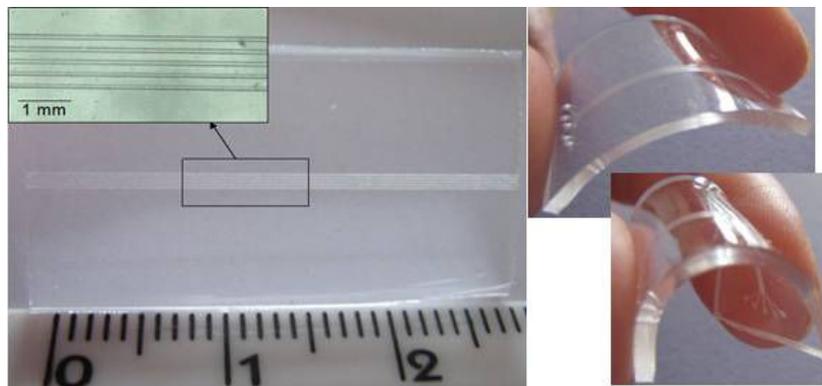


figura 4.7: PDMS chip: ingrandimento a microscopio ottico di un chip con 5 canali di larghezza 100 μm e altezza 100 μm ; dimostrazione della flessibilità della struttura.

Sono state preparate strutture con caratteristiche diverse al fine di scegliere la configurazione più efficace (figura 4.8):

- Design: chip con una o due camere centrali per la semina delle cellule oppure strutture composte da più canali in parallelo.
- Spessore: lo spessore del chip è stato variato in quanto influenza la flessibilità complessiva della struttura.
- Composizione del polimero: il rapporto tra la base del polimero e l'agente reticolante influisce sulla rigidità del materiale. In particolare sono stati fabbricati chip a concentrazione 10:1 (standard) e 20:1. Il PDMS a concentrazione più bassa (20:1) è più *soft* rispetto al materiale standard e dovrebbe favorire la crescita cellulare perché si avvicina di più alla bassa rigidità cellulare.

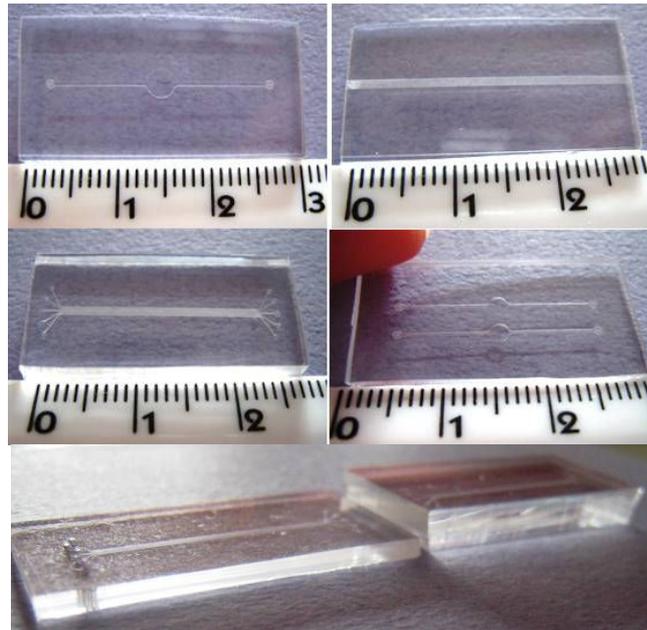


figura 4.8: Strutture in PDMS realizzate con caratteristiche diverse: esempi di vari design dei canali e spessori del chip.

Successivamente è stata realizzata una struttura con un canale ed una cameretta centrale chiusa (3 mm in diametro); la camera costituisce uno spazio dedicato alla crescita cellulare e a raccogliere una certa quantità di mezzo di coltura. Il canale ed il pozzetto centrale sono chiusi all'esterno, quindi le cellule ed il liquido hanno accesso alla struttura solamente tramite i fori di ingresso e di uscita collegati a dei tubicini (figura 4.9).

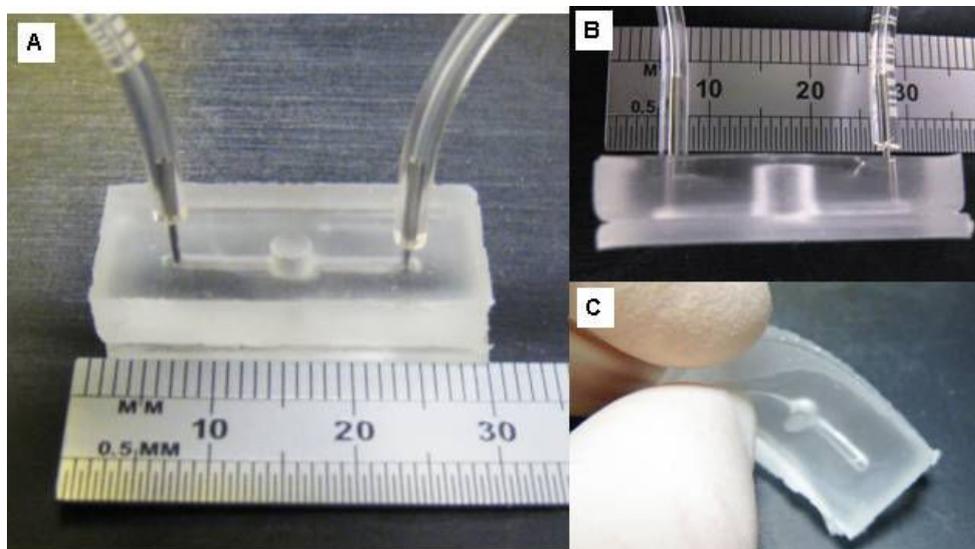


figura 4.9: A. Struttura in PDMS con un canale e una cameretta centrale chiusa. B. vista laterale da cui si intravede la cameretta interna; C. prova di flessibilità della struttura.

4.3.2 Fabbricazione dell'elettrodo deformabile

La seconda parte del lavoro consiste nella fabbricazione degli elettrodi flessibili. I prototipi realizzati sono di due tipi: il primo verrà utilizzato per la caratterizzazione elettromeccanica ed il secondo per i test di impedenza sulle cellule (figura 4.10). Entrambi consistono di uno strato inferiore flessibile, un conduttore metallico e uno strato isolante superiore.

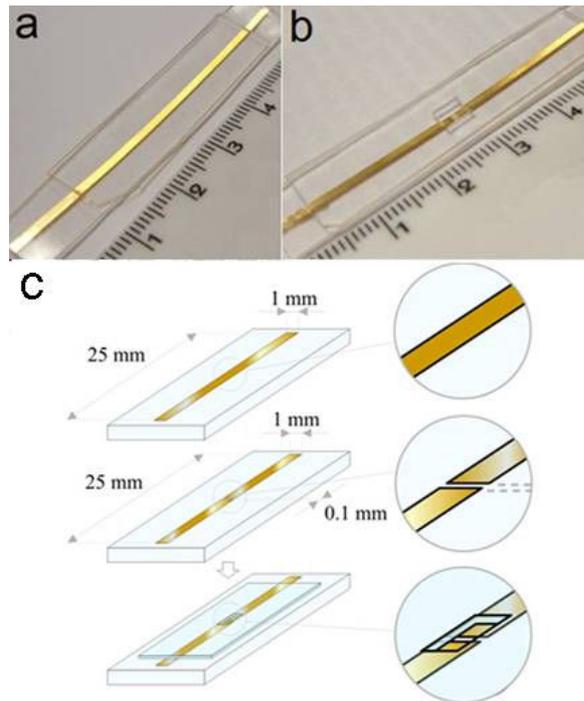


figura 4.10: a. Elettrodo per i test di caratterizzazione elettromeccanica; b. elettrodo per i test di impedenza con le cellule; c. schema dei diversi prototipi di elettrodo.

Il substrato è stato realizzato con PDMS 1:10 in membrane spesse 1 mm.

Uno strato di 90nm di oro (Au) è stato depositato sul substrato tramite *sputtering* attraverso una maschera metallica con un'apertura larga 1 mm. Lo stesso metodo è stato utilizzato per il secondo prototipo, modificando la maschera in modo da ottenere una spaziatura centrale di 100 μm tra i due elettrodi. Uno strato di pochi \AA di titanio (Ti), che gode di una nota biocompatibilità, è stato interposto tra il polimero e l'oro per aumentare l'adesione tra le due superfici. La membrana elastomerica è stata sottoposta ad un *pre-stretch* di circa il 10% prima di depositare il metallo. In questo modo, dopo il rilassamento del campione, la superficie dell'oro presenta numerose rugosità che impediscono la rottura del film di metallo (che è meno elastico del polimero) durante l'applicazione di una deformazione.

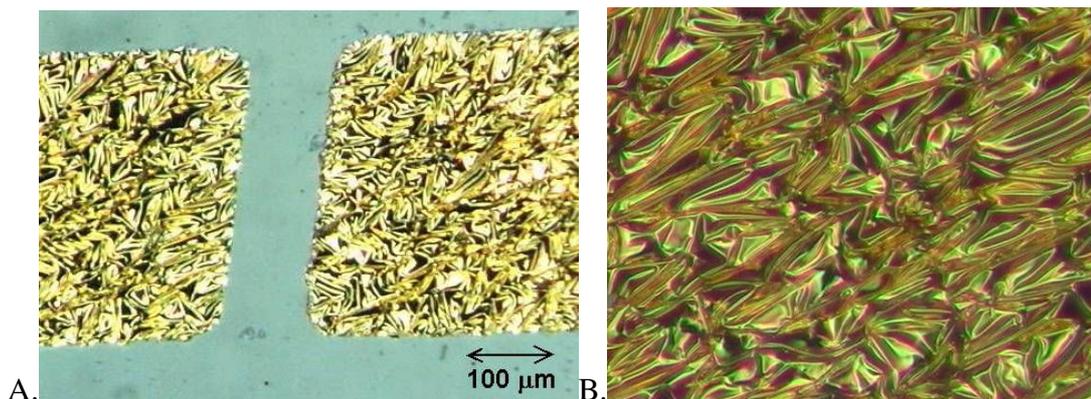


figura 4.11: A. Ingrandimento al microscopio ottico della zona intermedia tra gli elettrodi; B. struttura rugosa superficiale dello strato metallico conduttivo.

Un secondo strato di PDMS è stato usato per isolare gli elettrodi. Nel secondo prototipo è stata lasciata un'apertura centrale (5 mm x 5 mm) per permettere la coltivazione delle cellule in diretto contatto con gli elettrodi.

4.4 Test sperimentali e verifica dei risultati

4.4.1 Test sulle cellule: adesione al substrato e comportamento in risposta ad uno stimolo applicato

Per studiare l'adesione cellulare sono stati seminati sulla superficie PDMS/Au dei fibroblasti (3t3) con una densità di 4×10^5 cellule/ml. Le cellule sono state immerse nel mezzo di coltura (*Dulbecco's modified Eagle's medium* con 10% *fetal bovine serum* e 1% *penicillin-streptomycin*) e poste in incubatore a 37°C, 5% CO² e 100% di umidità relativa. I fibroblasti hanno aderito al substrato senza bisogno di proteine di adesione e la coltura è stata mantenuta per 7 giorni. In figura 4.12 è possibile notare la tipica forma allungata che le cellule assumono quando sono attaccate ad un substrato.

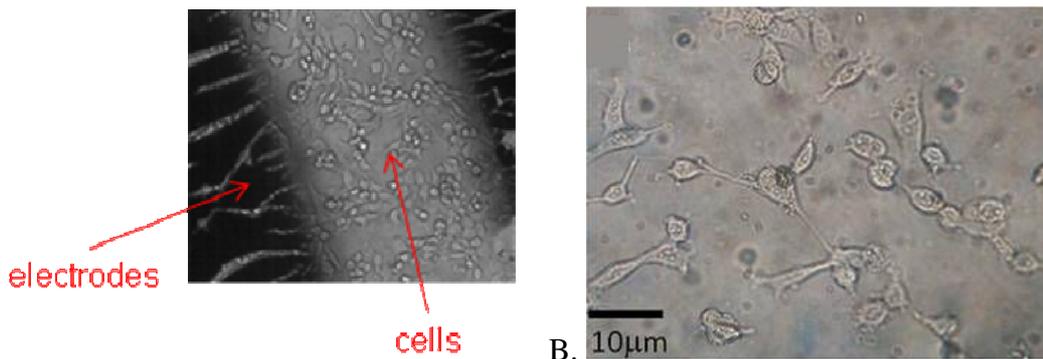


figura 4.12: A. Cellule coltivate sul substrato, nella zona compresa tra i due elettrodi; B. Fibroblasti dopo 7 giorni di coltura.

L'obiettivo finale è quello di applicare uno stimolo esterno e valutare se e come le cellule reagiscono. Per questo i fibroblasti sono stati marcati con un indicatore di calcio intracellulare (*Oregon green Bapta*) e visualizzati sotto microscopio a fluorescenza prima e dopo l'applicazione di una deformazione uniassiale (1%) dell'elettrodo per 1 minuto. Considerando la dimensione media delle cellule (diametro $\sim 10 \mu\text{m}$ e deformazione ammissibile $\sim 0.2 \mu\text{m}$) questo valore di deformazione (che corrisponde a 0.25 mm) copre un ampio *range* di deformazione che comprende quella che sarà applicata alle cellule. La figura 4.13 mostra le immagini a fluorescenza delle cellule prima e dopo l'applicazione della deformazione uniassiale: si nota un aumento dell'intensità di fluorescenza che indica un influsso di Ca²⁺ nelle cellule in risposta allo sforzo applicato. Come conseguenza di questa variazione di calcio intracellulare la membrana cellulare subirà una variazione di potenziale che sarà rilevata dal futuro sensore ibrido.

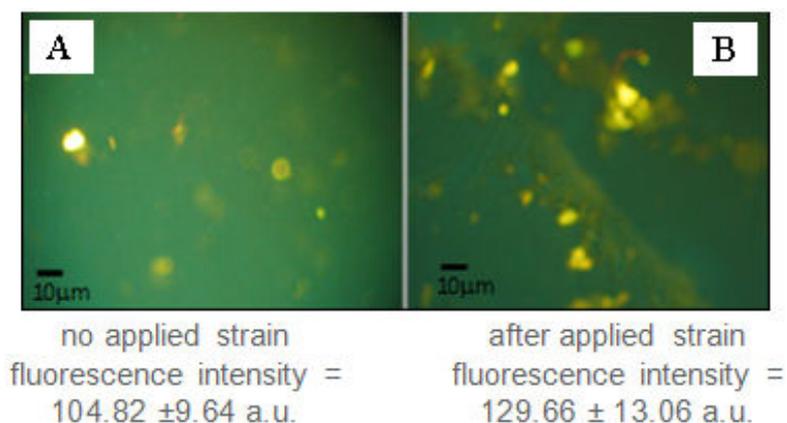


figura 4.13: Fibroblasti 3t3 marcati con *Oregon green* prima (A) e dopo (B) una deformazione uniassiale.

4.4.2 Caratterizzazione elettromeccanica dell'elettrodo deformabile

Sono state condotte delle prove a trazione per studiare il comportamento della resistenza elettrica dell'elettrodo in funzione degli sforzi esterni applicati. Nel protocollo sperimentale è stata posta particolare attenzione al *range* di deformazione dell'1% che sarà quello applicato alle cellule durante il funzionamento del dispositivo. In questo intervallo l'elettrodo deve dimostrare un comportamento stabile per poter estrarre una risposta in modo controllato.

I test sono stati condotti con il banco di prova di figura 4.14: l'elettrodo è stato fissato da un lato ad una cella di carico (Futek, LSM235) e dall'altro ad una slitta motorizzata (PI, M-410.CG, 0.0035 μm di risoluzione) per deformare il campione. Un sistema software dedicato è stato sviluppato per controllare la slitta ed acquisire dati dalla cella di carico. La resistenza elettrica del conduttore è stata misurata tramite un partitore di tensione e monitorata in tempo reale grazie ad un sistema di acquisizione dati.

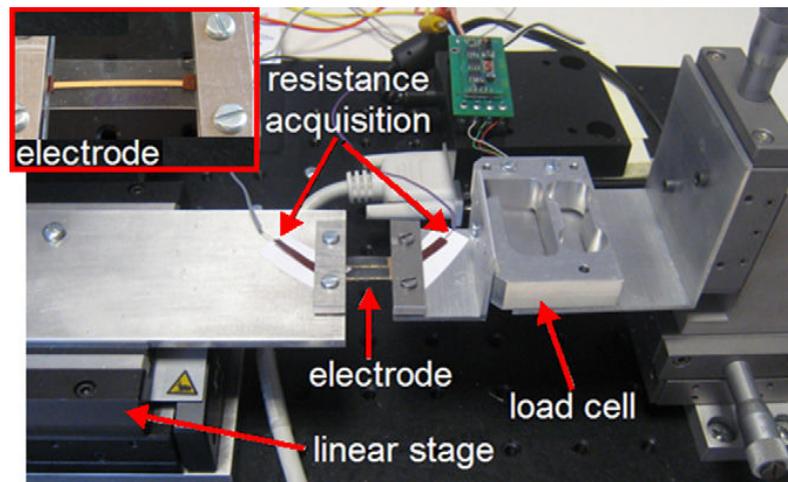


figura 4.14: Il banco di prova per la caratterizzazione elettromeccanica; il particolare in alto mostra un ingrandimento dell'elettrodo.

Durante gli esperimenti è stato monitorato il valore della resistenza in funzione dello spostamento. In particolare, in un primo test sono stati applicati cicli di carico/scarico fino al 12% di deformazione, mentre in una seconda prova la deformazione è stata aumentata fino ad arrivare alla rottura elettrica dello strato conduttivo. Le prove sono state condotte su provini identici e ripetute 5 volte ciascuna. La slitta si è mossa ad una velocità di 0.1 mm/s fino ad uno spostamento di 3 mm (12% di deformazione) in 20 *step* di 0.6% di deformazione l'uno, poi la deformazione è stata recuperata alla stessa velocità. La figura 4.15 mostra l'andamento della resistenza R dello strato conduttore Au/Ti in funzione della deformazione uniaassiale.

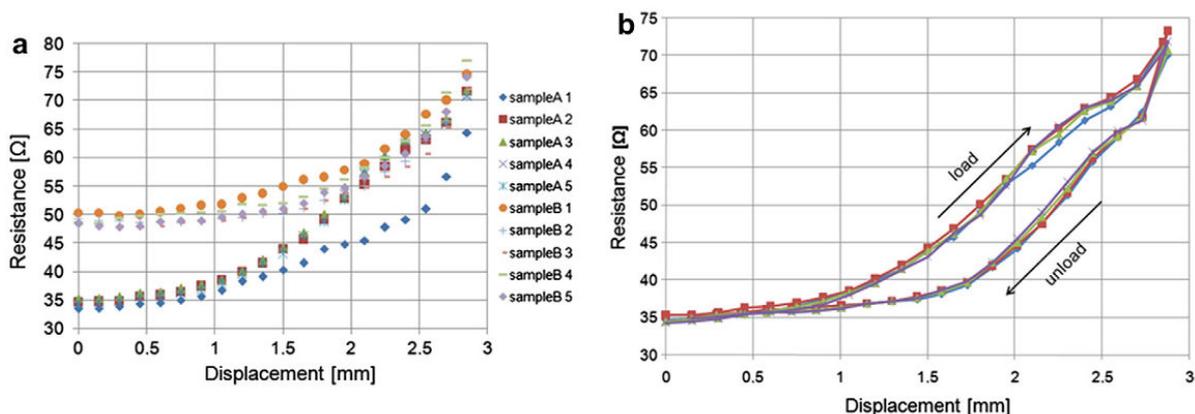


figura 4.15: a. Resistenza elettrica in funzione dello spostamento; b. *loop* di isteresi durante un ciclo di carico/scarico.

Nell'intervallo di deformazione dell'1% (0.25 mm) la resistenza è costante e l'isteresi è circa zero, poi R cresce non linearmente con lo spostamento. I test hanno dimostrato un'alta ripetibilità delle misure (la deviazione standard è 2.3 e 1.6 Ω rispettivamente per il primo e il secondo campione). I valori iniziali delle due resistenze sono diversi a causa del *pre-stress* iniziale indotto nel campione dall'attrezzatura di fissaggio al banco di prova. Ulteriori test sono stati condotti portando a rottura lo strato metallico. L'elettrodo ha dimostrato di rimanere conduttivo fino ad una deformazione del 14% e di recuperare la conduttività quando riportato sotto questa soglia. Questo valore può essere modificato in quanto dipende dal valore di *pre-stretch* applicato durante la deposizione del metallo.

Sono state condotte anche prove di forza in funzione dello spostamento; la figura 4.16 mostra il grafico di test ciclici di carico/scarico. È chiaramente visibile il comportamento lineare elastico del PDMS. La ripetibilità è estremamente alta (la deviazione standard è 0.01 N per entrambi i campioni) e il *loop* di isteresi è praticamente nullo.

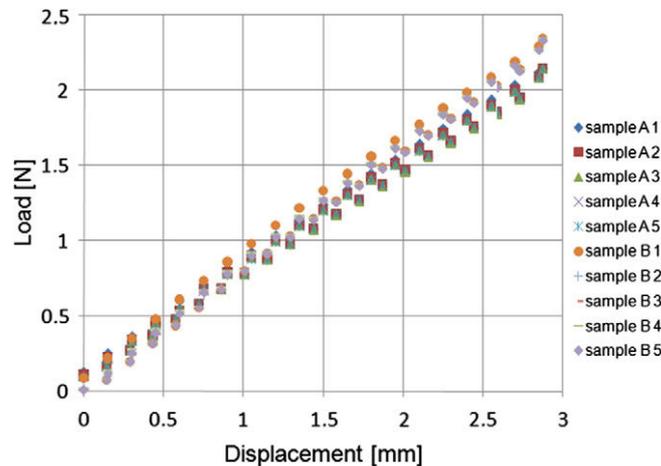


figura 4.16: Grafico della forza in funzione dello spostamento

4.4.3 Misure di impedenza sull'elettrodo e sulle cellule

Nella configurazione finale l'elettrodo verrà immerso nel mezzo di coltura e ricoperto con cellule prima di essere deformato. Per verificare la fattibilità di questo approccio sono state condotte delle misure preliminari sull'impedenza dell'elettrodo immerso nel mezzo. Il set-up è lo stesso mostrato in figura 4.14, inoltre è stato usato un impedenziometro (Agilent, 4980) per ottenere i dati di impedenza. Come mostrato dai risultati di figura 4.17A, l'impedenza dell'elettrodo rimane stabile durante lo stretching e si abbassa all'aumentare della frequenza. Ulteriori misure in frequenza sono state condotte usando un substrato su cui in precedenza erano state coltivate delle cellule. Durante queste prove l'elettrodo non è stato deformato, in quanto si voleva valutare il cambiamento di impedenza con e senza le cellule. Come evidenziato in figura 4.17B, l'impedenza decresce quando, oltre al mezzo di coltura, sono presenti anche le cellule. Questa variazione indica la capacità dell'elettrodo di rilevare la presenza delle cellule e sarà inoltre utile per la futura calibrazione della piattaforma.

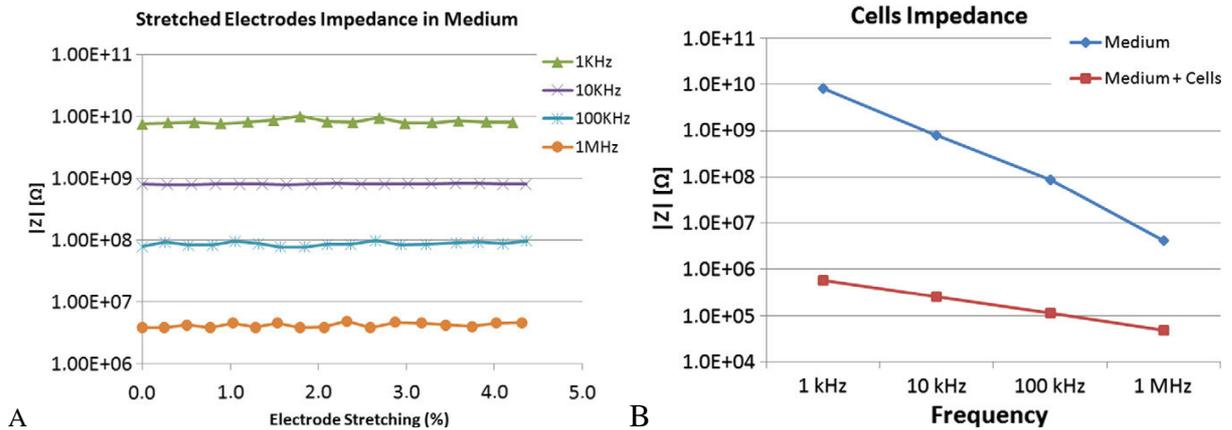


figura 4.17: A. Impedenza in funzione della deformazione a diverse frequenze; B. Impedenza in funzione della frequenza per l'elettrodo immerso solo nel mezzo di coltura oppure ricoperto da una popolazione cellulare.

4.5 Conclusioni

Questo capitolo ha presentato la progettazione e fabbricazione di una piattaforma che si interfaccia con coltivazioni cellulari. Sono state utilizzate tecniche litografiche per produrre membrane micro-strutturate in materiale polimerico e tecnologie di deposizione di film metallici per realizzare lo strato conduttivo. Gli elastomeri hanno le giuste proprietà per interfacciarsi con le cellule essendo bio-compatibili e *soft*. Hanno inoltre un'alta elasticità e un basso modulo elastico, fattori che li rendono perfetti per realizzare strutture deformabili.

In particolare è stata realizzata una piattaforma per lo studio e la riproduzione del sistema tattile composta da uno strato microfluidico e da un elettrodo deformabile, come primo passo verso la realizzazione di un sensore bio-ibrido con caratteristiche *skin-like*.

Oltre a curare la metodica di fabbricazione, il sistema è stato testato con cellule viventi al fine di verificare la biocompatibilità della struttura e la capacità di adesione delle cellule al substrato. Inoltre la caratterizzazione elettromeccanica dell'elettrodo ha appurato l'affidabilità e la stabilità della struttura e le prove preliminari sulla misura di impedenza cellulare hanno dimostrato la possibilità di usare la struttura come sistema di monitoraggio dell'attività cellulare.

In particolare è stata dimostrata la capacità di mantenere in vita una popolazione cellulare (abilità già ampiamente acquisita con metodi tradizionali) in combinazione a dispositivi innovativi per il monitoraggio cellulare *real-time*. Questo caso di studio è un esempio di come la combinazione di materiali e tecniche adeguati può aprire la strada verso nuove applicazioni nel settore biomedicale. In generale questo è un esempio di uso di tecniche ingegneristiche di micro-fabbricazione nella scala micrometrica che possono integrare e migliorare le classiche metodiche mediche/biologiche.

Bibliografia IV

- [4.1] Buselli E, Smith A M, Grover L M, Levi A, Allman R, Mattoli V, Menciassi A, Beccai L 2011 Development and characterization of a bio-hybrid skin-like stretchable electrode *Microelectronic Engineering Journal* – in press
- [4.2] Buselli E, Smith A, Grover L, Levi A, Allman R, Menciassi A, Mattoli V, Beccai L. 2010 Development and characterization of a stretchable electrode on soft polymer for mammalian cell monitoring and stimulation *36th International Conference on Micro & Nano Engineering* (Genova, Italy 19-23 Sept)
- [4.3] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P 2002 *Molecular Biology of the Cell New York: Garland Science*
- [4.4] Flemming R G, Murphy C J, Abrams G A, Goodman S L and Nealey P F 1999 Effects of synthetic micro and nano-structured surfaces on cell behavior *Biomaterials* **20** 573-588
- [4.5] Fleming J T 2010 Electronic interfacing with living cells *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **117** 155-178
- [4.6] Heer F et al. 2007 Single-chip microelectronic system to interface with living cells *Biosensors and Bioelectronics* **22** 2546–2553
- [4.7] Wegener J, Keese C R and Giaever I 2000 Electric cell–substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces *Experimental Cell Research* **259** 158–166
- [4.8] <http://nanobiotouch.org>
- [4.9] Alberts B et al. 2008 *Molecular biology of the cell Garland Science New York USA*
- [4.10] Kim L, Toh Y, Voldman J and Yu H 2007 A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells *Lab on a Chip* **7** 681–694
- [4.11] Andersson H and van der Berg A 2004 microfabrication and microfluidics for tissue engineering: state of the art and future opportunities *Lab on a Chip* **4** 98–103
- [4.12] Gómez-Sjöberg R, Leyrat A, Pirone D, Chen C and Quake S 2007 Versatile, Fully Automated, Microfluidic Cell Culture System *Anal. Chem.* **79** 8557-8563
- [4.13] Prokop A, Prokop Z, Schaffer D, Kozlov E, Wikswo J, Cliffel D and F Baudenbacher 2004 NanoLiterBioReactor: Long-Term Mammalian Cell Culture at Nanofabricated Scale *Biomedical Microdevices* **6** 325–339
- [4.14] Kim M, Yeon J H and Park J 2007 A microfluidic platform for 3-dimensional cell culture and cell-based assays *Biomed Microdevices* **9** 25-34
- [4.15] Lacour S P, Benmerah S, Tarte E, FitzGerald J, Serra J, McMahon S, Fawcett J, Graudejus O, Yu Z and Morrison III B 2010 Flexible and stretchable micro-electrodes for in vitro and in vivo neural interfaces *Medical and Biological Engineering and Computing* **48** 945–954
- [4.16] Hoffmann K P, Koch K P, Doerge T and Micera S 2006 New technologies in manufacturing of different implantable microelectrodes as an interface to the peripheral nervous system *BioRob Conference* 414–419
- [4.17] Takei K, Takahashi T, Ho J C, Ko H, Gillies A G, Leu P W, Fearing R S and Javey A 2010 Nanowire active-matrix circuitry for low-voltage macroscale artificial skin *Nature Materials* **9** 821-826
- [4.18] Tsay C, Lacour S P, Wagner S and Morrison B 2005 Architecture, fabrication, and properties of stretchable micro-electrode arrays *Proc. 4th IEEE Conf. On Sensors Irvine, CA* pp. 1169–1172
- [4.19] Park J, Kim H S and Han A 2009 Micropatterning of poly(dimethylsiloxane) using a Photoresist lift-off technique for selective electrical insulation of microelectrode arrays *Journal of Micromechanics and Microengineering* **19** 065016

- [4.20] Adrega T and Lacour S P 2010 Stretchable gold conductors embedded in PDMS and patterned by photolithography: fabrication and electromechanical characterization *Journal of Micromechanics and Microengineering* **20** 055025
- [4.21] Rosset S, Niklaus M, Dubois P and Shea H R 2009 Metal ion implantation for the fabrication of stretchable electrodes on elastomers *Advanced Functional Materials* **19** 470-478

Capitolo 5

Sistemi di interfaccia con i fluidi

5.1 Introduzione

La scala micro e sub-micrometrica comprende sistemi per i quali valgono regole del tutto diverse dai sistemi macro; in particolare il comportamento dei fluidi, compresi quelli biologici, segue regole diverse. I dispositivi che si interfacciano con fluidi a queste scale devono innanzitutto essere progettati in modo da poter gestire flussi micro/nano-metrici, avere superfici prive di discontinuità e prodotte con materiali biocompatibili e non soggetti a degradazione in ambiente acquoso.

In questo capitolo è descritta la realizzazione di una micro-pompa peristaltica usata come attuatore per regolare il passaggio di fluidi all'interno di un sistema microfluidico [5.1] [5.2]. Il dispositivo complessivo, nel quale la pompa è inserita, consiste di un sistema per l'analisi delle proteine nel sangue. Si tratta di un dispositivo trasportabile, grande pochi centimetri, che include al proprio interno tutte le tecnologie che rendono possibile effettuare analisi che di solito necessitano di un intero laboratorio. Queste nuove apparecchiature, dette "*Lab-on-Chip*", sono nate grazie alla diffusione di strumenti microfluidici che permettono di gestire in modo efficiente piccole quantità di fluido riducendo sia lo spazio necessario che il costo dei vari reagenti.

Il capitolo è così organizzato: il paragrafo 5.2 mostra una panoramica sulla microfluidica e presenta una descrizione dettagliata del sistema sviluppato; il paragrafo 5.3 comprende la descrizione dei materiali e delle tecniche di fabbricazione utilizzati e la realizzazione del dispositivo; nel paragrafo 5.4 sono discussi i risultati sperimentali ottenuti dalle prove di verifica. Infine, le conclusioni sono esposte nel paragrafo 5.5.

5.2 Applicazione

5.2.1 La microfluidica e i dispositivi lab-on-chip

La microfluidica è un campo di ricerca scientifica e tecnologica emergente che si occupa del comportamento e della manipolazione dei fluidi su scala micro e nanometrica. È un settore multidisciplinare che mira a gestire in modo preciso fluidi che sono geometricamente confinati in spazi di dimensioni sub-millimetriche [5.3]. I volumi tipici coinvolti nei sistemi microfluidici sono nel *range* di 1 picolitro-1 nanolitro (1 picolitro corrisponde ad un cubo avente lato di 10 micrometri), ragion per cui l'enorme potenziale di tali dispositivi risiede nel risparmio dei reagenti da manipolare. Allo stesso tempo le dimensioni ridotte del microsistema permettono un controllo preciso della concentrazione di molecole nello spazio e nel tempo che non può essere realizzato nelle comuni applicazioni fluidiche. I primi sistemi microfluidici sono stati introdotti negli anni '80 nel campo della chimica analitica, all'inizio degli anni '90 è stato poi introdotto il concetto di "*lab-on-a-chip system*" ovvero un sistema microfluidico che prevede l'integrazione su un unico chip di tutte quelle componenti necessarie a svolgere in sequenza le diverse tappe di un processo chimico. Pertanto tali sistemi presentano un elevato potenziale di utilizzo: grazie alla miniaturizzazione è infatti diventato possibile prendere in considerazione sistemi in cui migliaia di reazioni possono essere eseguite in parallelo in maniera automatizzata. Come i circuiti integrati hanno rivoluzionato l'industria elettronica e informatica riducendo drasticamente lo spazio e il

tempo richiesto per i calcoli, così i sistemi microfluidici promettono di portare un simile cambiamento nell'automazione su larga scala della tecnologia chimica e biologica, suggerendo la possibilità di condurre numerosi esperimenti rapidamente e in parallelo [5.4]. Nonostante il concetto di *lab-on-chip* si sia ormai ampiamente diffuso, bisogna constatare che tali chip non hanno ancora invaso il mercato di consumo, ma sono adoperati solo nell'ambito della ricerca. La ragione principale di questo ritardo sta nella natura stessa della microfluidica: infatti, mentre la possibilità della miniaturizzazione di questi chip è legata a procedure ormai acquisite, il controllo accurato dei flussi e dei volumi di liquidi su scale micro-nanometriche costituisce il problema maggiore. Lo spostamento o mescolamento di liquidi in canali di diametro di qualche micrometro coinvolge, infatti, una serie di parametri fisici che sfuggono alla nostra visione macroscopica. I flussi in queste condizioni sono quasi sempre laminari e, a causa dell'elevato rapporto area/volume, la natura delle interfacce diventa molto importante. Nei sistemi microfluidici le forze capillari ad esempio dominano di gran lunga sulla forza gravitazionale; tale aspetto presenta una duplice valenza: può costituire un problema in quanto richiede un maggiore controllo della natura delle pareti dei microcanali, ma offre anche delle possibilità per la realizzazione di nuove tecniche di manipolazione dei liquidi (che non hanno equivalente su scala macroscopica), come ad esempio il pompaggio elettro-osmotico oppure l'utilizzo di valvole basate sulle forze di capillarità. Di recente i dispositivi microfluidici, sfruttando i vantaggi della miniaturizzazione, hanno trovato applicazioni crescenti nella ricerca biomedica di base e applicata [5.5], in dispositivi per la migrazione di cellule, lo screening di farmaci e le colture a lungo termine di cellule neuronali e staminali [5.6]. I sistemi microfluidici stanno cominciando ad offrire nuove capacità per aumentare la conoscenza della biologia grazie alla loro abilità di controllare e manipolare microambienti cellulari che non erano disponibili nei metodi tradizionali alla macroscale [5.7].

5.2.2 Il dispositivo preso in esame

Il progetto, nel quale il lavoro è inserito, mira a realizzare un dispositivo compatto, affidabile e a basso costo capace di rilevare e discriminare le proteine presenti in campioni biologici, anche a basse concentrazioni [5.8]. Sono stati studiati diversi approcci nella scala mini e nano per l'analisi di proteine, basandosi principalmente sull'interazione tra le radiazioni elettromagnetiche e le biomolecole. Questo obiettivo è perseguito tramite l'integrazione di diverse tecnologie (fotonica, microfluidica, microelettronica, nanotecnologie e chimica delle superfici) in una struttura 3D composta da più strati, in modo da superare il classico approccio 2D. Brevemente, il dispositivo è composto da uno strato contenente la microfluidica, uno l'ottica ed un terzo una superficie funzionalizzata. Quest'ultima è costituita da una matrice di pozzetti in cui sono immobilizzati degli attameri (sequenze di DNA) capaci di interagire con le proteine. La superficie si trova in corrispondenza del sensore ottico SPAD (*Single Photon Avalanche Diode*). Poiché gli attameri sono trattati in modo da avere proprietà di fluorescenza, il sistema è in grado di distinguerli quando viene illuminato da luce laser ad una frequenza opportuna. Il siero, quando fluisce all'interno dei canali, viene a contatto con la superficie funzionalizzata e le proteine presenti si legano agli attameri. A questo punto viene effettuato un risciacquo per eliminare gli attameri non legati. Adesso ad ogni attamero corrisponde una proteina, quindi è possibile misurare il numero di proteine presenti nel campione di siero attraverso l'analisi della fluorescenza.

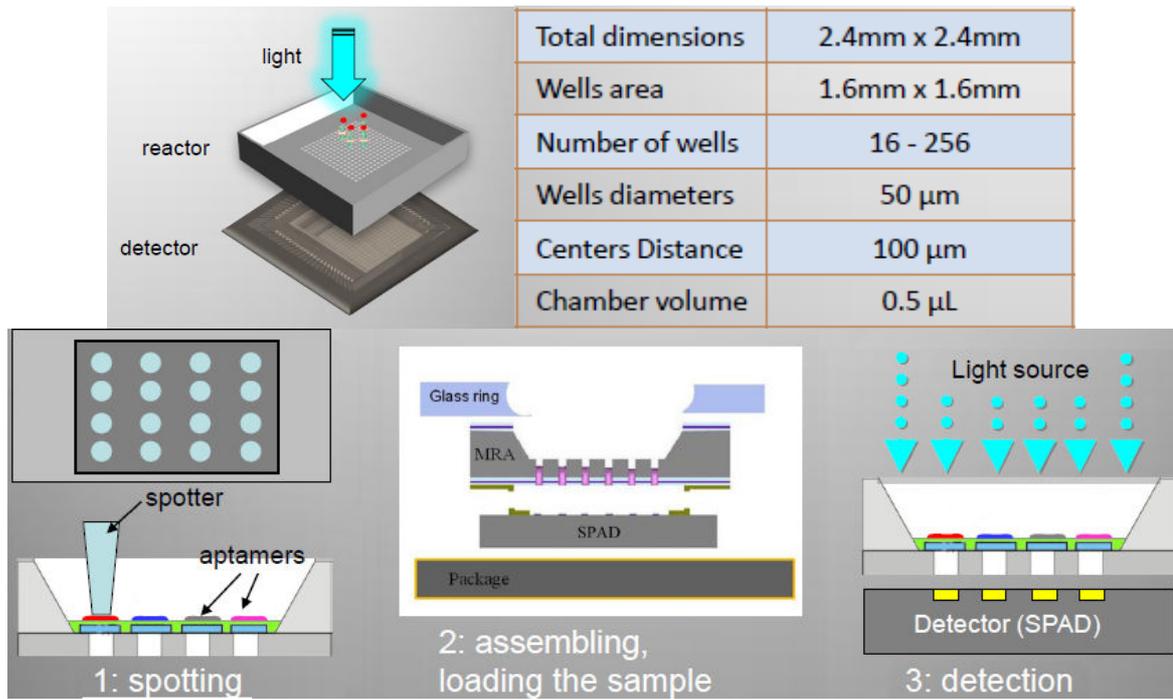


figura 5.1: Sketch generale del dispositivo *lab-on-chip* per l'analisi di proteine nel sangue.

In questo contesto, il presente lavoro di tesi ha contribuito alla realizzazione dello strato microfluidico del dispositivo, la cui funzione è quella di regolare il flusso di fluidi biologici in modo automatico. L'uso di canali microfluidici permette di utilizzare piccoli volumi di campioni e di reagenti, di effettuare più analisi in parallelo e di ridurre notevolmente i tempi. Il sistema è composto da diversi tipi di valvole e attuatori disposti in serie e/o in parallelo in grado di gestire il flusso di sostanze. Esistono vari tipi di pompe basate su differenti principi di funzionamento [5.9]; per ogni funzione richiesta nell'applicazione è stato scelto il tipo di pompa più adatta valutando il volume, la velocità e l'efficienza richiesti. Complessivamente sono presenti pompe piezoelettriche, peristaltiche, elettromagnetiche ed elettrolitiche (figura 5.2). I diversi attuatori sono fabbricati in PDMS e silicio utilizzando tecniche compatibili, in modo da poter essere integrati in un unico chip nel sistema finale di figura 5.3.

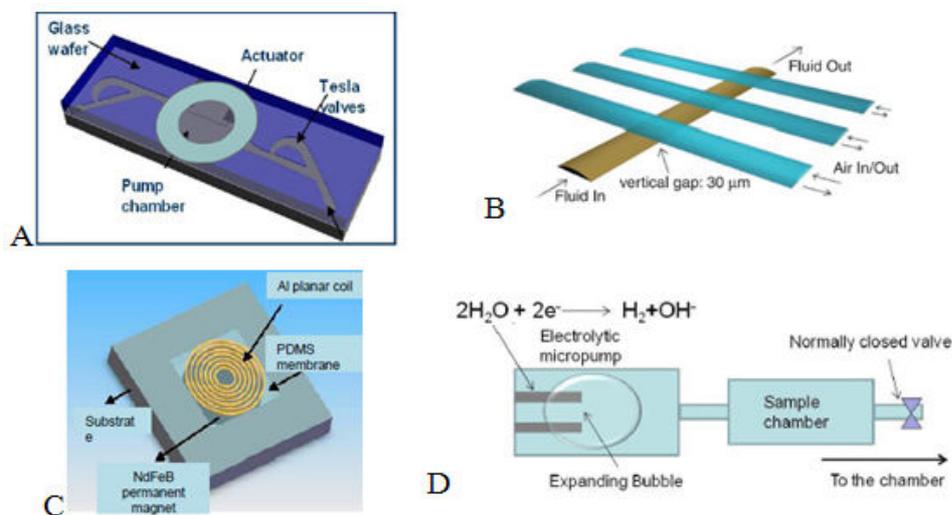


figura 5.2: Sketch dei diversi tipi di attuatori presenti (A. pompa piezoelettrica, B. pompa peristaltica, C. pompa elettromagnetica, D. pompa elettrolitica)

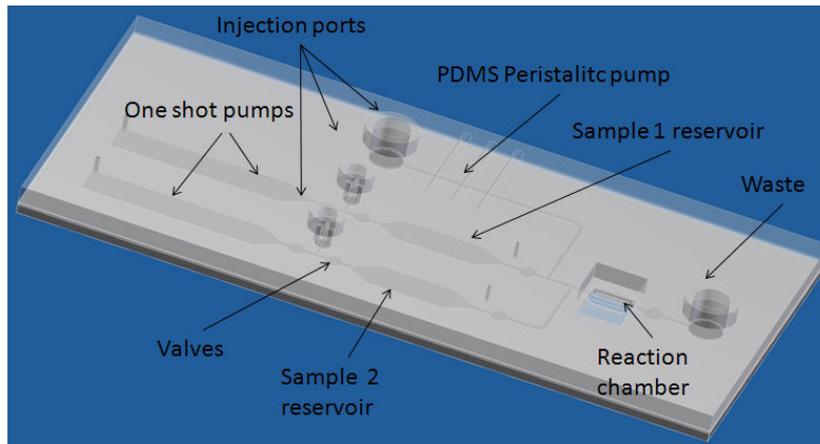


figura 5.3: Schema complessivo del *layer* microfluidico

5.3 Tecniche di fabbricazione

In questo paragrafo, dopo una breve panoramica sui materiali e sulle tecniche utilizzati, viene descritta la realizzazione della micro-pompa peristaltica. Essa è considerata una buona scelta per effettuare cicli di lavaggio dei *reservoir*. Infatti è facile da integrare con il resto dello strato microfluidico, richiede una bassa pressione di attuazione (<25 psi), è relativamente veloce e richiede tecniche di fabbricazione a basso costo. Le altre pompe introdotte precedentemente sono invece utilizzate per il dosaggio preciso di piccole quantità di fluido, ad esempio per la somministrazione del campione di sangue.

5.3.1 Multilayer soft-lithography

La micro-pompa è stata realizzata usando la tecnica della *multilayer soft-lithography*, attraverso cui è possibile progettare diversi componenti attivi di un circuito fluidico. Un esempio è dato dalle valvole che si formano all'intersezione tra due canali perpendicolari tra loro; la figura 5.4 mostra la più semplice tra le possibili configurazioni: quando viene applicata una pressione nel canale superiore, la membrana tra i due canali si flette e il flusso nel canale sottostante viene ridotto o completamente bloccato [5.10].

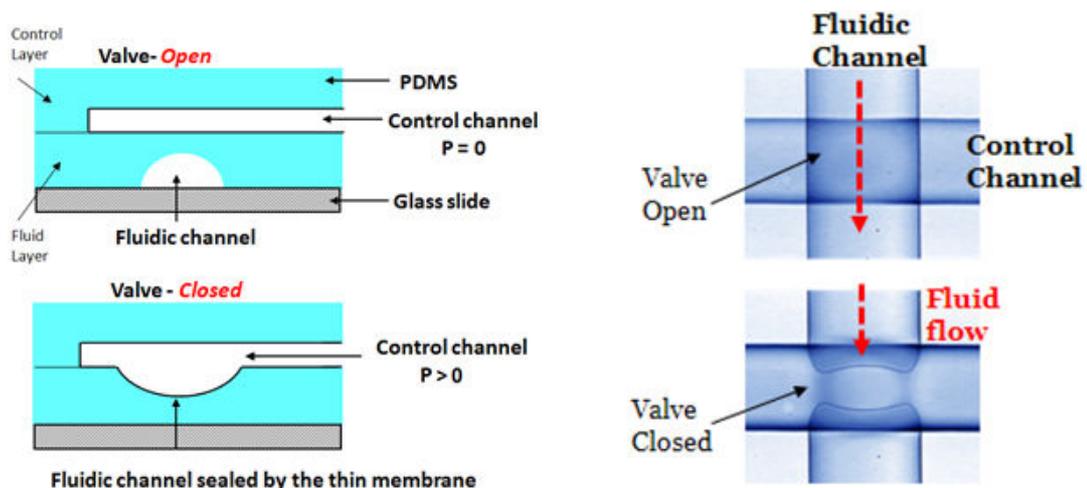


figura 5.4: Schema di funzionamento della valvola creata all'intersezione tra due canali microfluidici.

Questo particolare tipo di struttura può essere fabbricato tramite *step* multipli di *soft-lithography*, già descritta nel capitolo 3. Questa tecnica richiede un *master* creato tramite litografia e uno stampo elastomerico ottenuto tramite *casting* del polimero sul *master* [5.11] [5.12].

I primi ad introdurre la tecnica della *multilayer soft-lithography* sono stati Unger ed il suo gruppo di ricerca [5.13]. Questa tecnica è un'estensione del protocollo di *soft-lithography*, combinato con la capacità di unire due o più *layer* di elastomero. Per lo sviluppo di un chip sono necessari due stampi elastomerici: uno per lo strato inferiore con il canale fluidico ed uno per quello superiore con i canali di controllo.

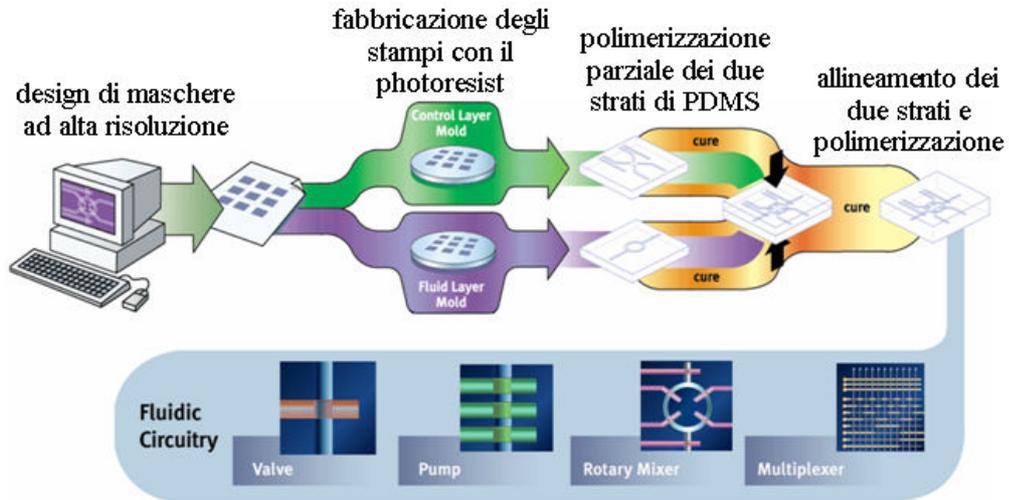


figura 5.5: Processo di *multilayer soft-lithography*.

La creazione del design nei singoli *layer* richiede la preparazione di stampi separati ottenuti tramite litografia standard. Essa permette di trasferire la geometria desiderata su un substrato (vetro o silicio) utilizzando un *mask-aligner*, la luce UV e un materiale fotosensibile chiamato *photoresist* [5.12]. La maschera sulla quale è disegnata la geometria è solitamente un vetrino su cui è depositato un sottile strato di cromo (per risoluzioni di pochi micrometri) oppure una stampa su foglio lucido. I *photoresist* sono polimeri che, una volta esposti alla luce UV, polimerizzano. Esistono due tipi di *photoresist*: in quelli positivi la radiazione rompe i legami rendendo il *resist* più solubile, in quelli negativi invece la radiazione fa polimerizzare il materiale. Dopo che il *photoresist* è stato sciacquato nella sua soluzione di sviluppo il disegno desiderato affiora e l'elastomero può essere versato nello stampo e cotto. Questo processo è portato avanti separatamente per i singoli strati: il polimero viene fatto polimerizzare solo parzialmente e poi i diversi *layer* sono uniti per ottenere un'unica struttura.

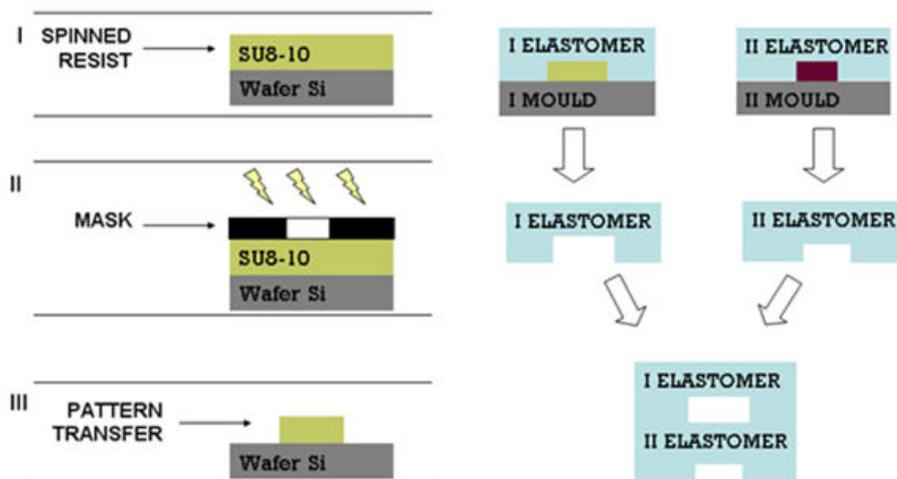


figura 5.6: Schema delle fasi di litografia seguita da *casting* e polimerizzazione.

L'elastomero (solitamente PDMS) è composto da due componenti da mischiare: l'agente reticolante (A) e la base dell'elastomero (B). Il polimero viene preparato in modo che quello utilizzato per la parte inferiore abbia un eccesso di componente B, mentre quello dello strato superiore abbia un eccesso di componente A. I due strati vengono cotti per pochi minuti in modo da raggiungere una polimerizzazione parziale, poi lo strato inferiore viene tolto dallo stampo e montato sopra quello superiore. Dato che la composizione delle due parti è diversa, sulla superficie rimangono delle molecole reattive; la successiva fase di cottura permette di legare in modo irreversibile i due strati in una struttura monolitica 3D in cui la zona d'interfaccia ha le stesse caratteristiche della parte *bulk* [5.13].

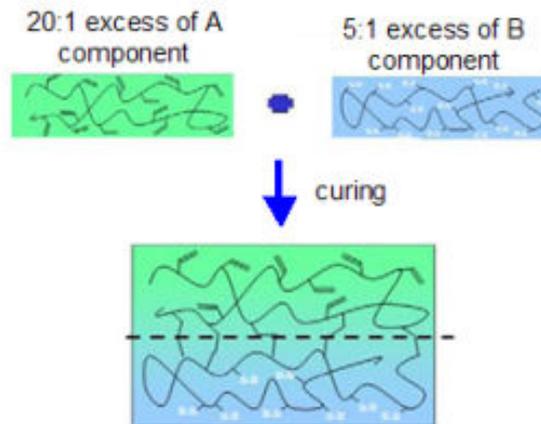


figura 5.7: Processo di unione dei due layer; la differenza di composizione permette la completa unione dei due strati.

La *multilayer soft-lithography* permette di sviluppare canali, valvole on-off, pompe, mixer e multiplexer di dimensioni micrometriche interamente composti da diversi strati di elastomero. L'area attiva della valvola è ampia quanto i canali; questo permette di eliminare i volumi morti e di attuare anche dispositivi di area molto piccola. Inoltre, grazie all'elasticità della membrana, la valvola si chiude proporzionalmente alla pressione applicata ed è possibile raggiungere una chiusura completa anche in presenza di particolato. Le piccole dimensioni rendono le valvole veloci e l'elasticità le rende durature nel tempo. Infine, se paragonate alle valvole realizzate tramite la classica lavorazione basata su silicio, il più grande vantaggio risiede nella facilità di produzione [5.13].

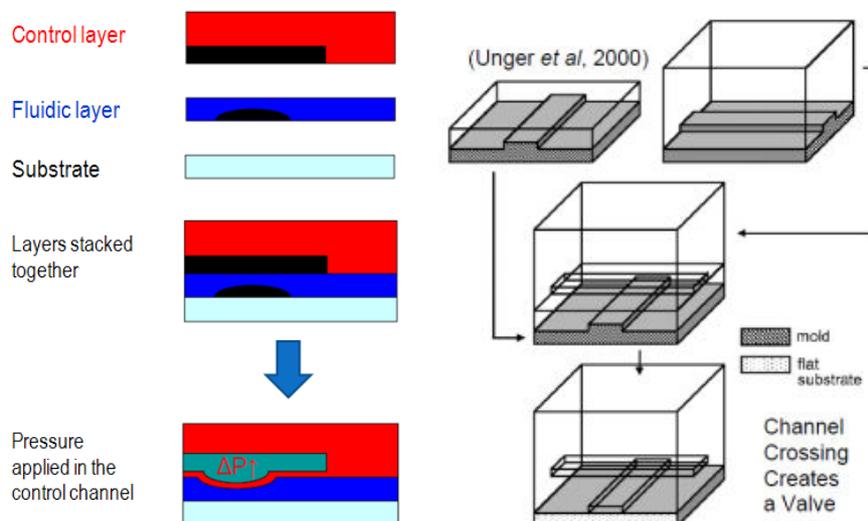


figura 5.8: Schema di realizzazione della valvola e il primo prototipo realizzato da Unger [5.13].

5.3.2 Materiali

- **Fotoresist negativo:** il fotoresist utilizzato è il SU-8[®] della MICROCHEM[®] [5.14]. Esso è progettato sia per applicazioni microelettroniche che per applicazioni di *micromachining* ed è in grado di realizzare film di spessore compreso tra 1 μm e 250 μm . Il fotoresist si presenta come un fluido altamente viscoso e trasparente e la parte del film che viene esposta ai raggi UV subisce un effetto di *cross-linking* che la rende insolubile nella sostanza di sviluppo. Il suo impiego è indicato in applicazioni in cui le parti esposte debbano rimanere anche in tutti i passi successivi della microfabbricazione; pertanto questo fotoresist si adatta perfettamente alle tecniche di *soft-lithography*, dove può essere utilizzato come master del processo di *printing*.
- **Sviluppo:** il *Developer* SU-8[®] è un acido fornito dalla MICROCHEM[®] per lo sviluppo del fotoresist. Questo sviluppatore agisce a temperatura ambiente per un periodo che dipende dallo spessore di fotoresist depositato e dal livello di agitazione durante lo sviluppo;
- **PDMS:** il Polidimetilsilossano (Sylgard[®] 184, Dow Corning [5.15]) è un polimero organico a base siliconica particolarmente adatto alla micro-fabbricazione, avendo un costo relativamente basso e tecniche di preparazione facili e rapide [16] [5.17]. Il PDMS è stato uno dei primi polimeri ad essere utilizzato per la fabbricazione di micro-canali [5.18] in quanto riesce a garantire un margine di errore inferiore 0.1 μm rispetto alle misure progettuali; ciò è dovuto essenzialmente all'esiguo ritiro volumetrico che avviene durante la reticolazione del polimero. È trasparente e quindi è utile in applicazioni dove sia necessaria un'osservazione dei fluidi al microscopio. È inoltre un materiale *soft* e flessibile (Modulo di Young \approx 1MPa), biocompatibile e non citotossico, il che lo rende un'ottima scelta in ambito biomedico.

CHARACTERISTIC	VALUE
COLOR	CLEAR
DIELECTRIC CONSTANT (at 100 kHz)	2.65
DISSIPATION FACTOR (at 100 Hz)	0.0005
DYNAMIC VISCOSITY	3900 Centipoise
DUROMETER	50 Shore A
HEAT CURE	10 min at 150 °C
HEAT CURE	20 min at 125 °C
HEAT CURE	45 min at 100 °C
MIX RATIO	10:1 BASE TO CATALYST
ROOM TEMPERATURE CURE	48 HOURS
SELF LEVELLING	
SHELF LIFE	720 DAYS
SPECIFIC GRAVITY AT 25 °C	1.03
TEMPERATURE RANGE	-45 °C TO 200 °C
THERMAL CONDUCTIVITY	0.18 W/m ²

figura 5.9: Tabella riassuntiva delle proprietà del PDMS Sylgard[®] 184.

5.3.3 Fabbricazione della micro-pompa peristaltica

Per realizzare gli elementi attivi (valvole e pompe) all'interno di dispositivi elastomerici in PDMS viene usata la tecnica della *multilayer soft-lithography*, descritta per esteso nel paragrafo precedente. Innanzitutto sono stati fabbricati due strati polimerici contenenti dei

canali (il canale fluidico dove scorre il fluido e i canali di controllo dove passa l'aria). I due strati sono poi stati sovrapposti in modo da formare delle intersezioni che costituiscono le valvole. Quando la pressione nel canale superiore è aumentata, immettendo aria o acqua, la membrana che separa i due strati si flette e chiude il canale inferiore, bloccando il flusso al suo interno. La membrana ritorna poi in posizione di riposo in modo passivo una volta rimossa la pressione, grazie alle proprietà elastomeriche del materiale. In questo modo la singola valvola permette di aprire/chiedere il canale sottostante. Posizionando tre valvole in serie si realizza una pompa peristaltica, il cui schema è mostrato nella figura 5.10.

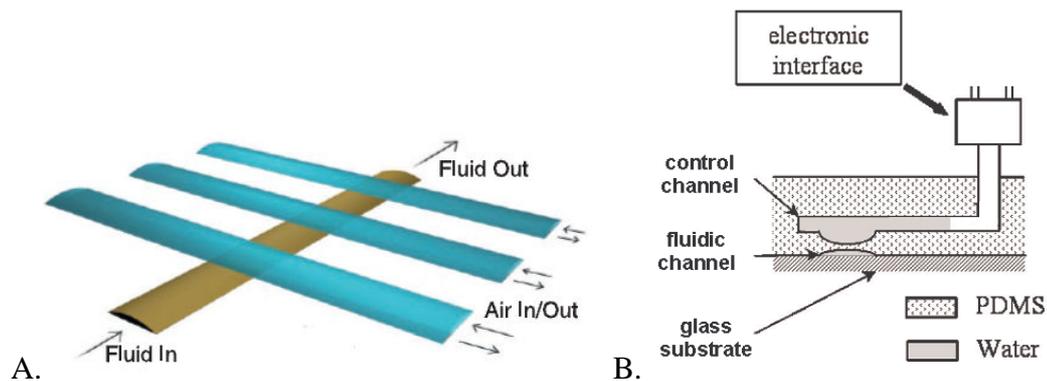


figura 5.10: A. Sketch della pompa peristaltica [5.13]; B. vista in sezione che illustra il funzionamento di una singola valvola [5.19].

La prima fase della fabbricazione è il disegno di maschere litografiche ad alta risoluzione, che riproducono il design dei canali. Il *layer* di controllo è composto da tre canali di 300 μm equamente distanziati di 1 mm [5.19], mentre lo strato fluidico contiene un unico canale. Al fine di ottenere la migliore configurazione per ottimizzare la portata, la larghezza del canale fluidico è stata variata tra 200 μm e 500 μm . Le *mold* (stampi) sono state realizzate tramite un fotoresist negativo (SU-8 10 e SU-8 50, MicroChem Corp.). Attraverso il processo di *spin-coating*, il fotoresist è stato distribuito su un wafer di silicio con uno spessore di 30 μm e 40 μm , rispettivamente per i canali di controllo e fluidico. Lo spessore di SU-8 depositato determina l'altezza dei canali da realizzare. L'altezza dei canali è stata scelta in modo da mantenere un rapporto 1:10 tra altezza e larghezza, per evitare che il canale collassi per la pressione applicata. In un secondo tempo è stato realizzato un prototipo alternativo variando le dimensioni dei canali al fine di aumentare la portata complessiva; le dimensioni dei due prototipi sono riassunte nella tabella seguente.

Strato fluidico	Primo prototipo	Secondo prototipo
Larghezza canale	300 μm	1 mm
Altezza canale	30 μm	100 μm
Spessore membrana	30 μm	45 μm
Strato di controllo		
Larghezza canale	400 μm	1 mm
Altezza canale	40 μm	100 μm

figura 5.11: Tabella riassuntiva delle dimensioni delle micro-pompe realizzate.

A questo punto il fotoresist è stato esposto alla luce UV tramite un *mask-aligner*; le maschere litografiche disegnate sono state interposte tra i wafer e la luce, in modo da riprodurre sul fotoresist il disegno scelto. Successivamente il wafer è stato immerso nella soluzione di sviluppo in modo da eliminare la parte di fotoresist non polimerizzato e portare alla luce lo stampo 3D. A questo punto le *mold* sono pronte ed è necessario riprodurre il negativo del

design con il polimero. Mentre veniva preparato il PDMS, una piccola quantità di trimethylchlorosilane (TMCS) è stata lasciata evaporare sugli stampi per alcuni minuti, in modo da facilitare il successivo distacco tra il wafer e il polimero. Il PDMS è stato preparato mischiando l'elastomero base e l'agente reticolante con due rapporti diversi per i due strati, infatti questa differenza permette l'adesione dei due strati tramite la tecnica della *multilayer soft-lithography*. Un mix a concentrazione 5:1 è stato versato sulla *mask* di controllo, posta in una *petri-dish*, per ottenere uno strato di 5 mm di spessore. Un mix 20:1 è stato depositato tramite *spin-coating* sulla *mask* fluidica a 2000 rpm per 40s, per ottenere un film di spessore 30 μm , che costituisce la membrana tra i due *layer*.

I due strati sono stati messi in forno ad 80°C separatamente per 16 minuti, in modo da produrre una polimerizzazione parziale, una volta tolti dal forno sono stati ricavati i fori di ingresso e di uscita dei canali e poi i due strati sono stati allineati e fatti combaciare sotto microscopio ottico. Il singolo chip così ottenuto è stato successivamente posto in forno a 80°C per 3 ore per permettere di completare la polimerizzazione.

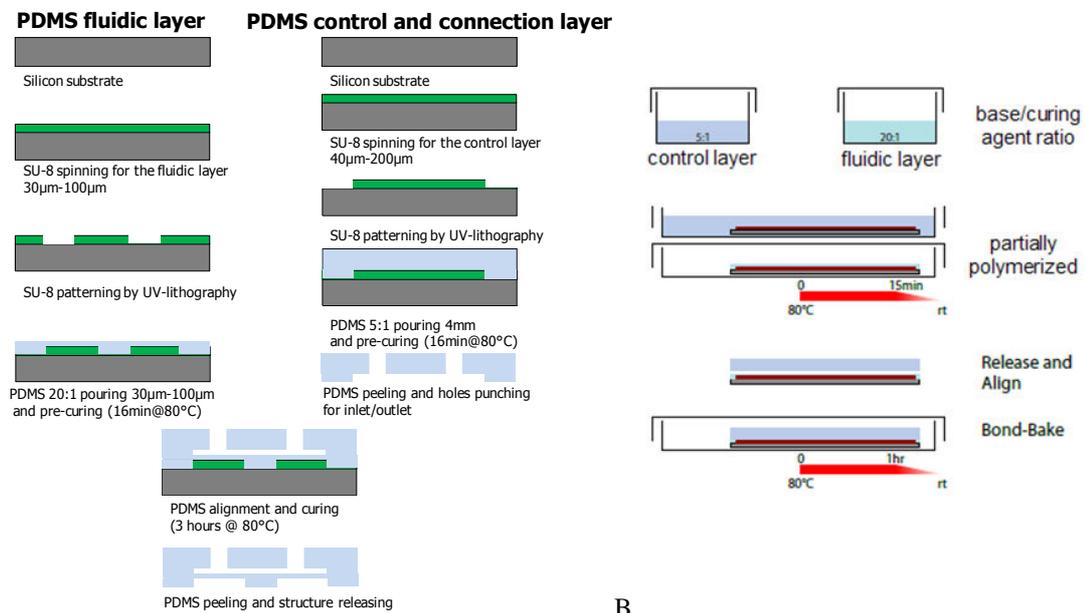


figura 5.12: Schema del metodo di fabbricazione dei due strati; B. procedura per permettere l'adesione tra i due strati.

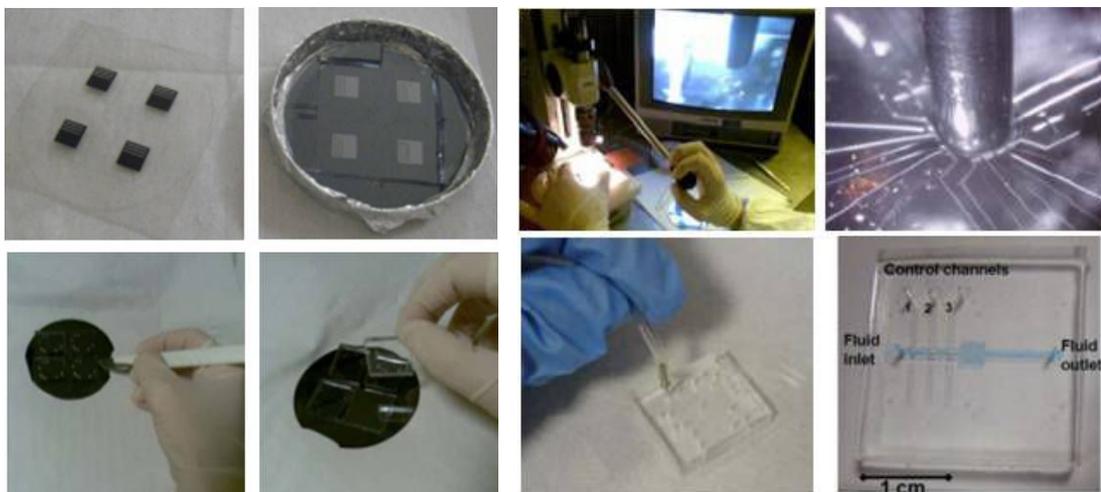
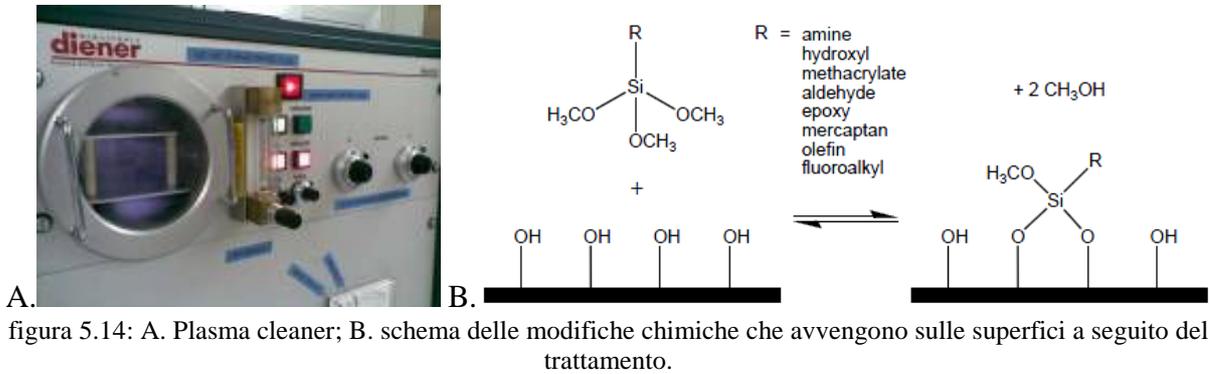


figura 5.13: Passaggi successivi della realizzazione della micro-pompa.

Alla fine del processo il chip fluidico è stato attaccato ad un vetrino tramite *plasma-cleaning*. Le superfici da unire vengono esposte al plasma (ad ossigeno o ad aria), in questo modo le unità $\text{O-Si(CH}_3)_2$ del PDMS espongono gruppi silano (-OH) e la superficie diventa altamente idrofila. I gruppi silano formano dei legami covalenti Si-O-Si con la superficie del vetro creando un'adesione permanente quando i due strati vengono portati a contatto [5.20] (figura 5.14).



La figura 5.15 mostra un'immagine della micro-pompa realizzata, ottenuta tramite un ingrandimento al microscopio ottico. Nel particolare è possibile distinguere il canale fluidico (orizzontale), i canali di controllo (verticali) ed un ingrandimento delle tre valvole in serie.

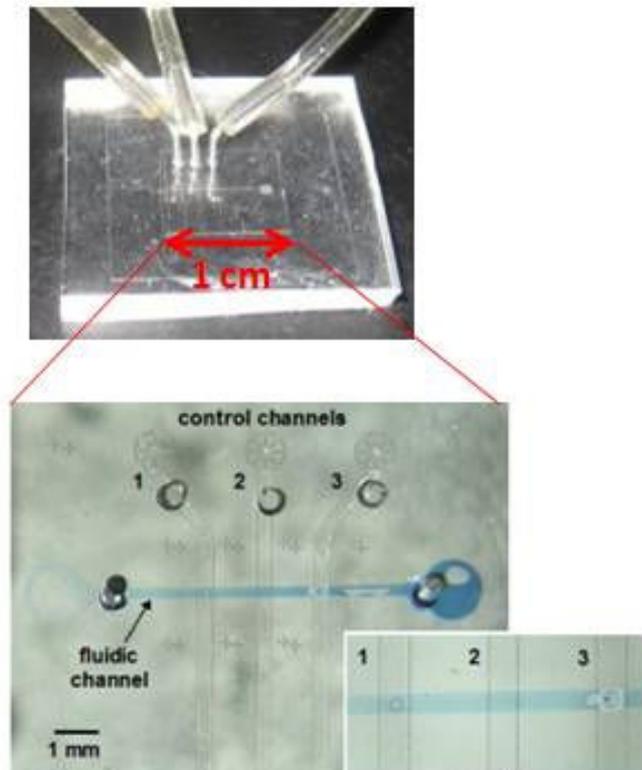
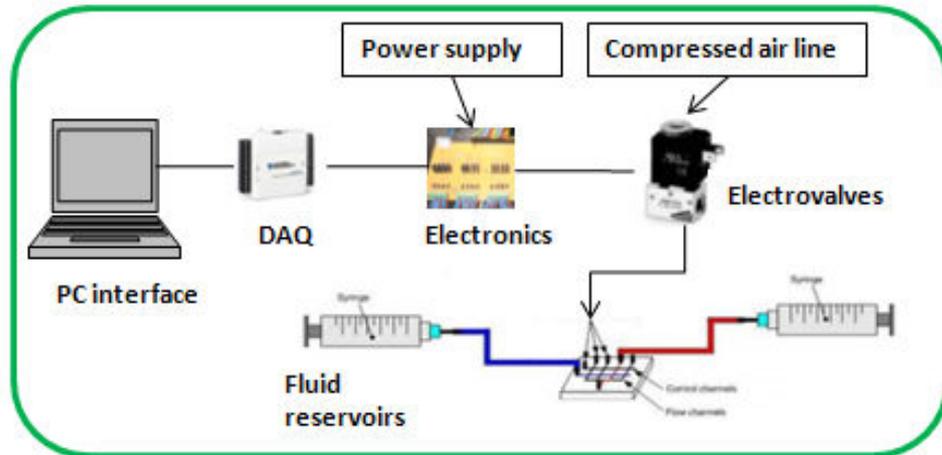


figura 5.15: Micro-pompa peristaltica in PDMS e particolare dei canali al microscopio ottico.

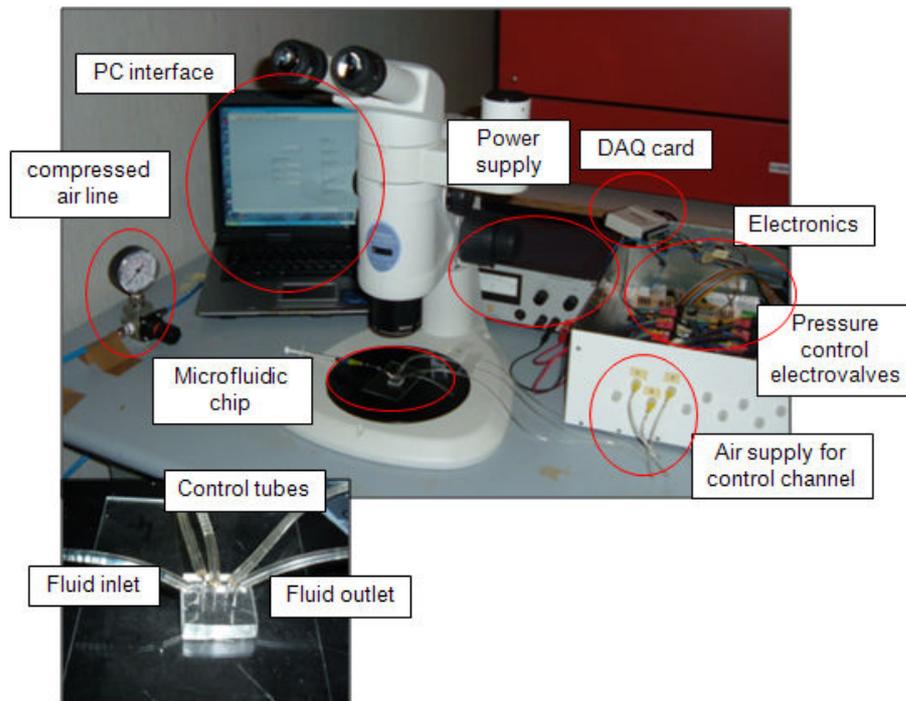
5.4 Test sperimentali e verifica dei risultati

Le prestazioni della micro-pompa sono state testate con un *test-bench* appositamente realizzato; in figura 5.16 è mostrato lo schema del *set-up* ed una foto effettuata durante i test di portata.

Al fine di testare il dispositivo, la pompa è stata collegata alla linea dell'aria compressa. I canali di controllo sono stati collegati, tramite piccoli tubi in Tygon[®] (diametro interno =0.5 mm), a elettrovalvole a solenoide (Camozi, A331-1C2), che regolano la pressione dell'aria. La parte terminale dei canali di controllo è stata riempita con olio, per evitare la formazione di bolle d'aria all'interno dei canali, dato che il PDMS è permeabile ai gas. Le elettrovalvole sono controllate da un PC tramite un'interfaccia Labview ed una scheda di acquisizione (National Instruments[®]). Questo permette di controllare l'apertura delle valvole, che vengono chiuse progressivamente una dopo l'altra per creare un'onda peristaltica che spinge il fluido nel canale sottostante. La portata è stata calcolata seguendo lo spostamento del menisco del fluido all'interno di un tubo di diametro noto connesso in uscita al canale fluidico.



A.



B.

figura 5.16: A. Schema del banco di prova; B. foto del sistema sperimentale scattata durante i test.

Sono state testate diverse micro-pompe aventi canali fluidici di larghezza tra 200 μm e 500 μm . Nei canali di controllo è stata imposta una pressione di 15 psi (300= Kpa). La pressione imposta è stata scelta dopo una sessione di prove dedicata in cui essa è stata variata tra 0 e 50 psi, mantenendo costanti gli altri parametri. I test hanno dimostrato che una pressione minore di 10 psi non è sufficiente a far deflettere la membrana, mentre valori superiori ai 20 psi creano una forza eccessiva che aumenta il tempo di ritardo necessario alla membrana per

ritornare passivamente nella posizione iniziale di canale aperto. La frequenza rappresenta l'inverso del tempo di ritardo tra due passi successivi del ciclo peristaltico ed è stata variata nei test tra 1 e 2 Hz. Nella figura 5.17 è mostrato il grafico delle portate in funzione della frequenza per una micro-pompa avente un canale fluidico largo $300\ \mu\text{m}$.

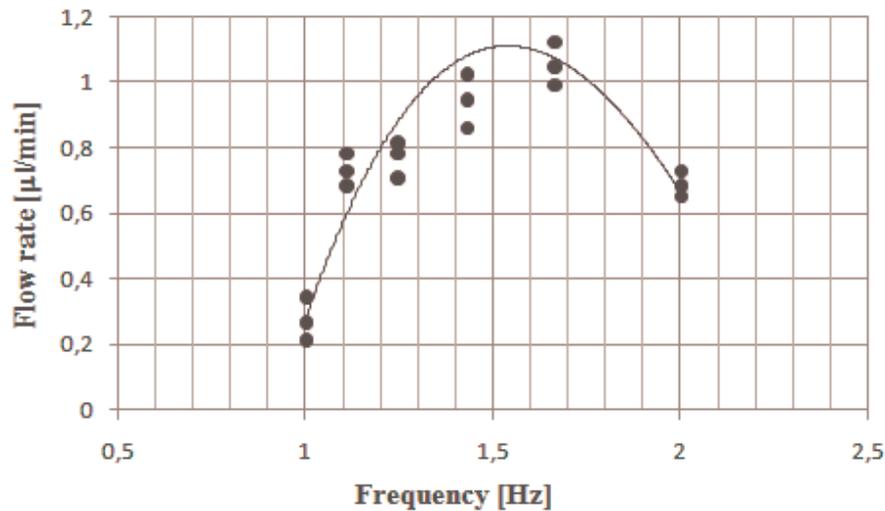


figura 5.17: Grafico della portata in funzione della frequenza per una pompa con canale fluidico di $300\ \mu\text{m}$.

È possibile notare che la portata aumenta con la frequenza fino ad un valore di $1,7\ \text{Hz}$, per poi decrescere. Una possibile spiegazione di questo fenomeno è la seguente: all'aumentare della frequenza il fluido viene espulso dal canale più frequentemente, quindi la portata aumenta; oltre un certo valore soglia, che varia in base al design dei canali, questo fenomeno non si verifica più perché la membrana tra i due strati presenta un certo ritardo nell'apertura e chiusura dei canali, dovuta alla natura elastomerica del materiale utilizzato. In queste condizioni un aumento della frequenza, imposto dalle elettrovalvole, non si traduce in una maggiore velocità della pompa, perché questa non riesce a seguire in tempo reale il sistema di controllo. La portata quindi, dopo aver raggiunto un valore massimo di $1,1\ \mu\text{l}/\text{min}$, comincia a decrescere. Il dispositivo è stato sottoposto a milioni di cicli senza notare nessun tipo di rottura o diminuzione delle prestazioni. La natura elastomerica del materiale lo rende infatti poco soggetto a rotture strutturali. Al fine di aumentare ulteriormente la portata, dato che l'applicazione finale richiede un valore attorno ai $5\text{-}10\ \mu\text{l}/\text{min}$, il secondo prototipo realizzato presenta canali più grandi sia in larghezza sia in altezza.

Il prototipo finale, avente un canale di larghezza $1\ \text{mm}$ e altezza $100\ \mu\text{m}$, è stato utilizzato per dei test di funzionalità del dispositivo completo. La micro-pompa è stata incollata tramite *plasma-bonding* sopra al chip nel quale si trovano i pozzetti funzionalizzati con gli attameri ed il sensore ottico SPAD. Nel canale fluidico è stata creata una camera nella quale si accumula il liquido, in corrispondenza dei pozzetti. Un raggio laser, ad opportuna frequenza, è focalizzato sopra al sensore. Quando il fluido passa all'interno della camera fluidica le proteine presenti si legano agli attameri nei pozzetti; attraverso l'analisi a fluorescenza il sensore rileva il numero di proteine legate. I test hanno mirato soprattutto a valutare l'efficacia della pompa che si è dimostrata efficiente nel regolare il passaggio di fluido all'interno del canale.

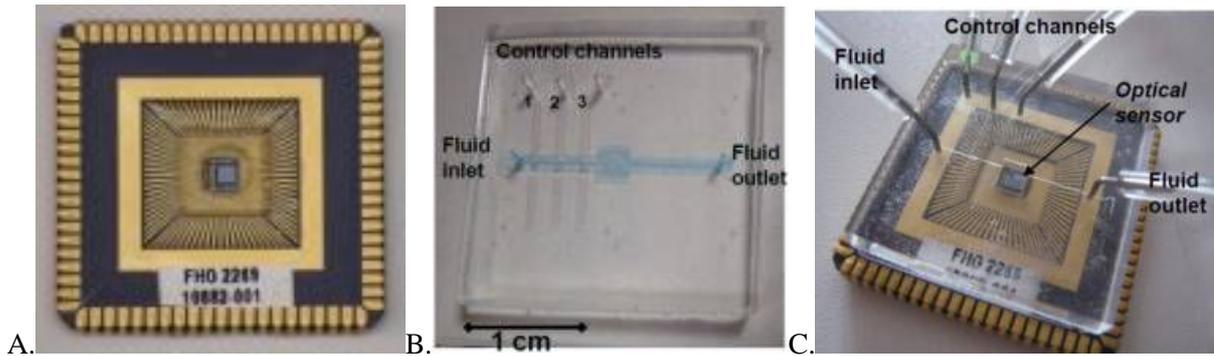


figura 5.18: A. Sensore ottico SPAD; B. micro-pompa peristaltica; C. dispositivo completo.

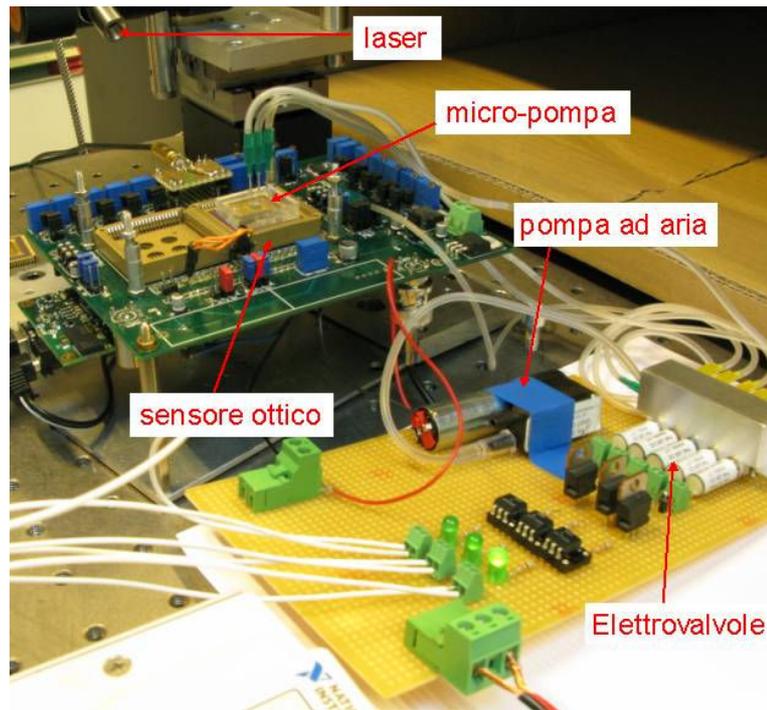


figura 5.19: Banco di prova per i test a fluorescenza sulla micro-pompa.

La micro-pompa peristaltica è stata testata anche con il sangue, che ha una viscosità molto più alta di quella dell'acqua ed è composto da una parte fluida e da una corpuscolare. Nonostante queste caratteristiche la micro-pompa è stata in grado di spingere il fluido all'interno dei canali senza né ridurre la portata né ostruire i canali. In figura 5.20 sono mostrate le immagini di queste prove sperimentali. Nelle due foto è possibile riconoscere due passi successivi del ciclo peristaltico: nella prima i tre canali di controllo sono tutti chiusi, nella seconda solo il primo è chiuso, mentre gli altri sono aperti.

Non è stato necessario pre-trattare la superficie dei canali con nessuna sostanza per favorire il passaggio del sangue e successivamente i canali sono stati puliti con cicli di lavaggio in acqua.

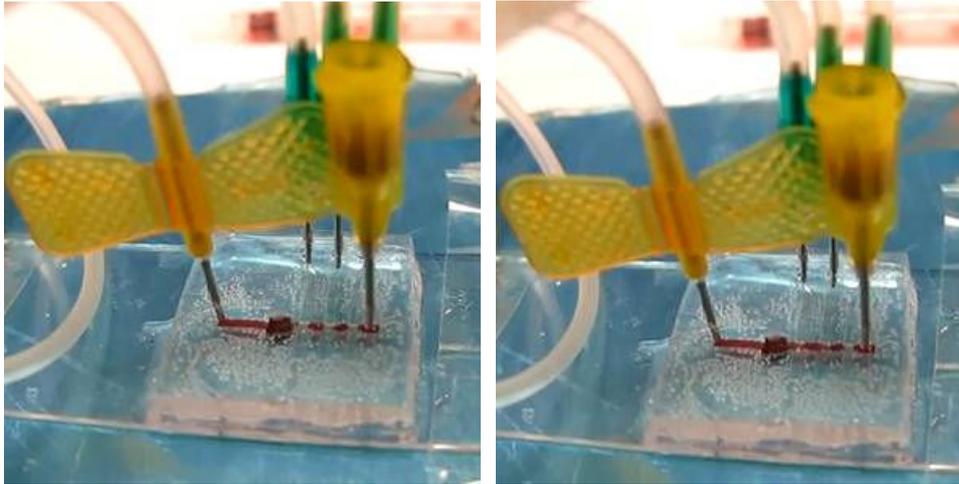


figura 5.20: Prove sperimentali del passaggio di sangue nella micro-pompa, la due immagini mostrano due istanti successivi del ciclo peristaltico.

5.5 Conclusioni

Questo capitolo ha mostrato la realizzazione di un dispositivo per la gestione dei fluidi biologici. La struttura è stata realizzata tramite metodi di micro-fabbricazione dei polimeri, sfruttando le loro proprietà di elasticità e facilità di manipolazione. In particolare è stata sfruttata la tecnica della *multilayer soft-lithography*, che permette di creare strutture 3D complesse partendo da processi litografici 2D tradizionali.

La gestione di fluidi nel micro-dominio non è banale, in quanto le proprietà fluidiche cambiano drasticamente, soprattutto per quanto riguarda il tipo di moto, la velocità ecc. La struttura realizzata rientra nei sistemi *lab-on-chip*, cioè strutture create tramite micro-fabbricazione, che hanno la capacità di gestire flussi di piccole dimensioni. La micro-pompa peristaltica realizzata ha dimostrato di essere biocompatibile con il sangue e di poter controllare in maniera precisa l'attuazione di quantità di fluidi dell'ordine di pochi microlitri. La sua semplice metodologia di fabbricazione permette di integrare la micro-pompa in sistemi microfluidici complessi e di essere utilizzata anche in combinazione ad altri tipi di dispositivi come sensori o sistemi di analisi.

Quello presentato è un esempio di come le tecniche di fabbricazione non solo possano migliorare le prestazioni di alcuni dispositivi, ma addirittura creare la possibilità di realizzare sistemi con capacità completamente diverse da quelli in scala macrometrica. Infatti l'uso dei polimeri permette di creare strutture deformabili e le piccole dimensioni permettono di sfruttare proprietà dei fluidi (ad esempio flusso laminare) e dei materiali (ad esempio elasticità e lavorabilità) che non sono applicabili a sistemi macro.

Bibliografia V

- [5.1] Buselli E, Castrataro P, Morganti E, Collini C, Lorenzelli L, Menciasci A 2010 Development of a PDMS peristaltic micropump for micro analysis systems in protein assays *Secondo Congresso Nazionale di Bioingegneria (GNB)* Torino 8-10 luglio
- [5.2] Morganti E, Buselli E, Collini C, Menciasci A, Lorenzelli L 2011 Design and fabrication of microfluidic actuators towards microanalysis systems for bioaffinity assays *Microelectronic Engineering* in press
- [5.3] Whitesides G M 2006 The origins and the future of microfluidics *Nature* **442** 368-373
- [5.4] Squires T M and Quake S R 2005 Microfluidics: fluid physics at the nanoliter scale *Reviews of modern physics* **77** 977-1026
- [5.5] McDonald J C and Whitesides G M 2002 Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices *Accounts Chem. Res.* **35** 491-499
- [5.6] Pearce T M and Williams J C 2007 Microtechnology: meet neurobiology *Lab on a Chip* **7** 30-40
- [5.7] El-Ali J L, Sorger P K and Jensen K F 2006 Cell on Chip *Nature* **442** 403-411
- [5.8] <http://naomi.science.unitn.it>
- [5.9] Iverson B D and Garimella S V 2008 Recent Advances in Microscale Pumping Technologies: A Review and Evaluation *Microfluidics and Nanofluidics* **5** 145-174
- [5.10] Melin J and Quake S 2007 Microfluidic Large-scale integration: the evolution of design rules for biological automation *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36** 213-31
- [5.11] Weibel D B and Whitesides G M 2006 Applications of microfluidics in chemical biology *Current Opinion in Chemical Biology* **10** 584-591
- [5.12] Madou M J 2001 Fundamentals of Microfabrication *CRC Press LLC*
- [5.13] Unger M A, Chou H P, Thorsen T, Scherer A and Quake S R 2000 Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography Report *Science* **288** 113-116
- [5.14] <http://www.microchem.com>
- [5.15] <http://www.dowcorning.com>
- [16] Soper S A, Ford S M, Qi S, McCarley R L, Kelly K and Murphy M C 2000 Polymeric microelectromechanical systems *Anal. Chem.* **72** 642A-651A
- [5.17] Becker H and Gartner C 2000 Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications *Electrophoresis* **21** 12-26
- [5.18] McDonald J C, Duffy D C, Anderson J R, Chiu D T, Wu H, Schueller O J A and Whitesides G M 2000 Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) *Electrophoresis* **21** 27-40
- [5.19] Goulpeau J, Troughet D, Adjari A and Tabeling P 2005 Experimental study and modeling of polydimethylsiloxane peristaltic micropumps *Journal of Applied Physics* **98** 044914
- [5.20] Hong S M, Kim S H, Kim J H and Hwang H I 2006 Hydrophilic Surface Modification of PDMS Using Atmospheric RF Plasma *Journal of Physics: Conference Series (International MEMS Conference)* **34** 656-661

Capitolo 6

Conclusioni: realizzazione di interfacce con sistemi biologici

Il presente lavoro di tesi ha preso in esame lo studio di tecnologie e materiali per la realizzazione di dispositivi miniaturizzati in ambito biomedico. In particolare sono state realizzate delle superfici di interfaccia tra sistemi biologici e artificiali, prendendo in considerazione diverse scale dimensionali, dal centimetro al micrometro. Per ognuna di esse sono stati studiati i problemi connessi alla progettazione, alla fabbricazione e all'interazione con gli elementi biologici. Al fine di sviluppare questo studio sono stati valutati, come sistemi esemplificativi delle varie problematiche, dei dispositivi che entrano in contatto con sostanze biologiche. Essi devono essere progettati e fabbricati in modo da garantire la sicurezza della parte trattata, unendo questa prerogativa con la capacità di creare strutture funzionanti dal punto di vista ingegneristico, che forniscano al dispositivo capacità di attuazione o sensorizzazione innovative. Lo studio prende in esame diversi dispositivi che variano in dimensione tra il centimetro e il micrometro; ognuno ha caratteristiche proprie e applicazioni diverse, ma tutte le strutture realizzate sono accomunate dalle caratteristiche descritte precedentemente.

Il primo esempio è relativo alla progettazione e realizzazione delle varie parti che compongono una capsula endoscopica robotica che deve interagire con il tratto gastrointestinale. In particolare sono stati realizzati i componenti meccanici che permettono il funzionamento del robot e la superficie che costituisce l'interfaccia diretta tra il tessuto e il dispositivo garantendo l'adeguata adesione tra le due superfici. Un altro esempio riguarda la realizzazione di strutture deformabili e sensorizzate per la coltura ed il monitoraggio di colture cellulari con l'obiettivo finale di produrre un sensore tattile bio-ibrido. Infine l'ultimo esempio riguarda un dispositivo inserito in un sistema *lab-on-chip* per l'attuazione e la gestione di fluidi biologici, che permetta di effettuare analisi su campioni di sangue e siero.

Per quanto riguarda l'interazione tra sistema artificiale e biologico la prima prerogativa riguarda la scelta di materiali che abbiano proprietà intrinseche di biocompatibilità. Innanzitutto sono stati selezionati polimeri biocompatibili, come ad esempio il PDMS, o metalli come il Nitinol già utilizzati in ambito medico. Allo stesso tempo è necessario anche evitare l'utilizzo di componenti, tecniche o metodi di pulizia che possano lasciare residui pericolosi per i sistemi biologici. Inoltre la superficie esterna del dispositivo deve essere strutturata in modo da garantire non solo la compatibilità biologica, che dipende dalla chimica del materiale, ma anche la compatibilità morfologica e funzionale in quanto la topologia della struttura favorisce la corretta interazione tra il materiale artificiale e quello biologico.

Al variare della scala dimensionale è necessario prendere in considerazione aspetti diversi nella scelta dei materiali o delle tecnologie di fabbricazione. Infatti un materiale, per essere impiegato con successo in una determinata applicazione, deve avere sia le proprietà fisiche e chimiche appropriate, sia le caratteristiche tecnologiche che consentono la trasformazione del materiale nel manufatto. Un esempio è dato dal primo caso preso in esame, cioè la realizzazione di una capsula endoscopica: per quanto riguarda i componenti della capsula è stato necessario ottenere parti resistenti, affidabili e facilmente assemblabili con i sensori ed i motori presenti, quindi la scelta del materiale è caduta sui metalli per le loro alte proprietà meccaniche; per quanto riguarda invece la superficie di interfaccia con il tessuto necessaria per gestire l'attrito con le pareti intestinali, la soluzione migliore è risultata essere l'utilizzo di

polimeri in quanto sono altamente biocompatibili, deformabili e garantiscono la totale assenza di danni alla parte biologica.

Per quanto riguarda le tecnologie, l'utilizzo di alcune macchine è limitato a certi intervalli dimensionali e non è possibile impiegare le apparecchiature sopra o sotto certi limiti. Ad esempio le macchine utensili a controllo numerico si sono rivelate essenziali, anche usate in combinazione tra loro, per la fabbricazione di componenti millimetrici 3D per la capsula endoscopica, tuttavia non hanno la capacità di lavorare pezzi micrometrici. D'altra parte le tecniche di litografia sono state fondamentali per la realizzazione delle membrane di interfaccia con il tessuto o con le colture cellulari, ma sono limitate a strutture 2D; in realtà con la tecnica litografica utilizzata per la micro-pompa peristaltica è stato possibile ottenere strutture 3D, ma solo come combinazione di diversi strati 2D. Inoltre è necessario tenere in considerazione che il massimo spessore realizzabile con le tecniche litografiche standard è di circa 250 μm , mentre le macchine utensili si spingono fino a dettagli poco sotto ai 500 μm , inseriti comunque in strutture di dimensioni maggiori. Queste considerazioni ci portano a capire quanto lo studio delle tecnologie di micro-fabbricazione nel *range* dimensionale che si trova a metà strada tra la macroscala e la microscala non sia banale e non possa essere trattato semplicemente come un'estensione delle tecniche classiche utilizzate nelle altre scale.

Nonostante le piccole dimensioni possano creare delle limitazioni, esse creano anche delle nuove possibilità, ad esempio gli attuatori creati tramite *soft-lithography* nel caso del dispositivo *lab-on-chip* non hanno equivalenti nella scala macroscopica. Infatti riprodurre gli stessi dispositivi nella macroscala non porterebbe nessun vantaggio, anzi, non sarebbe conveniente dal punto di vista dell'efficienza del dispositivo. Lo stesso vale per il sistema di monitoraggio cellulare: lo sviluppo di dispositivi ingegnerizzati di dimensioni paragonabili a quelle delle cellule permette di ricavare dati quantitativi e di studiare comportamenti osservabili in passato solo a livello qualitativo.

Infine è necessario ricordare come la natura sfrutti da sempre le leggi di scala, infatti le strutture naturali si sono evolute in modo da sfruttare al massimo le possibilità di ogni tipo di ambiente. La presenza di tecnologie di micro-fabbricazione ci permette oggi di comprendere molte strategie e di copiarle. Ad esempio la membrana superficiale per la gestione dell'attrito tra la capsula e le pareti intestinali è ispirata alle zampe degli animali: esse sono ricoperte da micro-strutture che sfruttano le proprietà tipiche della scala microscopica nella quale le forze superficiali predominano su quelle di massa. Quindi anche in questo caso le tecnologie ci permettono di sviluppare sistemi che non hanno equivalenti nel campo macroscopico.

Tutti i dispositivi trattati sono stati testati al fine di verificarne innanzitutto la bontà di fabbricazione e la rispondenza alle specifiche; inoltre sono stati esaminati il funzionamento effettivo e l'efficacia rispetto al compito per il quale sono stati creati. Infine è stata verificata la risposta del sistema biologico all'interazione con il dispositivo artificiale. Ad esempio, nel caso della superficie micro-strutturata della capsula è stato controllato che la membrana intestinale non fosse stata danneggiata, mentre nel caso delle colture cellulari è stata verificata la crescita e la riproduzione delle cellule al di sopra del substrato realizzato.

Questo lavoro di tesi ha quindi esaminato le tecnologie disponibili allo scopo di trovare le migliori strategie di fabbricazione per diversi dispositivi medici. Questo al fine di cercare il modo di sfruttare di volta in volta le peculiarità della scala dimensionale e dell'ambiente nel quale il dispositivo è inserito. Sono state presentate diverse problematiche, ognuna delle quali ha portato a sviluppare, in sinergia con altri contributi, dei dispositivi innovativi nel settore delle tecnologie biomediche. Nel corso dei diversi capitoli le varie soluzioni sono state sviluppate nel dettaglio e sono stati presentati numerosi spunti ed esempi che possono costituire delle linee guida per la realizzazione di dispositivi miniaturizzati in ambito medico.

Ognuno dei singoli strumenti sarà ulteriormente sviluppato e migliorato in base all'applicazione specifica, più in generale lo sviluppo di questo studio risiede nella futura miniaturizzazione delle diverse strutture e nella ricerca di nuove tecnologie che possano ulteriormente migliorare le capacità di fabbricazione e/o ottimizzare le procedure già esistenti.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare innanzitutto il professor Paolo Dario, la professoressa Arianna Menciassi e i Dott. Lucia Beccai e Pietro Valdastri per avermi seguito durante i tre anni di dottorato, dandomi un valido aiuto nella realizzazione di questo lavoro di tesi e, più in generale, per avermi introdotto alla ricerca scientifica e permesso di lavorare in una realtà stimolante come quella della Scuola Superiore Sant'Anna.

Desidero ringraziare tutto il laboratorio CRIM, adesso parte dell'Istituto di Biorobotica, della Scuola Superiore Sant'Anna, presso il quale ho svolto le mie ricerche e tutte le persone che hanno collaborato con me allo sviluppo dei dispositivi presentati. Ringrazio inoltre il laboratorio BioMEMS della Fondazione Bruno Kessler di Trento e il dipartimento di Ingegneria Chimica dell'università di Birmingham presso i quali sono state condotte alcune delle prove sperimentali.

Un grazie va anche ai nostri tecnici (Carlo, Nicodemo, Gabriele e Andrea), indispensabili per la realizzazione dei vari prototipi e per i numerosi consigli pratici.

Ricordo inoltre che le attività svolte in questo lavoro hanno fatto parte e sono state parzialmente finanziate dai seguenti progetti:

- OPTIMUS (OPTimization and validation of a Mobile capsUle for endoScopy), coordinato da IMC (Intelligent Microsystem Center, Korea);*
- VECTOR (Versatile Endoscopic Capsule for gastrointestinal TumOur Recognition and Therapy), FP6 European Project;*
- NAOMI (A NAno on MIcro approach to a multispectral analysis system for protein essays), supportato dalla Provincia Autonoma di Trento;*
- NANOBIO TOUCH (Nano-resolved multi-scale investigations of human tactile sensations and tissue engineered nanobiosensors), FP7 European Project.*

Un affettuoso ringraziamento va a tutti coloro che studiano e lavorano al Polo Sant'Anna Valdera, per aver condiviso con me giornate di studio e lavoro, ma anche momenti di svago e divertimento.

Infine il Grazie più grande va alla mia famiglia e a tutte le persone che mi sono state vicine in questi tre lunghi anni di studio e di vita, per il sostegno e l'affetto ricevuti.