



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

FACOLTA' DI INGEGNERIA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE E DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Progettazione e analisi numerica di un dispositivo microfluidico per la
focalizzazione di vescicole extracellulari**

Relatore:

Prof. Ing. Michele Conti

Candidata:

Valentina Dibenedetto

Matricola: 522298

Correlatori:

Ing. Francesco Ferrara

Prof. Ing. Marco Donato De Tullio

A.A. 2024/2025

Abstract

Le vescicole extracellulari (VEs) sono particelle di dimensioni comprese tra pochi nanometri e alcuni micrometri, rilasciate dalle cellule nell'ambiente extracellulare. Grazie alla loro capacità di trasportare molecole bioattive e di riflettere lo stato fisiologico della cellula di origine, rappresentano biomarcatori di crescente interesse in ambito diagnostico e terapeutico. Tuttavia, il loro isolamento e la loro manipolazione risultano ancora complessi, richiedendo tecniche efficienti, rapide e scalabili. [1]

In questo scenario si inserisce la microfluidica, disciplina che studia la manipolazione di volumi estremamente ridotti di fluido, tipicamente compresi tra 10^{-6} e 10^{-12} litri, all'interno di microcanali con dimensioni dell'ordine delle decine o centinaia di micrometri. Tale tecnologia consente di operare con quantità minime di campione e reagenti, garantendo al contempo elevata sensibilità e risoluzione nelle operazioni di separazione e analisi, oltre a tempi di processo ridotti e costi contenuti. [2]

All'interno di questo ambito, i dispositivi Lab-on-a-Chip (LOC) rappresentano una soluzione particolarmente promettente per l'integrazione di funzioni di separazione, manipolazione e analisi su scala micro e nanometrica. In particolare, gli approcci passivi basati sulla microfluidica inerziale sfruttano l'interazione tra effetti viscosi e inerziali del fluido in regime di Reynolds intermedio, generando forze idrodinamiche che inducono fenomeni di migrazione laterale e focalizzazione delle particelle. Ciò consente di ottenere processi di separazione continui ed efficienti senza l'utilizzo di campi esterni applicati. [2]

Alla luce di queste considerazioni, il presente lavoro di tesi è stato condotto in collaborazione con il CNR NANOTEC di Lecce, il Politecnico di Bari e l'Università degli Studi di Pavia e si propone di progettare un dispositivo Lab-on-a-Chip passivo per la focalizzazione di vescicole extracellulari. L'obiettivo è utilizzare le forze di sollevamento inerziale e l'influenza della geometria del microcanale per ottenere l'allineamento di particelle inizialmente distribuite in modo casuale lungo specifiche traiettorie di flusso, garantendo al contempo prestazioni elevate.

Lo studio è stato condotto mediante simulazioni fluidodinamiche numeriche, eseguite tramite *ANSYS Fluent*, al fine di analizzare il comportamento delle particelle all'interno del dispositivo e individuare le condizioni operative più favorevoli alla focalizzazione. Il modello

tridimensionale del LOC è stato sviluppato mediante ambiente CAD (Fusion 360®, Autodesk®) e utilizzato per valutare e ottimizzare le prestazioni fluidodinamiche del sistema. In particolare, sono stati analizzati i profili di velocità del fluido, la distribuzione delle particelle e le interazioni fluido-particella, al fine di ottenere una caratterizzazione completa del comportamento dinamico del dispositivo.

I risultati numerici evidenziano che la formazione dei flussi secondari è strettamente legata alla presenza di curvature nel microcanale, con una progressiva attenuazione nei tratti rettilinei. La curvatura induce inoltre una redistribuzione del campo di velocità, con uno spostamento del suo massimo verso la parete esterna e la generazione di gradienti di pressione responsabili delle forze trasversali agenti sulle particelle.

L'analisi della dinamica particellare mostra che il loro comportamento è governato dall'interazione tra forze di sollevamento inerziale e forze di Dean, la cui intensità aumenta con la portata. In particolare, è stata individuata una portata critica di focalizzazione compresa tra 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, oltre la quale si osserva una transizione da una distribuzione dispersa a un allineamento stabile delle particelle. Invece, nel range 200–500 $\mu\text{L}/\text{min}$, l'intensificazione dei vortici di Dean favorisce la migrazione laterale e la focalizzazione delle particelle in prossimità della parete esterna del canale. Inoltre, l'aumento della portata comporta una riduzione del numero di loop necessari per il raggiungimento della focalizzazione, evidenziando una diminuzione della lunghezza caratteristica del processo.

A seguito della validazione numerica preliminare, la configurazione ottimizzata è stata realizzata mediante microfresatura (Minitex Mini-Mill/GX), utilizzando il G-code generato a partire dal modello CAD.

Dall'analisi dei dati è emerso un limite significativo dello studio rappresentato dall'assenza di una validazione sperimentale del dispositivo, che non consente di confermare in modo definitivo le prestazioni di separazione ottenute numericamente.

Le simulazioni, sebbene coerenti con i principi della microfluidica inerziale, non sono sufficienti a descrivere completamente il comportamento reale del sistema in condizioni operative.

Pertanto, i risultati ottenuti devono essere considerati come una valutazione numerica preliminare della configurazione proposta, e non come una dimostrazione sperimentale delle prestazioni del dispositivo.

In questa prospettiva, futuri sviluppi dovranno includere una validazione sperimentale sistematica e un confronto diretto con i risultati numerici, al fine di verificare l'efficacia della soluzione proposta e consolidare le potenziali applicazioni.

Indice

Introduzione	1
Capitolo 1: Le Vescicole Extracellulari	3
1.1 Caratteristiche delle VEs	3
1.1.1 Biogenesi e sottopopolazioni delle VEs	3
1.1.2 Funzioni patologiche delle VEs	4
1.2 Tecniche di isolamento e purificazione delle particelle	5
1.2.1 Tecniche standard per l'isolamento di particelle	6
1.2.2 Tecniche LOC per l'isolamento di particelle	6
1.3 Microfluidica inerziale	7
1.4 Cross section trasversale	8
1.5 Effetto di Re del fluido sulla focalizzazione	10
1.6 Effetto del rapporto a/Dh sulla focalizzazione	11
1.7 Configurazioni dei canali per la microfluidica inerziale	12
1.7.1 Microcanale rettilineo	12
1.7.2 Microcanale a spirale	14
1.7.2.1 Effetto di De	17
1.7.3 Microcanale a serpentina.....	18
1.8 Conclusione sulle tecniche di separazione cellulare	21
1.9 Obiettivo.....	22
1.10 Assunzioni e limiti.....	22
Capitolo 2: Simulazioni computazionali per la progettazione del microdispositivo	25
2.1 Analisi computazionali per lo studio della microfluidica.....	25
2.1.1 Metodo dei Volumi Finiti per la soluzione numerica	26
2.2 Design del dispositivo: progettazione e ottimizzazione	29
2.3 Definizione del modello fisico del problema	30
2.3.1 Discrete Phase Model (DPM)	31
2.4 Generazione della mesh	33
2.4.1 Tipologie di mesh.....	34
2.4.2 Indipendenza della mesh	36
2.4.3 Studio di raffinamento della mesh.....	37
2.4.4 Convergenza della mesh.....	38

2.5 Risoluzione del sistema numerico.....	39
2.6 Risultati numerici dell'analisi fluidodinamica	40
2.7 Risultati del tracciamento particellare.....	43
Capitolo 3: Fabbricazione del dispositivo microfluidico	47
3.1 Validazione del dispositivo.....	49
3.2 Realizzazione e caratterizzazione dimensionale del dispositivo microfluidico	50
Capitolo 4: Conclusioni.....	56
Bibliografia.....	58

Indice delle figure

Figura 1: Struttura delle vescicole extracellulari.[3].....	3
Figura 2: Dimensione delle vescicole. [4].....	4
Figura 3: Comunicazione mediata dalle VEs nella progressione della malattia. [5]	5
Figura 4: Tecniche di isolamento standard. [1]	6
Figura 5: Struttura dei canali nella microfluidica inerziale. [7]	8
Figura 6: Disposizione delle particelle nei canali a sezione circolare.....	9
Figura 7: Disposizione delle particelle nei canali a sezione quadrata.....	9
Figura 8: Disposizione delle particelle nei canali a sezione rettangolare.	10
Figura 9: Focalizzazione nei canali con sezione rettangolare e quadrata con $a/D_h > 0.7$ al variare di Re. [11].....	11
Figura 10: Forze agenti su una particella di flusso in un canale rettilineo. [9]	13
Figura 11: Wall-induced lift force (a) Shear-gradient lift force (b). [9]	13
Figura 12: Lunghezza minima del canale per il focusing delle particelle. [6]	14
Figura 13: Profilo di velocità e posizioni di equilibrio per un canale rettilineo (a) e canale curvo (b). [9].....	15
Figura 14: Forze agenti sulla particella in un microcanale a spirale. [12]	16
Figura 15: Schema che illustra il comportamento del flusso a De basso(a) ed elevato (b). [12]	17
Figura 16: Sezione trasversale del microcanale a spirale rettangolare al variare di De . [12] ..	18
Figura 17: Relazione tra De critico e AR per canali a sezione rettangolare.....	18
Figura 18: Confronto delle prestazioni dei microcanali a serpentina con diverse geometrie per particelle da $3\ \mu\text{m}$, in un intervallo di flusso da 100 a 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ e con diametro idraulico costante di $62,2\ \mu\text{m}$. [10].....	20
Figura 19: Meccanismo di focalizzazione nelle tre zone del microcanale a zig-zag. [10]	20
Figura 20: Lab-on-chip realizzato.	29
Figura 21: Ingressi (a) Uscite (b)	29
Figura 22: Parametri definiti per il DPM.	32
Figura 23: <i>Physical Models</i> impostati.....	32
Figura 24: Geometria semplificata utilizzata per la mesh.....	34
Figura 25: Mesh strutturata(a) e mesh non strutturata (b).....	35

Figura 26: Mesh utilizzata per la simulazione.	36
Figura 27: Relazione tra lunghezza rappresentativa e velocità di uscita.....	38
Figura 28: Profili di velocità nelle sezioni trasversali del microcanale nel piano xz, a monte (a) e a valle (b) della curvatura, al variare della portata (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{L}/\text{min}$).....	40
Figura 29: Profili di velocità nelle sezioni del microcanale nel piano xy, al variare della portata (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{L}/\text{min}$). Le regioni rosse indicano zone caratterizzate da elevata velocità e quelle in blu zone a bassa velocità.	42
Figura 30 Profili di velocità sezione di outlet al variare della portata (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{L}/\text{min}$).	43
Figura 31: Forza di Lift e Forza di Dean al variare della portata volumetrica e della dimensione delle particelle.	44
Figura 32: Distribuzione delle particelle nei microcanali per diverse portate in ingresso: (a) 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, (b) 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, (c) 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, (d) 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, (e) 500 $\mu\text{L}/\text{min}$	45
Figura 33: Vista del microchip realizzato.....	47
Figura 34: Minitex Mini-Mill/GX (a) Posizionamento del pezzo sul piano della microfresatrice(b).	48
Figura 35: Polimetilmetacrilato (PMMA).....	49
Figura 36: Macchina a ultrasuoni utilizzata nella cleanroom.	50
Figura 37: Microscopio a fluorescenza Zeiss.....	50
Figura 38: Immagini al microscopio relative alla prima prova di fabbricazione del dispositivo.	51
Figura 39: Immagini al microscopio relative alla prova di fabbricazione con distanza intercanale pari a 500 μm	52
Figura 40: Immagini al microscopio relative alla prova di fabbricazione con larghezza del canale di 112 μm	53
Figura 41: Immagini al microscopio relative alla prova di fabbricazione con larghezza del canale di 113 μm	54
Figura 42: Immagini al microscopio relative alla prova di fabbricazione con larghezza del canale di 130 μm	55

Introduzione

La microfluidica studia il comportamento dei fluidi, con volumi compresi tra 10^{-6} e 10^{-12} litri, all'interno di canali dalle dimensioni micrometriche, solitamente comprese tra 1 μm e 1 mm. L'utilizzo di volumi di campione estremamente ridotti consente di limitare significativamente l'impiego di reagenti e sostanze chimiche, garantendo al contempo un controllo più accurato del flusso dei fluidi e delle interazioni che si instaurano tra di essi.

Questo ha rivoluzionato il campo della diagnostica e della ricerca, rendendo possibile lo svolgimento di analisi rapide e a basso costo, garantendo una maggiore portabilità e versatilità rispetto ai metodi tradizionali. [1]

La principale applicazione è la realizzazione di laboratori miniaturizzati integrati in un singolo chip, definiti Lab-on-a-Chip e noti come LOC, ottenuti mediante avanzate tecniche di microfabbricazione. Per la loro costruzione si impiegano materiali rigidi, tra cui silicio, vetro, quarzo, metalli e alcuni polimeri organici.

In questo contesto, una sfida cruciale riguarda lo sviluppo di chip rapidi, economici e facilmente riproducibili, obiettivo che il presente lavoro di tesi si propone di perseguire. In particolare, è stato progettato un LOC passivo il cui funzionamento sfrutta la geometria dei canali, gli effetti delle forze inerziali del fluido e la formazione di flussi secondari.[2]

Nonostante la scala ridotta, la validità dell'approssimazione di continuità permette di applicare i principi della meccanica dei fluidi allo studio dei dispositivi microfluidici. Tale approssimazione è particolarmente utile dal punto di vista computazionale, poiché consente di considerare i valori medi dei parametri che descrivono il moto del fluido, trascurando le complesse interazioni molecolari presenti nella formulazione completa delle equazioni di *Navier-Stokes*.

Il modello sviluppato non fa riferimento ad alcun LOC preesistente. Pertanto, dopo aver definito i parametri geometrici fondamentali, quali la forma del canale, le dimensioni complessive, la lunghezza e il numero di triangoli necessari si è proceduti alle simulazioni numeriche e alla fabbricazione in laboratorio.

I criteri adottati e il modello sviluppato verranno descritti nei capitoli successivi.

Il testo della tesi è così strutturato.

Il primo capitolo inizia con una breve introduzione sulle caratteristiche delle VEs, sulla loro classificazione in base alle dimensioni e sulle loro principali funzioni. Successivamente vengono presentate le tecniche di isolamento per le VEs, sia standard, sia tramite LOC. Infine, sono descritti i dispositivi LOC caratterizzati da differenti forme e geometrie.

Il secondo capitolo tratta lo studio numerico: dopo una breve introduzione alla storia della fluidodinamica computazionale, sono presentate le equazioni che governano la dinamica dei fluidi, e viene descritto il processo di meshing, con particolare attenzione alle caratteristiche della mesh utilizzata nel modello. Inoltre, si discutono i principali metodi numerici e si introduce il *Discrete Phase Model* (DPM). Infine, sono presentati i risultati dell'analisi numerica e la distribuzione delle particelle all'interno del dispositivo.

Il terzo capitolo presenta il processo di fabbricazione del dispositivo mediante fresatura, riportando il *setup* della macchina, i parametri operativi adottati e le caratteristiche del materiale impiegato. Sono inoltre riportate le procedure di pulizia del pezzo e le analisi mediante microscopio a fluorescenza, finalizzate alla valutazione della qualità e della precisione dei canali realizzati.

Il quarto capitolo riassume e discute le principali conclusioni del lavoro, evidenziando i risultati più significativi ottenuti. Viene inoltre valutata l'efficacia dei metodi adottati e vengono suggeriti possibili sviluppi futuri e miglioramenti delle procedure sperimentali e numeriche.

Capitolo 1: Le Vescicole Extracellulari

Le VEs sono una popolazione eterogenea di nano e microparticelle, delimitate da una membrana lipidica, di forma sferica e incapaci di replicarsi autonomamente (Figura 1). Svolgono un ruolo centrale nella comunicazione cellulare, agendo come veri e propri “messaggeri” tra cellule .[3]

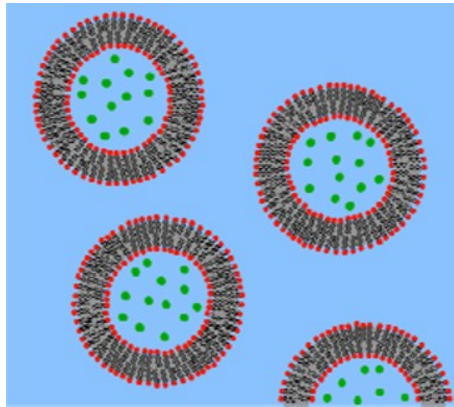


Figura 1: Struttura delle vescicole extracellulari.[3]

1.1 Caratteristiche delle VEs

Le VEs hanno principalmente la funzione di trasportare un'ampia gamma di molecole bioattive, tra le quali proteine, lipidi e acidi nucleici, come mRNA e microRNA, oltre ad altri componenti biologici funzionalmente rilevanti. Inoltre, la loro secrezione, comune a cellule stromali, parenchimali, immunitarie e tumorali, riflette lo stato funzionale della cellula di origine e avviene in modo selettivo verso specifiche cellule riceventi, sia nei tessuti adiacenti sia a distanza, permettendo alle VEs di veicolare segnali coinvolti sia nel mantenimento dell'omeostasi tissutale sia nell'insorgenza di processi patologici. [4]

1.1.1 Biogenesi e sottopopolazioni delle VEs

Le VEs comprendono diverse sottopopolazioni, che si distinguono per origine, dimensioni e composizione molecolare. L'analisi di tali differenze è fondamentale per comprendere la complessità dei meccanismi di comunicazione intercellulare mediati da queste strutture.

Le VEs sono secrete nello spazio extracellulare dalla maggior parte dei tipi cellulari e degli organismi, sia eucariotici sia procariotici, attraverso un processo evolutivamente conservato. La loro produzione da parte di molteplici cellule e tessuti ne consente il riscontro in numerosi

fluidi biologici, tra cui sangue, urina, saliva, latte materno, liquido amniotico, liquido cerebrospinale e liquido sinoviale, a conferma della loro ampia distribuzione e del ruolo rilevante nei processi fisiologici e patologici.

A oggi, sono stati identificati diversi sottogruppi di VEs, che, a livello di classificazione generale, possono essere distinti in tre categorie principali. Gli esosomi, con un diametro di circa 100 nm, si formano e vengono rilasciati attraverso il percorso endosomiale, mentre le microvescicole, più grandi e comprese tra 100 e 1000 nm, originano direttamente dalla membrana plasmatica di cellule vive. Infine, i corpi apoptotici rappresentano vescicole di dimensioni maggiori, comprese tra 1 e 5 μm , prodotte da cellule che sono in fase di morte programmata.

Le sottopopolazioni principali di questi tipi di vescicole sono sintetizzate nella [Figura 2](#):

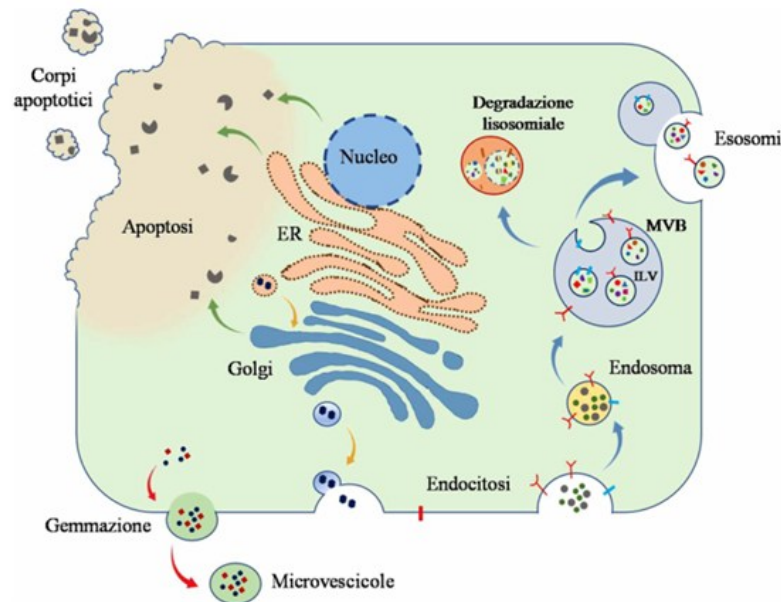


Figura 2: Dimensione delle vescicole. [4]

1.1.2 Funzioni patologiche delle VEs

Le VEs svolgono un ruolo rilevante nello sviluppo e nella progressione di numerose condizioni patologiche. In ambito oncologico, le cellule tumorali rilasciano VEs in quantità aumentate, le quali possono contribuire alla trasformazione delle cellule bersaglio, favorendo il passaggio da un fenotipo non maligno a uno maligno. Le VEs di origine tumorale contribuiscono inoltre alla progressione neoplastica attraverso il rimodellamento della matrice extracellulare, veicolando fattori di crescita, molecole di adesione cellulare e altre componenti bioattive capaci di modulare il microambiente tumorale. [5]

È stato evidenziato anche un coinvolgimento patologico delle VEs nelle malattie neurodegenerative, dove possono trasportare proteine tossiche verso i neuroni target, compromettendone la funzione. A supporto di questo coinvolgimento, diversi studi hanno riportato un aumento delle microvescicole (MV) di derivazione mieloide nel liquido cerebrospinale di pazienti affetti da malattia di Alzheimer o forme severe di sclerosi multipla, suggerendo un contributo attivo delle VEs nei processi neurodegenerativi e neuroinfiammatori (Figura 3).

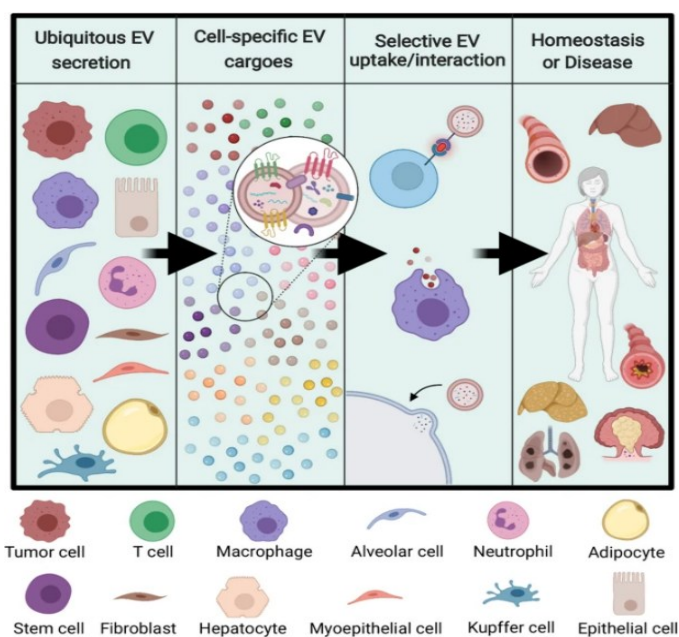


Figura 3: Comunicazione mediata dalle VEs nella progressione della malattia. [5]

1.2 Tecniche di isolamento e purificazione delle particelle

Per sfruttare le VEs come nuovi marcatori sono necessari metodi rapidi, affidabili, ad alto rendimento e applicabili su larga scala, in grado di garantire un isolamento, una rilevazione e una caratterizzazione efficace. Il loro isolamento rappresenta uno degli obiettivi centrali della ricerca attuale e costituisce il punto di partenza del presente studio, in quanto passaggio imprescindibile per la successiva analisi delle diverse sottopopolazioni vescicolari [4].

1.2.1 Tecniche standard per l'isolamento di particelle

Le VEs possono essere isolate utilizzando una varietà di metodologie, ciascuna delle quali può influenzare sia la quantità sia il tipo e la purezza delle vescicole ottenute. Ogni tecnica ha punti di forza e limiti specifici, perciò la scelta del metodo più adatto deve considerare diversi aspetti, come il tipo di campione iniziale, il suo volume, il livello di purezza richiesto e l'obiettivo dell'isolamento, che può essere di ricerca, diagnostico o terapeutico. [1]

Nella Figura 4 sono illustrate le strategie più diffuse per l'isolamento delle VEs.

Isolation Method	Isolation Principle	Advantages/Limitations
Differential centrifugation	EV separation based on particle density, size and shape	<ul style="list-style-type: none">- Commonly used; standardized; vesicle enrichment as pellet; EV subtypes isolation by density gradient centrifugation- Vesicle aggregation; protein and soluble factors contamination; low recovery; laborious
Polymer-based precipitation	EV precipitation using polymers altering solubility	<ul style="list-style-type: none">- Easy and inexpensive; high yield; effective with small amount of starting material; preservation of bioactivity- Co-precipitation of protein contaminants and polymeric materials; not suitable for large scale studies; long incubation times
Size-exclusion chromatography (SEC)	EV isolation by gel filtration chromatography based on size	<ul style="list-style-type: none">- Inexpensive; reproducible; high yield and purity; preservation of integrity and activity.- Specific equipment; not suitable for large scale studies; long run times.
Immunoaffinity capture-based techniques	EV immuno-purification using magnetic beads conjugated with antibodies direct toward specific EV surface markers	<ul style="list-style-type: none">- Sensitivity; specificity; high purity; EV subtypes isolation.- Expensive; antibody cross-reactivity; low yield

Figura 4: Tecniche di isolamento standard. [1]

1.2.2 Tecniche LOC per l'isolamento di particelle

Negli ultimi anni le tecnologie LOC si sono affermate come strumenti innovativi, capaci di integrare in un unico dispositivo funzioni complesse di separazione, rilevazione e analisi su scala micro e nanometrica.

Grazie alla loro elevata adattabilità, questi sistemi consentono di eseguire la separazione e frazionamento delle particelle sfruttando differenti parametri fisico-chimici, risultando strumenti versatili per applicazioni di analisi biologica e biochimica. [2]

Per ottenere le operazioni di isolamento e separazione, i LOC sfruttano diverse tecniche microfluidiche in grado di controllare e guidare il movimento delle particelle all'interno dei canali. In particolare, tali dispositivi utilizzano metodi di pompaggio attivi o passivi. Nel caso dei metodi attivi, vengono applicati campi esterni per generare forze che agiscono sulle

particelle presenti all'interno di un flusso uniforme; tra questi rientrano la dielectroforesi, l'acustoforesi, la magnetoforesi e l'utilizzo di pinze ottiche.

Nonostante tali approcci consentano un controllo molto preciso del movimento delle particelle, la loro applicabilità è spesso limitata da una produttività relativamente ridotta. Questo è dovuto al fatto che la forza esterna applicata richiede tempi significativi per vincere la resistenza idrodinamica che agisce sulle particelle.[6]

Al contrario, i meccanismi passivi permettono di manipolare le particelle sfruttando la geometria dei canali microfluidici e le forze idrodinamiche del flusso. Questi sistemi operano spesso con portate elevate, garantendo prestazioni più efficienti nel trattamento di grandi quantità di campione. In base ai principi di funzionamento, tali metodi possono essere suddivisi in diverse categorie, tra cui idroforesi, *pinched flow fractionation* (PFF), *deterministic lateral displacement* (DLD), approcci gravitazionali e microfluidica inerziale.

1.3 Microfluidica inerziale

La microfluidica inerziale si basa sull'uso degli effetti inerziali del fluido in un intervallo intermedio del numero di Reynolds, tipicamente compresi tra $1 < Re < 100$. In questo intervallo, sia gli effetti inerziali sia quelli viscosi risultano rilevanti e determinano la comparsa di forze idrodinamiche che agiscono sulle particelle sospese nel fluido. Tali forze inducono fenomeni di migrazione laterale e possono inoltre generare moti trasversali rispetto alla direzione principale del flusso, noti come flussi secondari.

Il numero di Reynolds (Re) è una grandezza adimensionale che esprime il rapporto tra le forze inerziali e quelle viscosi nel fluido ed è definito come:

$$Re = \frac{\rho U D_h}{\mu} \quad (1.1)$$

dove ρ è la densità del fluido, U la velocità media, D_h il diametro idraulico del canale e μ la viscosità del fluido.

La natura e l'intensità degli effetti inerziali dipendono dalla geometria del canale, che può assumere diverse configurazioni come illustrato in [Figura 5](#) e da ulteriori parametri discussi nelle sezioni successive. La combinazione di questi fattori definisce la configurazione del flusso

all'interno del microcanale, determinando la migrazione delle particelle verso specifiche posizioni di equilibrio o il loro intrappolamento in zone localizzate del flusso.

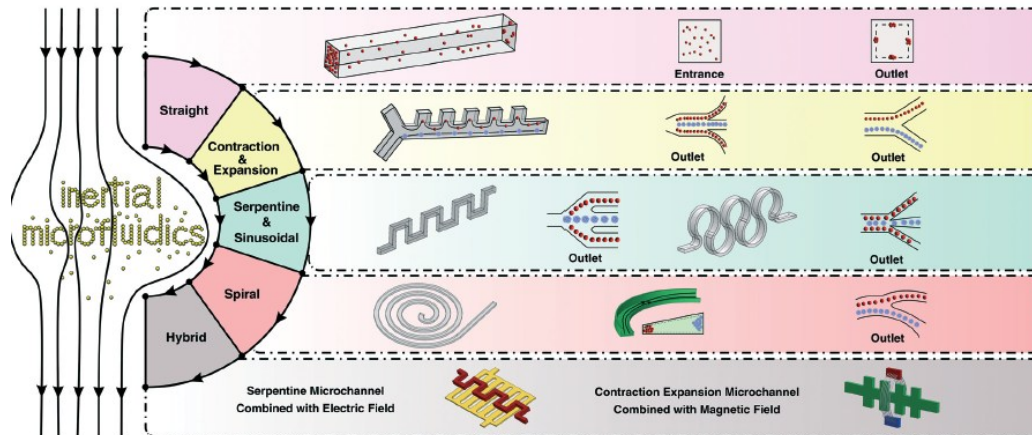


Figura 5: Struttura dei canali nella microfluidica inerziale. [7]

1.4 Cross section trasversale

La forma della sezione trasversale del microcanale determina il numero e la distribuzione delle posizioni di equilibrio delle particelle sospese. Le configurazioni più comuni sono la sezione quadrata, rettangolare e circolare. [7]

Nei microcanali rettilinei a sezione circolare sufficientemente lunga, le particelle trasportate da un flusso tendono a concentrarsi lungo un anello continuo posizionato a circa $0,6R$ dall'asse del canale, dove R è il raggio della sezione. (Figura 6).

Questo fenomeno, noto come *tubular pinch effect*, fu osservato per la prima volta da Segré e Silberberg, che studiarono particelle microscopiche a densità neutra immerse in un fluido viscoso all'interno di un tubo rettilineo a sezione circolare con $D_h = 1$ cm, dove per una sezione circolare il diametro idraulico coincide con il diametro del tubo.

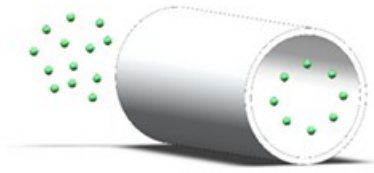


Figura 6: Disposizione delle particelle nei canali a sezione circolare.

Nei canali a sezione quadrata o rettangolare, la focalizzazione delle particelle avviene prevalentemente lungo le facce, mentre i vertici rimangono sfavoriti. Questo comportamento si verifica perché negli angoli la forza di sollevamento generata dalle pareti agisce contemporaneamente in due direzioni, producendo una posizione di equilibrio instabile per le particelle. [6]

In tali configurazioni, la disposizione delle particelle dipende dal rapporto di aspetto definito come il rapporto tra l'altezza e la larghezza del canale ($AR = H/W$), dal rapporto tra il diametro della particella e il diametro idraulico del canale (a/D_h) e dal numero di Reynolds. Il diametro idraulico D_h è definito come:

$$D_h = \frac{2WH}{W+H} \quad (1.2)$$

dove W e H rappresentano rispettivamente la larghezza e l'altezza del microcanale.

Nei canali a sezione quadrata, caratterizzati da $AR = 1$, la geometria angolare altera localmente i profili di velocità e pressione, inducendo la migrazione laterale delle particelle fino al raggiungimento di quattro posizioni di equilibrio, situate al centro di ciascuna parete (Figura 7).



Figura 7: Disposizione delle particelle nei canali a sezione quadrata.

I canali a sezione rettangolare sono caratterizzati da un lato lungo e uno corto; pertanto, AR può essere maggiore o minore di 1, influenzando la posizione di equilibrio delle particelle. In generale, le particelle si stabilizzano in due posizioni di equilibrio, localizzate al centro delle pareti più lunghe (Figura 8). Questa configurazione è determinata dall'asimmetria della sezione trasversale. Lungo la direzione del lato corto, il gradiente di velocità è elevato, con conseguente aumento dell'intensità della *shear-gradient lift force* e instabilità delle posizioni di equilibrio adiacenti a tali pareti. Lungo la direzione del lato lungo, invece, il gradiente di velocità è ridotto, consentendo un bilanciamento tra la *shear-gradient lift force* e la *wall-induced lift force*, che stabilizza le particelle al centro delle facce lunghe.



Figura 8: Disposizione delle particelle nei canali a sezione rettangolare.

1.5 Effetto di Re del fluido sulla focalizzazione

La distribuzione delle particelle è anche influenzata dal numero di Reynolds del fluido. Con l'aumentare di Re , fino a valori dell'ordine di circa 150, le particelle migrano dal centro verso le pareti del canale; al di sopra di questo intervallo aumenta il numero di posizioni di equilibrio stabili disponibili.

Nel caso di microcanali a sezione quadrata, per valori moderati del numero di Reynolds $5 \leq Re < 20$, le particelle inizialmente disperse migrano verso il perimetro della sezione, formando una banda sottile e continua. Aumentando ulteriormente il numero di Reynolds ($20 \leq Re \leq 100$), il sistema evolve verso una configurazione caratterizzata da otto posizioni di equilibrio stabili, distribuite simmetricamente lungo il perimetro della sezione. (Figura 9 (a)) [8]

Al contrario, nei microcanali a sezione rettangolare, pur osservandosi per $5 \leq Re < 20$ una tendenza simile alla migrazione dei canali quadrati, per $20 \leq Re \leq 100$ le particelle non

occupano più posizioni multiple distribuite, ma si concentrano lungo le pareti laterali più lunghe del canale. Questa differenza è attribuibile all'asimmetria geometrica della sezione, che altera il bilancio delle forze di sollevamento inerziale e modifica la stabilità delle posizioni di equilibrio. (Figura 9(b))

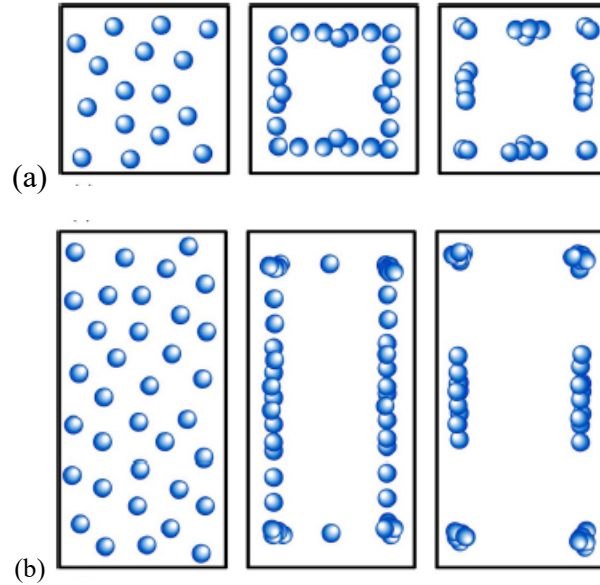


Figura 9: Focalizzazione nei canali con sezione rettangolare e quadrata con $a/D_h > 0.7$ al variare di Re . [11]

È stato individuato un numero di Re critico (Re_c) al di sotto del quale il numero di posizioni di equilibrio assunte dalle particelle sospese è minimo:

$$Re_c = 697 \left(\frac{AR}{k} \right)^{-0.79} \quad (1.3)$$

dove k è il rapporto tra il diametro della particella (assimilata a una sfera) e il lato minore della sezione del canale (tipicamente l'altezza H).

I range di validità sono: $4.5 \leq AR$, $k \leq 60$ e $5 \leq Re \leq 660$.

Quando $Re \gg Re_c$, il comportamento di migrazione delle particelle non è più prevedibile.

1.6 Effetto del rapporto a/D_h sulla focalizzazione

Il diametro delle particelle rappresenta un altro parametro determinante nella definizione delle posizioni di equilibrio delle particelle sospese. In condizioni in cui $a/D_h \ll 1$, la posizione di

focalizzazione tende a stabilizzarsi intorno a $x \sim 0,6H$. Al contrario, quando $a/D_h \sim 1$, il moto della particella è limitato da vincoli geometrici, che la confinano lungo la linea centrale del canale.

In generale, un elevato rapporto tra dimensioni della particella e la larghezza del canale favorisce una migrazione laterale più rapida, mentre per valori ridotti di a/D_h tale migrazione diventa meno significativa, fino a risultare trascurabile. Gli studi hanno evidenziato che il focusing inerziale si manifesta solamente quando il rapporto tra il diametro della particella e il diametro idraulico del canale soddisfa $a/D_h > 0,07$. [2]

1.7 Configurazioni dei canali per la microfluidica inerziale

La geometria dei canali gioca un ruolo determinante nel modulare le forze che agiscono sulle particelle sospese.

Canali rettilinei, a spirale e a serpentina rappresentano le configurazioni principali utilizzate nei dispositivi microfluidici, ciascuna in grado di generare regimi di flusso caratteristici e di guidare le particelle verso posizioni di equilibrio specifiche.

1.7.1 Microcanale rettilineo

Nei microcanali rettilinei, le particelle sospese nel fluido sono soggette a una forza di sollevamento inerziale che ne governa la migrazione laterale all'interno della sezione del canale.[9] Tale forza deriva dalla combinazione di due contributi (Figura 10): la *shear-gradient lift force* (F_{SG}) e la *wall-induced lift force* (F_{LW}), che possono essere espressi come segue:

$$F_{SG} \propto \frac{\rho U^2 a^3}{D_h} f_L (Re, x, y, AR) \quad (1.4)$$

$$F_{LW} \propto \frac{\rho U^2 a^6}{D_h^4} f_L (Re, x, y, AR) \quad (1.5)$$

dove f_L è un coefficiente che dipende dalla posizione della particella (x,y) nella sezione trasversale del canale, da Re e dal rapporto di aspetto AR .

Dai dati sperimentali è emerso che il coefficiente f_L decresce nelle regioni vicine alle pareti all'aumentare di Re , mentre aumenta avvicinandosi all'asse centrale del canale.[10]

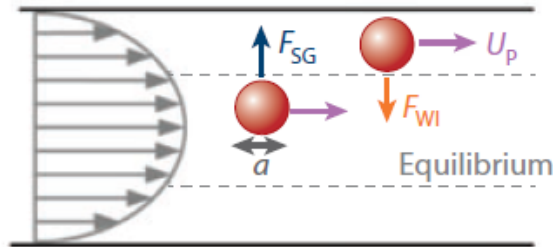


Figura 10: Forze agenti su una particella di flusso in un canale rettilineo. [9]

Nel regime tipico dei microcanali, il flusso è laminare ($Re \ll 2300$); di conseguenza il profilo di velocità assume un andamento parabolico, come descritto dalla soluzione di Hagen–Poiseuille, con velocità massima lungo l'asse del canale e valori progressivamente decrescenti verso le pareti. Questa distribuzione non uniforme della velocità genera un gradiente di taglio trasversale, responsabile dell'asimmetria delle velocità relative attorno alla particella.

In particolare, in prossimità della parete del microcanale, l'interazione idrodinamica tra particella e parete diventa predominante e il fluido genera la *wall-induced lift force*, che spinge la particella verso il centro (Figura 11(a)). Invece, il lato della particella più vicino alla parete è investito da un flusso con velocità inferiore rispetto al lato rivolto verso la regione centrale, determinando una differenza di pressione che dà origine alla *shear-gradient lift force* diretta verso la parete ((Figura 11(b)). A una certa distanza dall'asse, le due forze si bilanciano, stabilendo posizioni di equilibrio stabile.

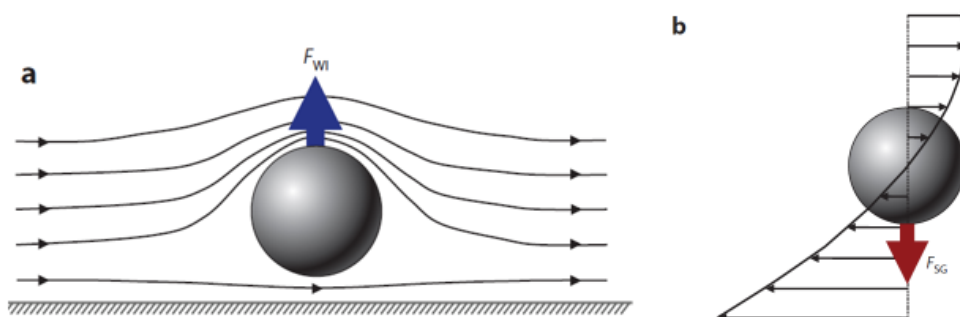


Figura 11: Wall-induced lift force (a) Shear-gradient lift force (b). [9]

Poiché entrambe le forze di sollevamento inerziale dipendono dal diametro della particella, è utile introdurre il numero di Reynolds particellare (Re_p), definito come:

$$Re_p = Re \frac{a_p^2}{D_h^2} = \frac{\rho U a_p^2}{\mu D_h} \quad (1.6)$$

Questo parametro include le caratteristiche dimensionali della particella e permette di prevedere il comportamento della focalizzazione.

In particolare, l'efficienza della focalizzazione inerziale risulta massima per $Re_p \geq 1$, poiché le forze inerziali diventano predominanti e il fenomeno di migrazione inerziale delle particelle si manifesta chiaramente. Al contrario, per valori più bassi di Re_p , le forze viscoso predominano su quelle inerziali, costringendo le particelle a seguire le linee di flusso del fluido. [6]

Per consentire alle particelle sospese nel fluido di migrare lateralmente e stabilizzarsi nelle posizioni di equilibrio, il microcanale deve avere una lunghezza minima (L_{min}) sufficiente affinché le forze inerziali inducano la migrazione e permettano il raggiungimento di tali posizioni (Figura 12).

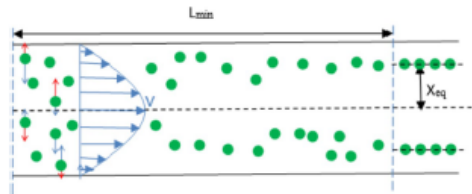


Figura 12: Lunghezza minima del canale per il focusing delle particelle. [6]

In particolare, la lunghezza di focalizzazione minima del canale può essere espressa come:

$$L_{min} = \frac{3\pi\mu D_h^3}{\rho U a_p^3} \quad (1.7)$$

dove μ è la viscosità dinamica del fluido, D_h il diametro idraulico del canale, ρ la densità del fluido, U la velocità media e a_p il diametro della particella.

1.7.2 Microcanale a spirale

L'introduzione della curvatura nei microcanali ha reso possibile una focalizzazione più efficiente, consentendo l'allineamento anche di particelle di diametro inferiore.

Come riportato dall'equazione (1.7), la lunghezza del canale necessaria per ottenere l'allineamento delle particelle aumenta al ridursi del loro diametro, rendendo i canali rettilinei poco compatibili con le limitazioni spaziali tipiche dei LOC, nei quali l'ottimizzazione dello spazio è fondamentale. [11]

Nei microcanali a spirale, i flussi secondari indotti dalla curvatura possono essere usati per accelerare la focalizzazione e ridurre la lunghezza necessaria, consentendo un controllo più accurato del trasporto e della manipolazione dei fluidi.

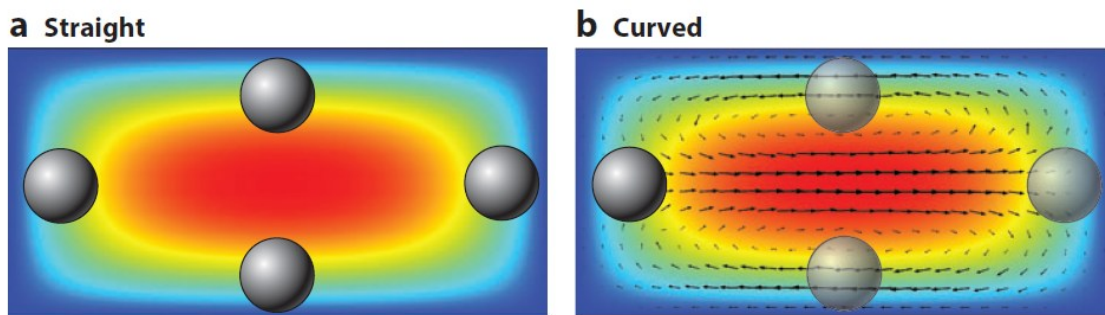


Figura 13: Profilo di velocità e posizioni di equilibrio per un canale rettilineo (a) e canale curvo (b). [9]

In tali canali, il fluido è vincolato a seguire la traiettoria imposta dalla geometria, generando un gradiente di pressione radiale tra la parete interna convessa e quella esterna concava della sezione trasversale. Tale fenomeno fu osservato per la prima volta da William Dean. [2]

Come discusso precedentemente, nei microcanali il flusso è caratterizzato da un profilo parabolico. In presenza di curvatura, l'azione della forza centrifuga perturba il profilo del flusso laminare primario, determinando uno spostamento del punto di massima velocità dal centro del canale verso la parete esterna. Questo determina la formazione di un gradiente di velocità tra il centro del flusso e le regioni vicine alla parete esterna, che induce un aumento del gradiente di pressione non completamente compensato dalla ridotta velocità del fluido in prossimità delle pareti.

Tale disequilibrio, noto come instabilità di Dean, causa la formazione di moti di ricircolazione trasversali, dando origine a strutture vorticali controrotanti, denominate vortici di Dean, che tendono a ristabilire l'equilibrio tra forze centrifughe e gradienti di pressione. (Figura 14)

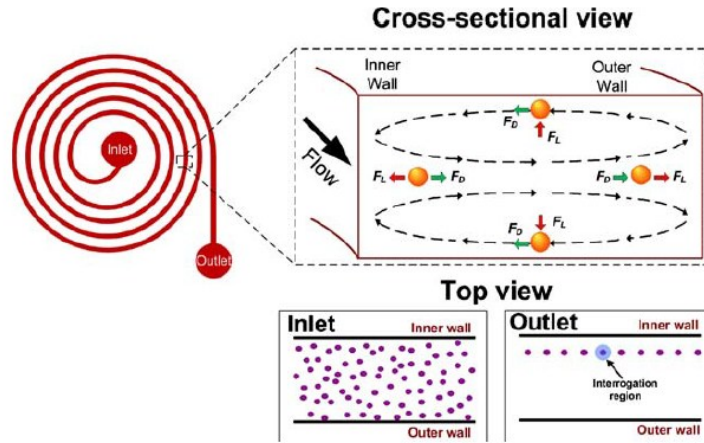


Figura 14: Forze agenti sulla particella in un microcanale a spirale. [12]

L'intensità del flusso di Dean viene quantificata mediante il numero di Dean (De), un numero adimensionale che misura la forza del flusso secondario, definito come:

$$De = Re \sqrt{\frac{D_h}{2R}} \quad (1.8)$$

dove Re è il numero di Reynolds, D_h il diametro idraulico del canale e R il raggio di curvatura.

Per un dato numero di Dean, la velocità media (U_{De}) della particella all'interno di un vortice è:

$$U_{De} = 1,84 \times 10^{-4} De^{1,63} \quad (1.9)$$

Di conseguenza, la forza di trascinamento dovuta ai vortici di Dean (F_D) esercitata sulle particelle può essere calcolata utilizzando la legge di Stokes come segue:

$$F_D = 3\pi\mu U_{Dean} a_p = 5,4 \times 10^{-4} \mu De^{1,63} a_p \quad (1.10)$$

Nei microcanali a spirale, la migrazione delle particelle è regolata dall'interazione combinata tra F_D e F_L , determinando la loro progressiva convergenza verso le posizioni di equilibrio stabili all'interno del flusso. L'intensità delle due forze è strettamente legata alle dimensioni delle particelle ($F_L \propto a_p^4$ e $F_D \propto a_p$) e alla velocità del flusso. Di conseguenza, la loro separazione può essere efficacemente regolata modulando le condizioni operative del microcanale. [10]

In regime dominato dalla forza di Dean, ossia quando il rapporto F_L/F_D tende a zero, le particelle di dimensioni significativamente inferiori al diametro idraulico del canale vengono convogliate

verso la parete esterna del condotto. Al contrario, qualora il rapporto tenda a infinito, la forza inerziale diviene predominante e guida le particelle di grandi dimensioni, comparabili al diametro idraulico del canale, lungo la parete interna del condotto curvo.

1.7.2.1 Effetto di De

Dall'equazione 1.9 si evince che un aumento di De caratterizza l'intensità del flusso di Dean, influenzando al contempo la sua configurazione. L'incremento del gradiente di pressione, e conseguentemente di De , è determinato dall'aumento della velocità del flusso, il quale può derivare da una riduzione del raggio di curvatura del canale, da un incremento del diametro idraulico o da un aumento della portata in ingresso, con conseguente aumento di Re (Figura 15).

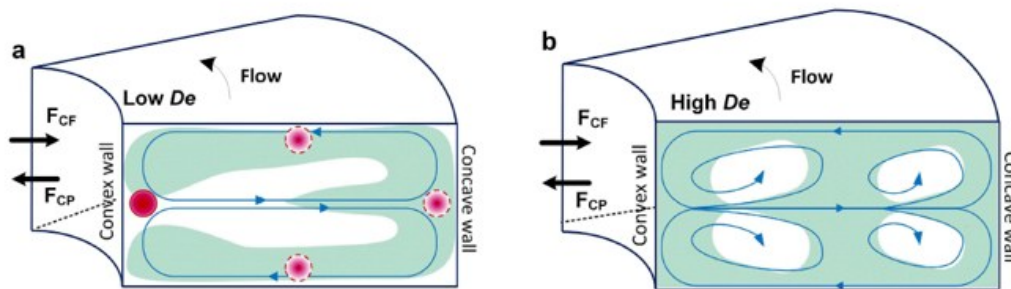


Figura 15: Schema che illustra il comportamento del flusso a De basso(a) ed elevato (b). [12]

È stato individuato un numero di Dean critico (De_c), che indica la condizione in cui la struttura del flusso secondario subisce una significativa riorganizzazione. Per valori di $De > De_c$, i vortici primari iniziano a subire instabilità, con conseguente insorgenza e sviluppo dei vortici secondari. In tale regime, il gradiente di pressione tra la regione di massima velocità e la parete concava cresce fino a superare la capacità dei vortici primari di mantenere l'equilibrio lungo l'intera sezione del canale. Ne consegue una frammentazione dei vortici primari e la formazione di nuove strutture vorticali secondarie deputate a ristabilire, seppur localmente, l'equilibrio parziale del sistema. Tale transizione comporta una riduzione dell'area occupata dai vortici primari e un ampliamento della regione dominata dai vortici secondari, come mostrato in Figura 16. [12]

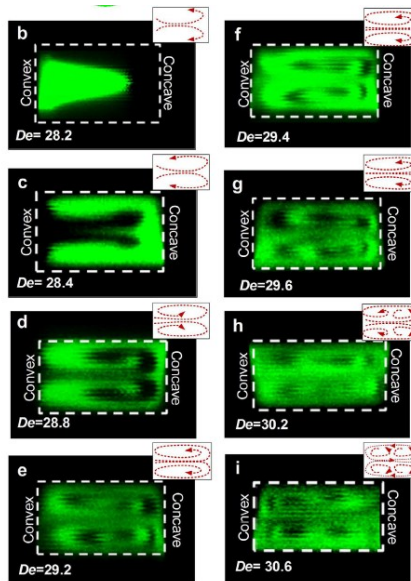


Figura 16: Sezione trasversale del microcanale a spirale rettangolare al variare di De . [12]

Diversi studi hanno mostrato che De_c è strettamente influenzato dal rapporto di aspetto del canale: all'aumentare di AR , De_c diminuisce secondo la relazione $De_c \propto AR^{-0,5}$, come mostrato in Figura 17. Di conseguenza, per la progettazione dei microcanali si prediligono sezioni rettangolari con un basso AR .

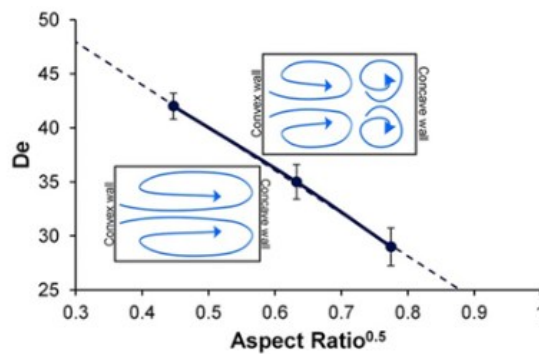


Figura 17: Relazione tra De critico e AR per canali a sezione rettangolare.

1.7.3 Microcanale a serpentina

Nei microcanali a serpentina, la variazione continua della direzione del flusso ad ogni loop genera forze secondarie trasversali che facilitano la focalizzazione. [13] Le posizioni di equilibrio assunte dalle particelle risultano fortemente dipendenti dal raggio di curvatura del canale, dalla portata volumetrica e dalle dimensioni delle particelle stesse, come descritto dalla relazione:

$$\frac{F_L}{F_D} \sim f_L \left(\frac{Re^2}{De^2} \right)^2 \left(\frac{a_p}{D_h} \right)^3 \quad (1.11)$$

dove Re è il numero di Reynolds, De il numero di Dean, a_p il diametro della particella e D_h il diametro idraulico del canale. Il termine f_L rappresenta un fattore correttivo legato alla forza di Lift, che può essere approssimato come: $f_L \sim \frac{1}{Re} \left(\frac{D_h}{a_p} \right)^2$.

I microcanali a serpentina possono essere progettati in configurazioni geometriche differenti, curvilinei simmetrici o asimmetrici, a onda quadra o a zig-zag, con angoli arrotondati o retti.

Dai risultati sperimentali, come mostrato in [Figura 18](#), si osserva che nei microcanali curvilinei, sia simmetrici o asimmetrici, le particelle risultano disperse lungo l'intero intervallo di portata, senza mostrare alcuna evidenza di focalizzazione. Il microcanale a onda quadra mostra un miglioramento parziale, mentre il canale a zig-zag con angoli arrotondati mantiene una distribuzione parzialmente dispersa delle particelle. [10]

Al contrario, il microcanale a zig-zag con angoli retti ottimizza la focalizzazione su tutte le portate. Sebbene a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ alcune particelle rimangono non allineate, per portate superiori a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ il flusso particellare risulta uniformemente concentrato, privo di dispersioni.

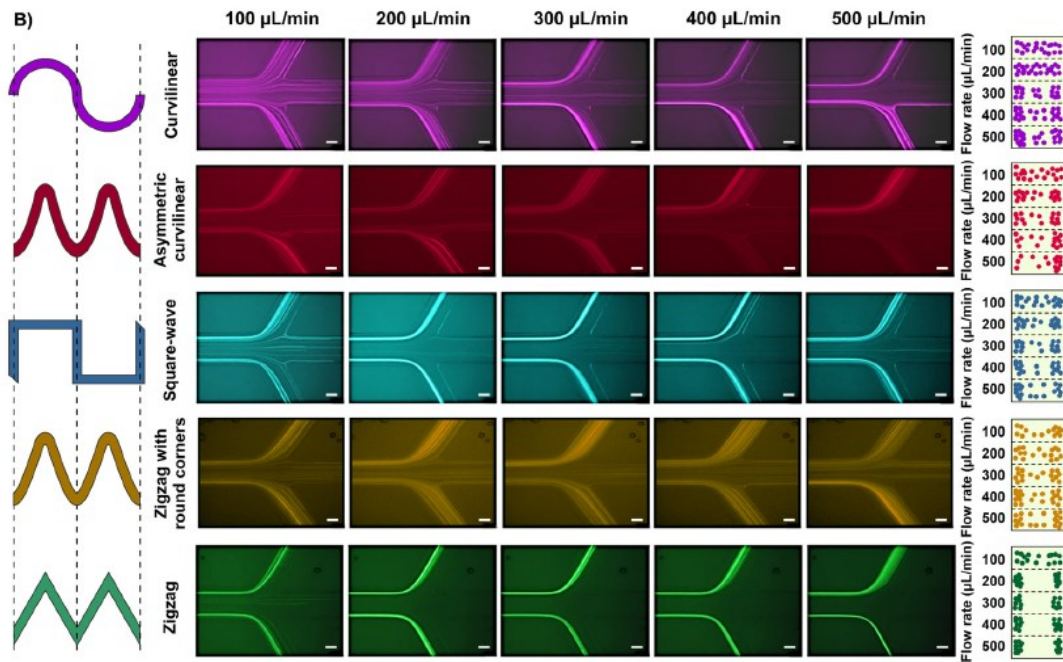


Figura 18: Confronto delle prestazioni dei microcanali a serpentina con diverse geometrie per particelle da 3 μm , in un intervallo di flusso da 100 a 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ e con diametro idraulico costante di 62,2 μm . [10]

L'elevata efficacia di focalizzazione riscontrata a portate ridotte nei microcanali a zig-zag, con angoli retti, può essere attribuita a un meccanismo di focalizzazione ordinato in tre stadi, ciascuno corrispondente a una zona specifica del canale, in cui le forze idrodinamiche interagiscono in modo distinto. (Figura 19)

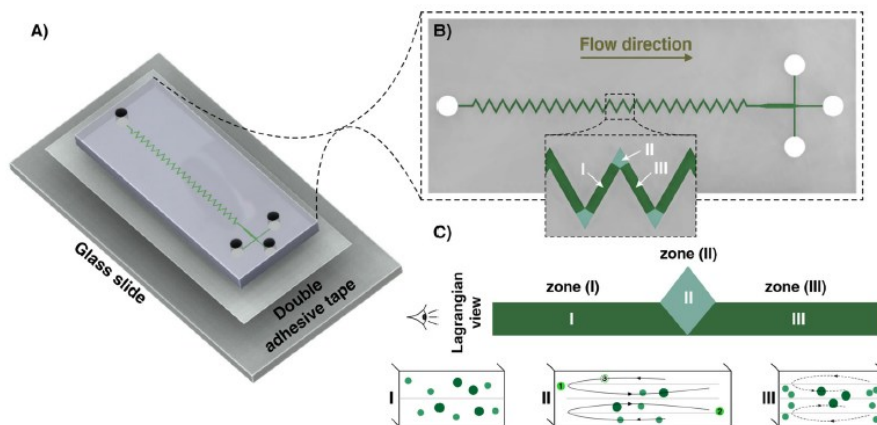


Figura 19: Meccanismo di focalizzazione nelle tre zone del microcanale a zig-zag. [10]

In particolare, nella zona I, corrispondente al tratto rettilineo iniziale, le particelle migrano lateralmente sotto l'influenza di F_L , analogamente a quanto osservato nei microcanali rettilinei.

Tale forza spinge le particelle verso posizioni periferiche, con quelle di maggior diametro che tendono progressivamente a concentrarsi lungo l'asse centrale del canale. Nella zona II, corrispondente all'angolo, l'improvvisa espansione della sezione del canale modifica il campo delle forze agenti: F_D guida le particelle verso posizioni di equilibrio stabili lungo la linea centrale, mentre le traiettorie longitudinali si adeguano alla direzione del flusso. Infine, nella zona III, tratto rettilineo successivo al loop, il flusso conserva una "memoria" della deformazione della sezione, la combinazione dei micro-vortici di Dean con le forze di lift conduce le particelle alle posizioni di equilibrio finali, permettendo la formazione di flussi focalizzati e stabili.

Inoltre, dai risultati sperimentali è emerso che in questi microcanali la focalizzazione è ottimizzata per rapporti pari a $a/D_h \geq 0,04$, rappresentando un significativo miglioramento rispetto agli altri microcanali, per i quali il requisito minimo era pari a $a/D_h \geq 0,07$.

1.8 Conclusione sulle tecniche di separazione cellulare

In conclusione, negli ultimi anni sono state sviluppate numerose tecniche di separazione cellulare [6], che differiscono tra loro non solo per il principio fisico su cui si basa il processo di selezione, ma anche per le tecnologie impiegate, i costi, i tempi di esecuzione e le prestazioni in termini di efficacia ed efficienza complessiva. Tra queste, la separazione microfluidica su chip delle VEs rappresenta una delle soluzioni più promettenti rispetto ai metodi convenzionali, grazie a ridotti costi operativi, tempi di processo inferiori (<120 min) e migliori prestazioni di isolamento, con valori di purezza delle VEs fino all'82,8% e un loro tasso di recupero pari al 77,8%. Inoltre, le VEs isolate mediante dispositivi microfluidici possono essere direttamente impiegate in analisi a valle, come l'analisi proteomica. Studi presenti in letteratura hanno evidenziato che l'analisi proteomica delle VEs isolate da sieri di pazienti affetti da diverse patologie mediante chip microfluidici fornisce informazioni biologiche più ricche e dettagliate sulla malattia rispetto a quelle ottenute tramite ultracentrifugazione (UC). Questi risultati dimostrano la buona praticabilità dei dispositivi microfluidici per applicazioni future sia in ambito di ricerca sia clinico. [14]

Tuttavia, nonostante i risultati riportati in letteratura, tali approcci richiedono ulteriori ottimizzazioni e validazioni sperimentali in condizioni operative realistiche, soprattutto per

quanto riguarda la separazione di sottopopolazioni di dimensioni nanometriche. Questo evidenzia la necessità di sviluppare strategie microfluidiche sempre più controllate ed efficienti.

1.9 Obiettivo

Sulla base delle considerazioni sopra esposte, il presente lavoro di tesi si propone la progettazione di un LOC passivo per l'isolamento di VEs. A tal fine, sono stati approfonditi i principi della microfluidica inerziale e le principali configurazioni di microcanali, evidenziando l'influenza dei parametri geometrici e operativi sui fenomeni di focalizzazione.

Lo studio è stato condotto mediante simulazioni numeriche fluidodinamiche, con l'obiettivo di analizzare il comportamento particellare all'interno del dispositivo e identificare le condizioni favorevoli alla focalizzazione.

Particolare attenzione è stata dedicata alla scelta della geometria del canale, individuando configurazioni idonee a favorire la focalizzazione e la separazione dimensionale delle particelle, in accordo con i risultati presenti in letteratura.

Nel complesso, il lavoro fornisce una valutazione preliminare dell'efficacia della configurazione proposta e del suo potenziale impiego in applicazioni di separazione dimensionale in regime microfluidico, con particolare riferimento a un tentativo di estensione alle particelle nanometriche.

1.10 Assunzioni e limiti

Alla luce dei meccanismi di migrazione precedentemente introdotti, è necessario analizzare il ruolo della scala dimensione delle particelle, con particolare riferimento alle forze che ne governano l'evoluzione verso posizioni di equilibrio all'interno del microcanale.

Come discusso nel [paragrafo 1.7.2](#), nei microcanali con curvatura la migrazione delle particelle è governata dall'interazione di due forze F_L e F_D , le quali determinano la convergenza verso posizioni di equilibrio stabili. Dalle relazioni ([Eq 1.4](#), [1.5](#) e [1.10](#)) emerge come tali contributi dipendano in modo significativo dal diametro particellare, con $F_L \propto a_p^4$ e $F_D \propto a_p$, oltre che

dalle condizioni di flusso. Questa forte dipendenza dimensionale consente la separazione delle particelle in base alla loro dimensione, mediante un'appropriata modulazione dei parametri.

Tale comportamento risulta tuttavia fortemente dipendente dalla scala del sistema. Riducendo la scala dimensionale verso il regime sub-micrometrico e nanometrico, diventa progressivamente rilevante l'effetto del moto browniano, che introduce una componente stocastica nel trasporto particellare.[15]

Il moto browniano è descritto dalla costante di diffusione D_B :

$$D_B = \frac{k_B T}{3\pi\mu a_p} \quad (1.11)$$

dove k_B è la costante di Boltzmann, T la temperatura assoluta, μ la viscosità dinamica del fluido e a_p il raggio della particella.

Nel caso di microparticelle (1–50 μm), le forze idrodinamiche, in particolare F_L e F_D , risultano nettamente predominanti rispetto agli effetti diffusivi. In queste condizioni, il moto delle particelle è governato principalmente da meccanismi deterministici legati al campo di flusso, mentre il contributo del moto browniano può essere trascurato. Al contrario, nel caso di nanoparticelle (1–500 nm), la riduzione della scala caratteristica comporta una significativa diminuzione dell'efficacia delle forze idrodinamiche, rendendo progressivamente dominante il contributo diffusivo. Il moto browniano assume quindi un ruolo preponderante, determinando un comportamento prevalentemente stocastico e rendendo più complessa la previsione delle traiettorie, con una conseguente riduzione dell'efficacia dei meccanismi di focalizzazione inerziale.

Tale aspetto risulta particolarmente rilevante nel caso delle VEs (≈ 200 nm), le quali si collocano al limite inferiore del regime tipicamente considerato nei modelli di microfluidica inerziale, generalmente validati per particelle di scala micrometrica.

In questo contesto, il modello adottato si basa sull'assunzione che i contributi inerziali risultino prevalenti rispetto ai fenomeni diffusivi. Pertanto, i risultati ottenuti devono essere interpretati nell'ambito delle ipotesi del modello continuo adottato, che non include esplicitamente effetti stocastici.

Di conseguenza, il presente lavoro si configura come uno studio preliminare di tipo concettuale e numerico, finalizzato a valutare la fattibilità dell'applicazione dei principi della microfluidica inerziale a scale dimensionali inferiori rispetto a quelle convenzionalmente investigate in letteratura.

Capitolo 2: Simulazioni computazionali per la progettazione del microdispositivo

La progettazione e l'ottimizzazione di dispositivi microfluidici si basano frequentemente su metodologie di fluidodinamica computazionale (CFD), che permettono di calcolare in modo teorico i campi di velocità e le linee di flusso all'interno del dispositivo prima della sua fabbricazione. In questo modo è possibile ottimizzare il design, il comportamento del flusso e le specifiche di progetto, evitando numerose e costose indagini sperimentali.

Questo capitolo raccoglie le attività preliminari di progettazione di un dispositivo microfluidico per il trattamento di campioni biologici al fine di isolare le VEs.

Attraverso tali analisi viene approfondito il comportamento del fluido e delle particelle in relazione ai parametri operativi imposti, con particolare attenzione alla formazione dei flussi secondari, alle traiettorie particellari e alle posizioni di equilibrio. L'approccio numerico consente di integrare e interpretare i dati sperimentali, fornendo una descrizione dettagliata dei fenomeni fisici coinvolti e permettendo di evidenziare le condizioni operative ottimali per i processi di separazione e concentrazione cellulare.

2.1 Analisi computazionali per lo studio della microfluidica

I metodi di analisi fluidodinamica computazionale (CFD) sono attualmente utilizzati in diversi settori dell'ingegneria, configurandosi come strumenti avanzati ed efficaci a supporto delle attività di progettazione e ottimizzazione di componenti e sistemi complessi.

Le metodologie di CFD sono ampiamente utilizzate anche nell'ambito dei dispositivi microfluidici. La costruzione e la sperimentazione di più prototipi, finalizzate all'ottimizzazione del dispositivo e al miglioramento delle prestazioni, comportano infatti un significativo dispendio in termini di tempo e risorse economiche. In tale contesto, le simulazioni numeriche consentono di prevedere, con elevata rapidità, l'influenza delle modifiche progettuali sulle prestazioni del chip, riducendo il numero di prove necessarie nella fase di prototipazione. [17]

Inoltre, l'analisi CFD consente l'esecuzione di analisi parametriche, mediante la variazione controllata dei parametri di ingresso, al fine di valutare l'influenza dei singoli fattori sulle prestazioni complessive del sistema.

In conclusione, l'impiego delle tecniche di analisi CFD consente di ottenere una descrizione dettagliata e accurata dei campi di moto associati a dispositivi contenenti cellule. La combinazione di tecniche sperimentali e computazionali rappresenta un approccio efficace per il raggiungimento di prestazioni elevate nei sistemi microfluidici.[18]

I passaggi necessari per condurre un'analisi CFD sono i seguenti:

1. Modellazione della geometria, realizzata mediante software CFD oppure tramite strumenti CAD esterni.
2. Definizione del modello fisico del problema, attraverso la selezione delle equazioni governanti, delle condizioni al contorno e delle condizioni iniziali più opportune.
3. Generazione della mesh della geometria, sulla quale le equazioni governanti vengono discretizzate e risolte in corrispondenza dei nodi di cella, dei punti di Gauss o del centro della cella, in funzione del metodo numerico adottato.
4. Risoluzione del sistema numerico mediante l'impiego di algoritmi appropriati, selezionati in base alla natura del problema fisico in esame.
5. Analisi e interpretazione dei risultati attraverso attività di post-processing, quali rappresentazioni grafiche, animazioni e visualizzazioni delle grandezze di interesse.

Nell'ambito del presente lavoro di tesi, la realizzazione della geometria è stata effettuata mediante l'utilizzo del software Fusion 360® (Autodesk®). Una volta ottenuto il modello CAD, è stato impiegato il software *Ansys Fluent* per condurre simulazioni numeriche finalizzate allo studio dei profili di velocità e al tracciamento particellare all'interno dei microcanali del chip.

2.1.1 Metodo dei Volumi Finiti per la soluzione numerica

Per la modellazione dei fenomeni fluidodinamici sono disponibili diversi software che non richiedono una profonda conoscenza dell'analisi numerica, ma competenze in fluidodinamica computazionale. Tali strumenti non solo consentono di risolvere le equazioni governanti della

fluidodinamica, ma permettono anche di includere effetti fisici aggiuntivi presenti nel sistema reale, quali forze gravitazionali, interazioni elettrostatiche o fenomeni chimici, oltre a consentire lo studio del moto delle particelle.

Per garantire l'affidabilità dei risultati, è fondamentale effettuare una generazione accurata della mesh. Inoltre, i risultati devono essere sottoposti a un'analisi critica e validati mediante studi di sensibilità della mesh, al fine di verificarne l'indipendenza dalla dimensione degli elementi, unitamente a una corretta valutazione del problema fisico simulato.

Tali software adottano differenti tecniche per la discretizzazione delle equazioni di governo, tra cui il metodo delle differenze finite (FDM), il metodo degli elementi finiti (FEM) e il metodo dei volumi finiti (FVM).

Nel FDM, le derivate delle equazioni di governo vengono approssimate tramite sviluppi in serie di Taylor basati sui valori nei nodi vicini. In tal modo, per ogni nodo della griglia è associata una relazione algebrica, che può essere organizzata e risolta con relativa facilità tramite solutori numerici, sia metodi diretti sia iterativi, ampiamente consolidati. Il principale vantaggio del metodo è la facilità di implementazione; tuttavia, la sua applicabilità è generalmente limitata a griglie strutturate, risultando quindi più indicato per domini geometricamente semplici, come capillari.

Il metodo FEM si distingue per la trasformazione delle equazioni di governo, ottenuta mediante moltiplicazione per una funzione peso e successiva integrazione sul dominio di calcolo. Tale approccio consente una notevole flessibilità nella gestione di geometrie complesse e condizioni al contorno, rendendolo particolarmente adatto a problemi fisici, come quelli che coinvolgono campi elettrici, fenomeni di trasporto con reazioni superficiali e analisi termiche convettive. Tuttavia, la qualità della soluzione dipende fortemente dalla discretizzazione del dominio e può richiedere un elevato costo computazionale, soprattutto in presenza di forti gradienti o di marcate disparità di scala, come nei sistemi LOC.

Nel FVM, il dominio di calcolo viene discretizzato in volumi di controllo, ciascuno associato a un nodo al centro della griglia. Le equazioni di governo vengono integrate su ciascun volume di controllo e, applicando il teorema della divergenza, gli integrali di volume vengono convertiti in integrali di superficie. Ne deriva una formulazione conservativa, in cui le grandezze fisiche sono espresse in termini di flussi attraverso le superfici del volume, garantendo la conservazione

locale delle proprietà fisiche. A differenza del metodo FDM, il metodo FVM non richiede una griglia strutturata e risulta adatto alla simulazione di geometrie più complesse. [18]

Per la risoluzione delle equazioni si possono adottare due approcci principali: la soluzione sequenziale, in cui ogni equazione viene risolta considerando una sola incognita alla volta e utilizzando stime aggiornate per le altre variabili (tipicamente mediante metodi iterativi a causa della grande dimensione dei sistemi), oppure la soluzione simultanea, in cui tutte le equazioni vengono considerate come un unico sistema e risolte contemporaneamente.

È fondamentale monitorare attentamente il comportamento di convergenza dell'algoritmo durante il processo iterativo. Idealmente, le iterazioni vengono interrotte al raggiungimento di un errore inferiore a una soglia prefissata; tuttavia, la stima diretta dell'errore risulta spesso complessa. Per tale ragione, si ricorre all'impiego di residui adimensionali come indicatori della convergenza. In particolare, quando tali residui scendono al di sotto di un valore di soglia stabilito, la soluzione è considerata convergente. In alternativa, è possibile definire un numero massimo di iterazioni e valutare l'evoluzione temporale dei residui durante il processo, al fine di verificarne il corretto andamento verso la convergenza.

In tale studio è stato impiegato il software *Ansys Fluent*, basato sul metodo dei volumi finiti. In questo contesto, i volumi di controllo, all'interno dei quali vengono applicate le leggi di conservazione, possono essere definiti secondo due approcci distinti: nel caso *vertex-centered* essi sono costruiti attorno ai nodi della griglia, mentre nell'approccio *cell-centered* coincidono direttamente con le celle della discretizzazione. Quest'ultimo rappresenta l'approccio adottato da *ANSYS Fluent* ed è stato quindi utilizzato nel presente lavoro.

Tale configurazione risulta particolarmente utile per mesh non strutturate, come nel caso in esame, poiché consente di mantenere una formulazione semplice, garantendo una buona conservazione locale delle grandezze fisiche. In questa configurazione, le grandezze scalari — quali pressione, temperatura e densità — sono associate ai centroidi delle celle. Le componenti della velocità vengono invece generalmente collocate sulle facce dei volumi di controllo, secondo una disposizione sfalsata che favorisce un accoppiamento più stabile tra pressione e velocità.

2.2 Design del dispositivo: progettazione e ottimizzazione

Il LOC progettato è caratterizzato da dimensioni complessive pari a $30 \times 30 \times 2,5$ mm. Il chip presenta un canale microfluidico a sezione trasversale rettangolare, con profondità di $50 \mu\text{m}$ e larghezza di $110 \mu\text{m}$ (Figura 20). La geometria del canale è costituita da cinque triangoli concentrici con un totale di diciassette angoli. È inoltre dotato di due ingressi e due uscite (Figura 21), alle cui estremità sono state realizzate le sedi per l'alloggiamento dei tubi di alimentazione del dispositivo. Tali tubi saranno collegati alle siringhe, che consentiranno l'immissione dei fluidi all'interno dei canali.

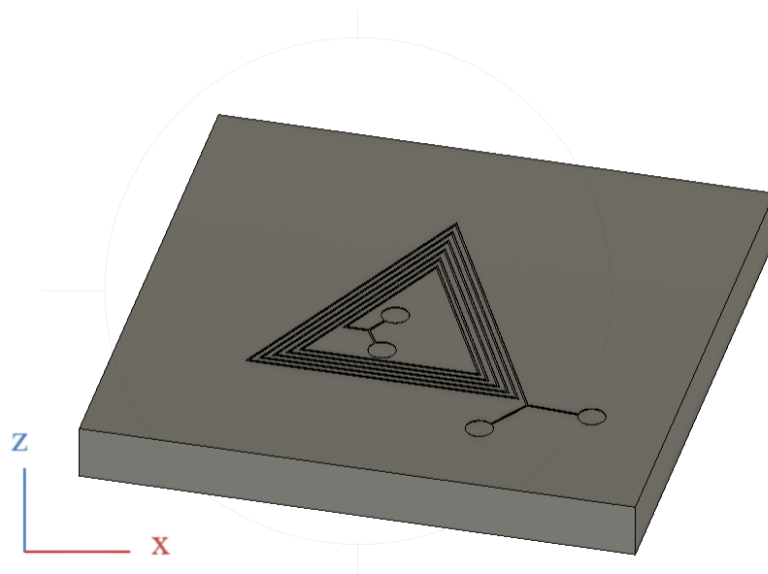


Figura 20: Lab-on-chip realizzato.

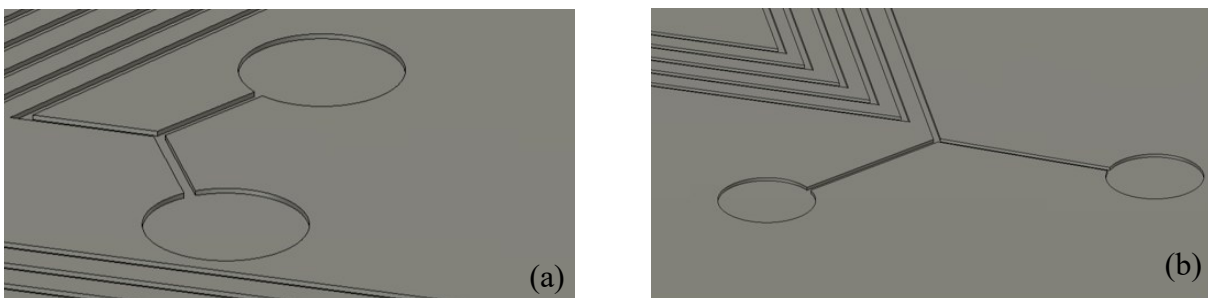


Figura 21: Ingressi (a) Uscite (b)

2.3 Definizione del modello fisico del problema

Per la determinazione del regime di moto all'interno del dispositivo, è necessario calcolare Re , secondo l'equazione (1.1). Ai fini delle simulazioni, sono impostati i seguenti valori dei parametri fisici:

Parametro	Valore
Densità (ρ)	998 kg/m ³ (a 20–25 °C)
Viscosità (μ)	1,004 × 10 ⁻³ Pa·s (a 20 °C)
Diametro idraulico (D_h)	≈ 6,88 × 10 ⁻⁵ m (68,8 μm)

Tabella 1: Parametri fisici impostati.

Il numero di Reynolds è molto basso, in conseguenza delle ridotte velocità del fluido. Tale condizione indica che gli effetti viscosi prevalgono sul moto del fluido, giustificando la modellazione del flusso come laminare e stazionario, ovvero costante nel tempo. In questo regime, il moto del fluido risulta prevedibile e ordinato, privo di formazione di vortici o turbolenze. Le particelle di fluido si muovono lungo traiettorie parallele dell'asse del canale e, in ciascuna sezione trasversale il campo di velocità si mantiene costante nel tempo: in tali condizioni il moto è definito uniforme.

Sulla base di queste assunzioni, il flusso incomprimibile nel microcanale viene modellato mediante la risoluzione delle equazioni fondamentali della continuità, che assicura la conservazione della massa e di quantità di moto, corrispondenti alla formulazione incomprimibile delle equazioni di Navier–Stokes. [19]

$$\nabla \cdot \mathbf{V} = 0 \quad (2.1)$$

$$\frac{\partial \mathbf{V}}{\partial t} + (\mathbf{V} \cdot \nabla) \mathbf{V} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \nu \nabla^2 \mathbf{V} \quad (2.2)$$

dove V rappresenta la velocità del fluido [m/s], la densità [kg/m³], la viscosità cinematica [m²/s] dell'acqua e p la pressione dinamica [Pa].

Infine, le condizioni al contorno e i parametri operativi adottati sono:

- regime stazionario e flusso laminare;
- condizione di pressione nulla alla sezione di uscita (*outlet*);
- condizione di non scorrimento (*no-slip*) applicata alle pareti del dominio.

2.3.1 Discrete Phase Model (DPM)

La simulazione del moto delle cellule è stata implementata su *Ansys Fluent*, mediante il *Discrete Phase Model* (DPM). Il DPM si basa su un approccio di tipo Euleriano–Lagrangiano, in cui la fase fluida viene descritta come un mezzo continuo mediante la risoluzione delle equazioni di Navier–Stokes, mentre la fase dispersa è trattata in un sistema lagrangiano attraverso il tracciamento di un insieme di particelle all'interno del campo di moto calcolato.[20]

In particolare, il moto delle particelle viene descritto dalla seguente equazione, applicata a ogni singola particella:

$$F_t = \frac{d(m_p v)}{dt} \quad (2.3)$$

in cui F_t è la forza risultante, m_p la massa della particella e v il suo campo di velocità.

La procedura generale per la configurazione e risoluzione del problema è la seguente:

1. Risolvere il flusso della fase continua.
2. Creare le iniezioni della fase discreta.
3. Risolvere il flusso accoppiato, se desiderato.
4. Tracciare le iniezioni della fase discreta, utilizzando grafici o report.

Nella sezione *Particle Properties* sono stati specificati i principali parametri fisici delle particelle: densità (1100 kg/m³), diametro (200 nm) e carica elettrica (paria a zero). I parametri di simulazione selezionati sono riportati in Figura 22; la velocità delle particelle è stata impostata pari a quella del fluido.

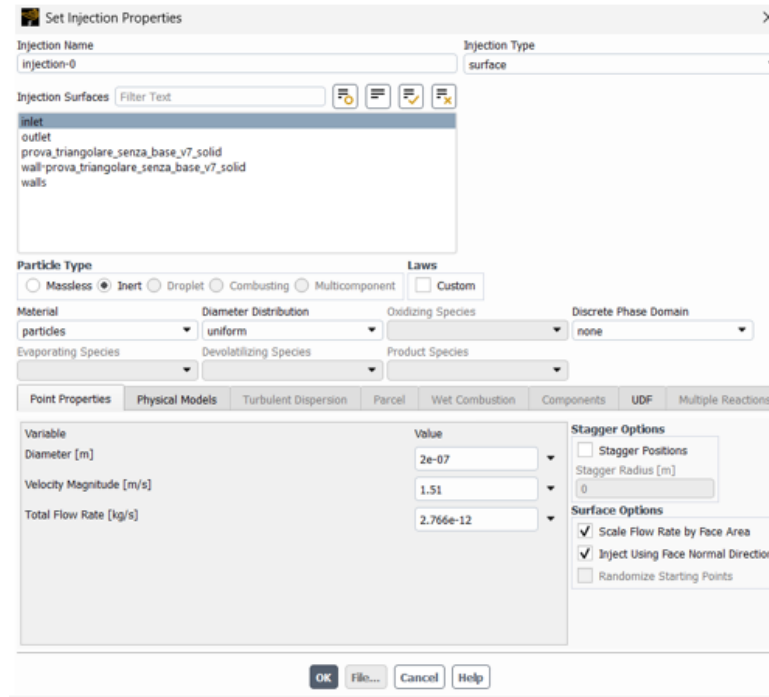


Figura 22: Parametri definiti per il DPM.

Nella sezione *Physical Models* è possibile impostare i modelli fisici relativi alle particelle, mostrati in [Figura 23](#).

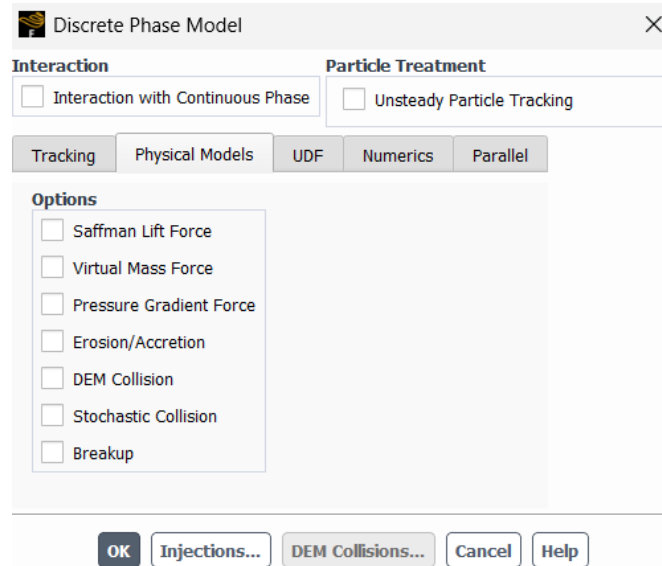


Figura 23: *Physical Models* impostati.

In particolare, la *Saffman lift force*, forza di sollevamento trasversale che agisce su una particella in presenza di gradienti di velocità e moto relativo rispetto al fluido, risulta trascurabile, in quanto il numero di Reynolds particellare è inferiore all'unità ($Re_p \approx 0.302$).

Analogamente, la *Virtual Mass Force*, associata all'inerzia del fluido circostante in risposta all'accelerazione della particella può essere trascurata, poiché la ridotta differenza tra le densità di fluido e particella ($\rho_w = 1000 \text{ kg/m}^3$, $\rho_p = 1100 \text{ kg/m}^3$) limita significativamente il contributo legato all'accelerazione relativa.

La *pressure gradient force* assume anch'essa un ruolo marginale nel presente caso, in quanto $S_t \ll 1$, condizione che indica una forte capacità delle particelle di seguire le variazioni del campo di moto senza significativi effetti inerziali aggiuntivi.

Per quanto riguarda le interazioni con le pareti, i fenomeni di *Erosion* e *Accretion* non risultano rilevanti, data la scala nanometrica delle particelle e le condizioni operative adottate, che non favoriscono fenomeni di impatto o deposito.

Le interazioni tra particelle sono anch'esse limitate, rendendo non necessario l'impiego del modello *DEM collision*, poiché la bassa concentrazione particellare riduce la probabilità di urti significativi.

Le *Stochastic collision*, rappresentate mediante un approccio probabilistico per tenere conto degli effetti casuali nel moto particellare, potrebbero essere eventualmente considerate per una descrizione più dettagliata del sistema, sebbene il loro contributo atteso sia limitato.

Infine, il fenomeno di *breakup* non risulta rilevante, poiché le particelle, essendo solide e di dimensioni nanometriche, non sono soggette a frammentazione nelle condizioni fluidodinamiche analizzate.

Nel complesso, l'insieme delle forze e dei fenomeni considerati può essere ritenuto trascurabile, consentendo una semplificazione del modello numerico pur mantenendo una descrizione fisicamente coerente del sistema [9].

2.4 Generazione della mesh

Una volta definita la geometria del microcanale, si procede alla generazione della griglia di calcolo (mesh) mediante il modulo *Ansys Meshing*. Tale fase rappresenta un passaggio cruciale dell'analisi CFD, in quanto la qualità della discretizzazione influisce direttamente sulla capacità

di risolvere correttamente le equazioni di conservazione e, conseguentemente, sull'affidabilità e sulla precisione dei risultati numerici.

Nel presente lavoro, la geometria del LOC è stata semplificata modellando esclusivamente il canale di flusso, al fine di ridurre la complessità computazionale e concentrare l'analisi sui fenomeni fluidodinamici di interesse. La geometria è stata rappresentata mediante superfici chiuse, ossia entità che delimitano il dominio fluido e garantiscono così la corretta definizione del dominio di calcolo (Figura 24).

Tale scelta è fondamentale al fine di garantire la definizione di un dominio di simulazione per l'implementazione delle condizioni al contorno e la risoluzione numerica delle equazioni che governano il moto dei fluidi.

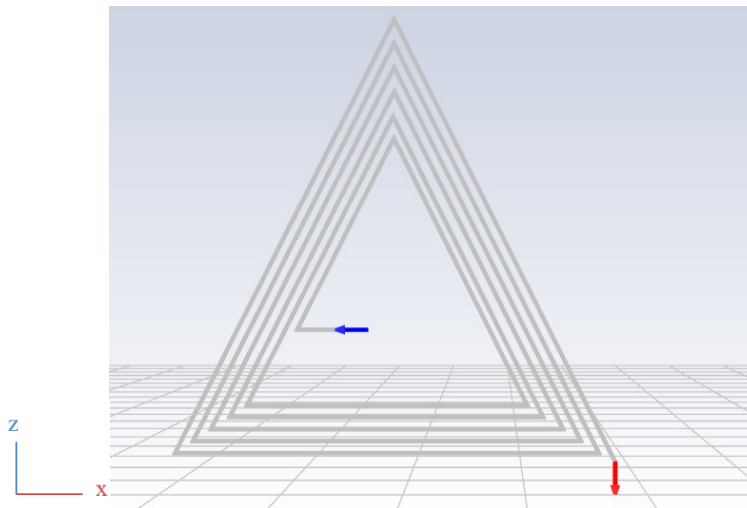


Figura 24: Geometria semplificata utilizzata per la mesh.

2.4.1 Tipologie di mesh

A seconda delle caratteristiche del problema, della complessità geometrica e del livello di accuratezza desiderato, è possibile ricorrere a differenti approcci per la discretizzazione della mesh.

In funzione della struttura di connessione tra le celle, le mesh si suddividono in strutturate e non strutturate. Una mesh strutturata (Figura 25(a)) è caratterizzata da una disposizione ordinata dei volumi di controllo, organizzati secondo uno schema regolare in cui ogni cella è identificabile in modo univoco tramite un sistema di indici, rendendo la struttura della mesh

facilmente indicizzabile. Tale configurazione consente un'elevata efficienza computazionale, una maggiore semplicità nell'implementazione degli algoritmi numerici e una migliore qualità dell'approssimazione delle grandezze fisiche, grazie alla regolarità della discretizzazione e alla riduzione degli errori numerici associati alla griglia. Tuttavia, questa tipologia di mesh risulta generalmente applicabile solo a domini caratterizzati da geometrie semplici o regolari, in quanto la sua generazione diventa complessa o impraticabile in presenza di configurazioni geometriche articolate. Al contrario, le mesh non strutturate ([Figura 25\(b\)](#)) sono caratterizzate da una connettività non ordinata tra le celle, che non consente di ricostruire la posizione di ciascun elemento a partire da quelle adiacenti. Tale caratteristica le rende adatte alla discretizzazione di geometrie complesse caratterizzate da curvature e discontinuità. Le mesh non strutturate possono essere composte da elementi triangolari in due dimensioni e da elementi tetraedrici, piramidali o prismatici in tre dimensioni, consentendo un migliore adattamento alla geometria del dominio. Tuttavia, questo comporta un aumento della complessità computazionale rispetto alle mesh strutturate, rendendo necessaria un'attenta generazione della griglia per garantire la qualità numerica della soluzione. [20]

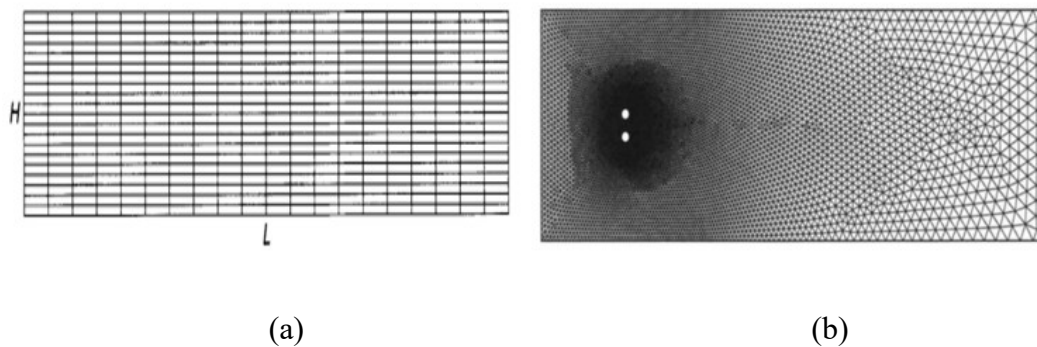


Figura 25: Mesh strutturata(a) e mesh non strutturata (b).

Sulla base delle considerazioni sopra esposte, nel presente caso studio è stata adottata una mesh non strutturata, come riportato in [Figura 26](#).

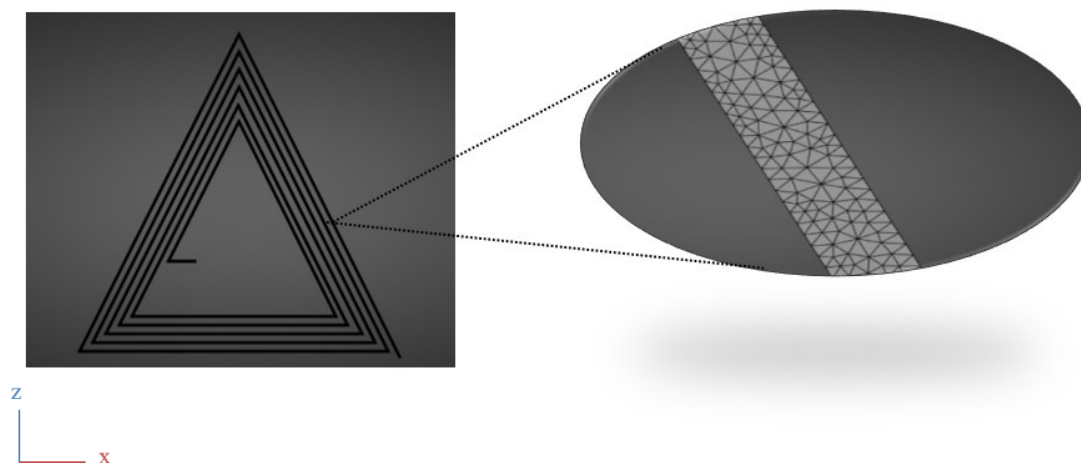


Figura 26: Mesh utilizzata per la simulazione.

2.4.2 Indipendenza della mesh

Per ottenere una rappresentazione ideale del campo di moto in una simulazione CFD, il numero di celle della mesh dovrebbe teoricamente tendere all'infinito, così da descrivere in modo continuo le variazioni spaziali delle grandezze fluidodinamiche. Tuttavia, tale condizione non è realizzabile nella pratica a causa dei limiti computazionali.

L'approssimazione della soluzione mediante una discretizzazione spaziale finita introduce un errore numerico, noto come errore di discretizzazione, definito come:

$$d = \Psi - \Psi_{CFD} \quad (2.4)$$

dove Ψ indica la proprietà fisica reale – velocità, pressione o temperatura – mentre Ψ_{CFD} è il valore calcolato all'interno della mesh.

Nel dominio discretizzato, le equazioni di governo vengono risolte su un insieme finito di celle, all'interno delle quali le variabili vengono ricostruite mediante opportuni schemi di interpolazione. Per descrivere la variazione locale di una grandezza scalare è possibile considerare uno sviluppo in serie di Taylor:

$$\Psi(x) = c_0 + c_1x + c_2x^2 + c_3x^3 + \dots \quad (2.5)$$

dove x rappresenta la distanza dal punto di riferimento e i coefficienti c_i vengono determinati per adattare un polinomio al profilo reale della proprietà in esame.

Nelle formulazioni numeriche, tale variazione viene approssimata mediante schemi di ordine finito, ad esempio di tipo lineare nel caso di schemi del primo o secondo ordine:

$$\Psi_{CFD} = c_0 + c_1 x \quad (2.6)$$

L'errore di discretizzazione è quindi legato ai termini di ordine superiore trascurati nello sviluppo e risulta generalmente dipendente dalla dimensione caratteristica della cella; in particolare, per schemi di secondo ordine, l'errore scala con il quadrato della dimensione della mesh.

Per questo motivo, la riduzione della dimensione delle celle comporta una diminuzione significativa dell'errore numerico, rendendo necessario lo studio di raffinamento della mesh, per valutare la sensibilità della soluzione rispetto alla discretizzazione spaziale. Tale procedura consente di individuare una configurazione ottimale della mesh, in grado di garantire un adeguato compromesso tra accuratezza e costo computazionale.

Il numero di elementi della mesh viene quindi incrementato progressivamente fino al raggiungimento della cosiddetta indipendenza dalla mesh, condizione in cui ulteriori raffinamenti non comportano variazioni significative nei risultati numerici, assicurando così l'affidabilità delle simulazioni e la loro validità per analisi successive. [21]

L'errore relativo stimato tra due discretizzazioni successive può essere definito come segue:

$$\varepsilon = \frac{|\Psi_1 - \Psi_0|}{\Psi_1} = 0,3 \% \quad (2.7)$$

dove Ψ_1 rappresenta il valore della grandezza di interesse calcolato utilizzando la mesh fine, Ψ_0 indica il valore della stessa grandezza ottenuto con la mesh più grossa, che funge da riferimento.

2.4.3 Studio di raffinamento della mesh

Lo studio di raffinamento è stato effettuato considerando tre discretizzazioni caratterizzate da diversi livelli di risoluzione spaziale. Il rapporto di raffinamento tra due mesh successive può essere definito come il rapporto tra le rispettive dimensioni caratteristiche degli elementi:

$$r = \frac{d_{grossolana}}{d_{fine}} > 1,3 \quad (2.8)$$

Nello studio sono state considerate le seguenti dimensioni caratteristiche:

$$d_{grossolana} = 0,05\text{mm} \quad d_{media} = 0,032\text{mm} \quad d_{fine} = 0,02\text{mm}$$

I rapporti di raffinamento calcolati sono:

$$r_1 = \frac{d_{grossolana}}{d_{media}} = 1,56 \quad r_2 = \frac{d_{media}}{d_{fine}} = 1,6$$

Poiché entrambi i valori risultano superiori alla soglia raccomandata, le tre discretizzazioni possono essere considerate idonee per lo studio di indipendenza dalla mesh.

Inoltre, per garantire consistenza del confronto numerico, sono state utilizzate mesh generate con la stessa strategia di discretizzazione, differenziate per la dimensione caratteristica degli elementi.

2.4.4 Convergenza della mesh

Sulla base delle dimensioni caratteristiche degli elementi della mesh adottate, sono state eseguite le simulazioni mantenendo costante la velocità di ingresso. I risultati ottenuti sono stati riportati in un grafico come illustrato in [Figura 27](#).

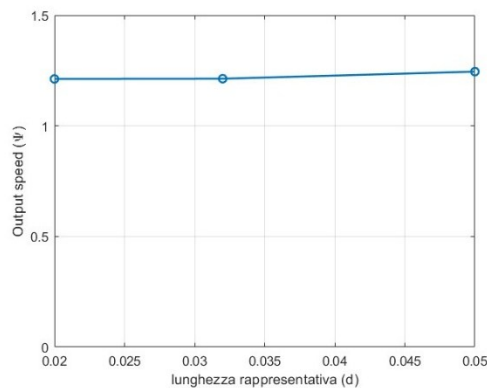


Figura 27: Relazione tra lunghezza rappresentativa e velocità di uscita.

Dal grafico si osserva che, utilizzando elementi di dimensione pari a 0,02 mm, la variazione del valore in uscita si riduce in maniera significativa, indicando una stabilizzazione della soluzione. Al contrario, per dimensioni maggiori degli elementi, corrispondenti alle mesh media e grossolana, persistono differenze nei risultati, evidenziando che la soluzione è ancora influenzata dalla discretizzazione. Pertanto, per garantire accuratezza e affidabilità nelle analisi successive, è stata scelta la mesh fine.

2.5 Risoluzione del sistema numerico

La geometria discretizzata è stata successivamente importata in *Ansys Solution* per l'analisi fluidodinamica. Prima di procedere con le simulazioni, sono state definite le condizioni al contorno e le proprietà del fluido.

Al fine di valutare l'influenza della velocità sul comportamento del flusso nel canale, sono state implementate cinque simulazioni ciascuna con una velocità di ingresso diversa (Tabella 1), calcolata a partire dalla portata volumetrica tramite la relazione:

$$v = \frac{Q}{A} \quad (2.9)$$

dove Q è la portata volumetrica e A la sezione del canale.

1° PROVA	2° PROVA	3° PROVA	4° PROVA	5° PROVA
$0.303 \frac{m}{s}$	$0.605 \frac{m}{s}$	$0.909 \frac{m}{s}$	$1.21 \frac{m}{s}$	$1.51 \frac{m}{s}$

Tabella 2: Velocità di ingresso.

Le equazioni di governo della fluidodinamica sono state risolte mediante un solver di tipo *pressure-based*, idoneo allo studio di flussi incomprimibili, come nel caso in esame. In tale contesto è stato adottato l'algoritmo SIMPLE (*Semi-Implicit Method for Pressure-Linked Equations*), che consente di ottenere una soluzione iterativa del sistema di equazioni, garantendo il corretto accoppiamento tra pressione e velocità e il rispetto dei bilanci di conservazione.

I criteri di convergenza sono stati definiti imponendo un valore del residuo pari a 10^{-4} , verificando la stabilizzazione del campo di velocità al variare delle iterazioni.

Al termine delle simulazioni, è stata eseguita un'analisi di post-processing, i cui risultati sono stati presentati e discussi nella sezione successiva.

2.6 Risultati numerici dell'analisi fluidodinamica

Il campo di moto all'interno del microcanale, insieme ai profili di velocità nelle sezioni trasversali a monte e a valle delle regioni di curvatura, è riportato in [Figura 28](#).

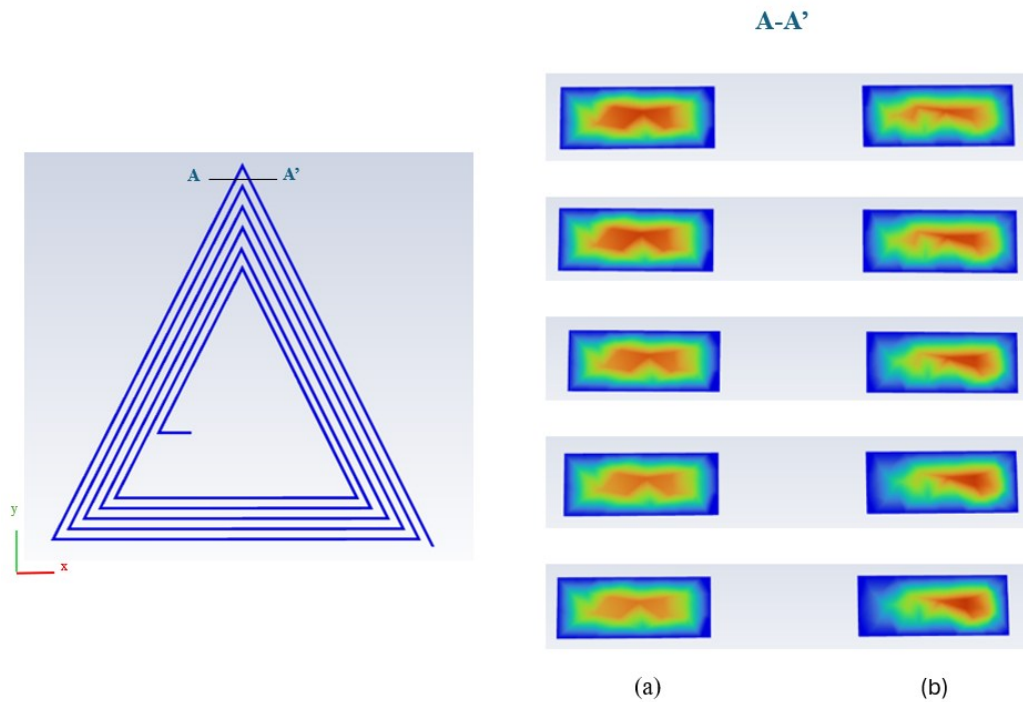


Figura 28: Profili di velocità nelle sezioni trasversali del microcanale nel piano xz, a monte (a) e a valle (b) della curvatura, al variare della portata (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Dai dati numerici emerge che, nel tratto precedente alla regione di curvatura non si osserva la formazione di flussi secondari, come evidenziato anche dai relativi profili di velocità ([Figura 28\(a\)](#)). In corrispondenza dell'angolo, la geometria del canale induce la formazione di flussi secondari ([Figura 28\(b\)](#)). Tuttavia, si osserva una graduale diminuzione dell'intensità di tali strutture nel tratto rettilineo successivo alla regione di curvatura, rendendo necessarie ulteriori variazioni della direzione del canale per favorirne la rigenerazione.

Tali risultati sono coerenti con quanto riportato nel [paragrafo 1.7.3](#) per i canali sinusoidali, nei quali l'alternanza continua di curvature consente il mantenimento e il rinforzo dei flussi secondari lungo l'intero sviluppo del canale, contribuendo in modo più efficace ai meccanismi di separazione inerziale.

Nel contesto dell'analisi del flusso, un parametro fondamentale che influenza i meccanismi di separazione cellulare è rappresentato dalla posizione del massimo della velocità all'interno del microcanale.

Come illustrato in [Figura 29](#), il passaggio del flusso attraverso la curvatura del microcanale determina una riorganizzazione del campo di velocità, con il massimo che si localizza in prossimità della parete esterna e una progressiva perdita di simmetria rispetto all'asse verticale. Tale asimmetria risulta sempre più evidente all'aumentare della portata e, quindi, della velocità del fluido, evidenziando l'influenza dei regimi di moto sulle caratteristiche del flusso. Questa redistribuzione genera un significativo gradiente di velocità tra la regione centrale del canale e le zone prossime alle pareti, con effetti rilevanti sulla dinamica del sistema. Nella [Figura 30](#) è inoltre riportata la sezione di output.

In particolare, il gradiente di velocità determina uno squilibrio di pressione all'interno della sezione trasversale caratterizzato da una pressione statica inferiore lungo la parete esterna rispetto a quella interna. Tale differenza di pressione contribuisce in maniera determinante alla generazione di forze trasversali che influenzano il trasporto delle particelle, consentendone la separazione in base alle dimensioni.

I risultati sono coerenti con quelli presentati nel [paragrafo 1.7.2](#) per i microcanali a spirale, nei quali è stato discusso come squilibri di pressione e le variazioni del campo di velocità rappresentino fattori determinanti nella generazione dei vortici di Dean e dei flussi secondari.

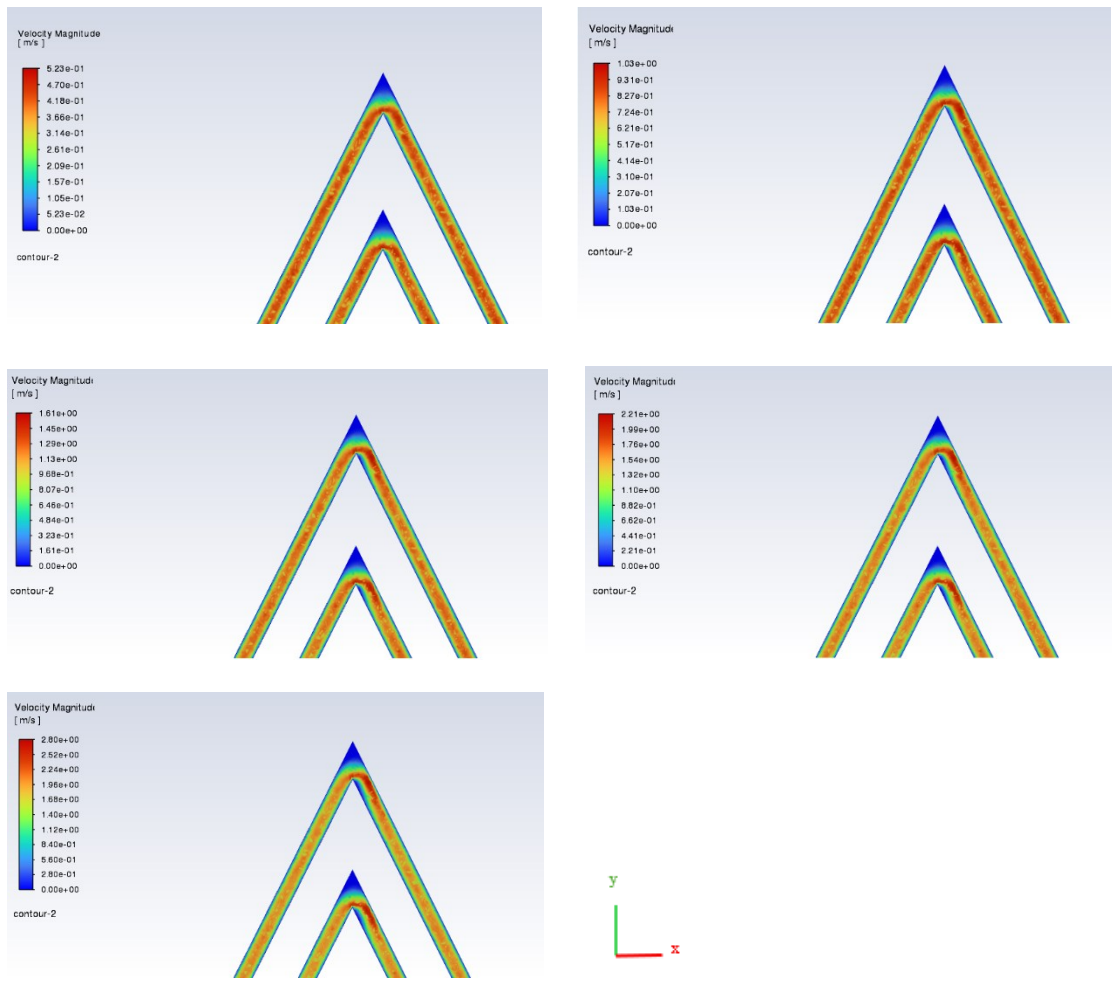


Figura 29: Profili di velocità nelle sezioni del microcanale nel piano xy, al variare della portata (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{L}/\text{min}$). Le regioni rosse indicano zone caratterizzate da elevata velocità e quelle in blu zone a bassa velocità.

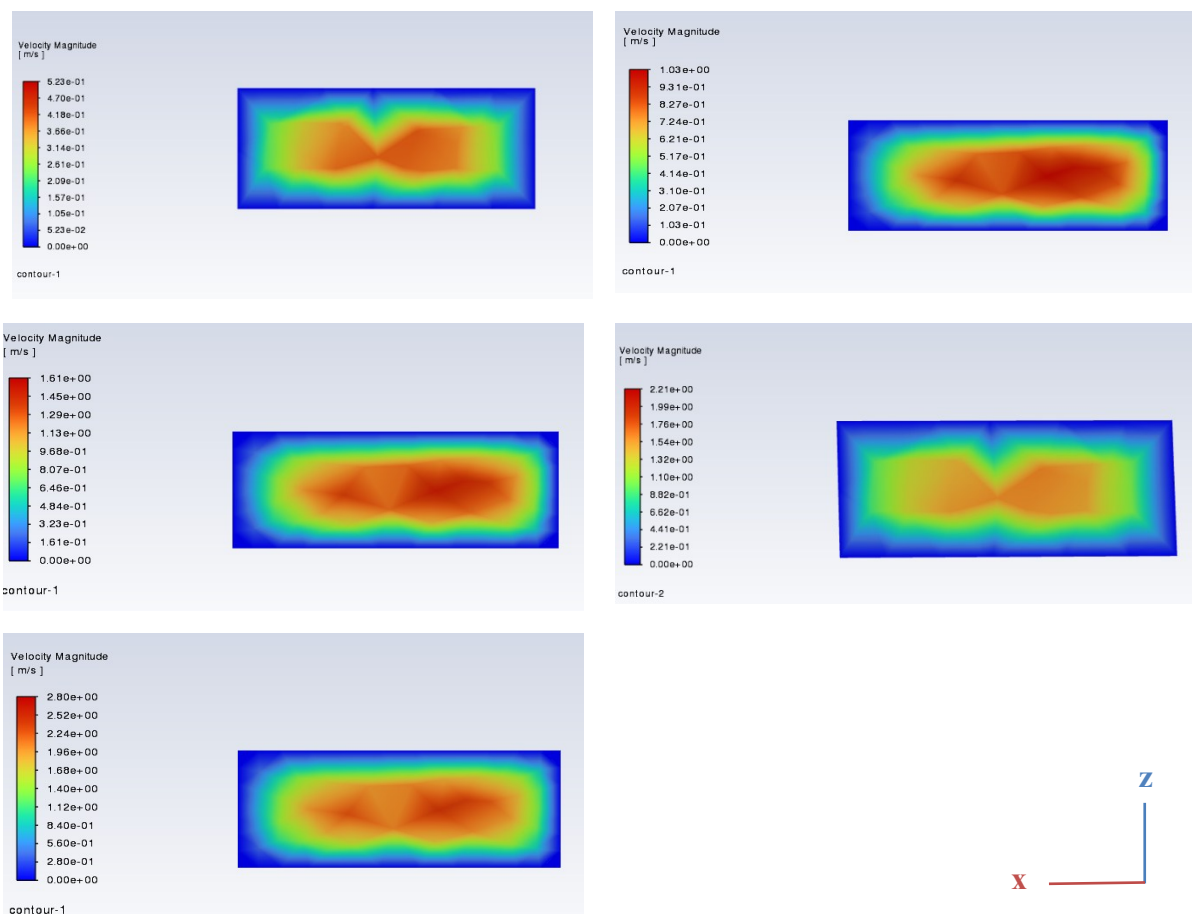


Figura 30 Profili di velocità sezione di outlet al variare della portata (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{L}/\text{min}$).

2.7 Risultati del tracciamento particellare

Come discusso nel [paragrafo 1.7.2](#), nei microcanali con angoli di curvatura la migrazione delle particelle dipende dall'interazione di due forze, F_L e F_D , la cui intensità è funzione sia della dimensione delle particelle ($F_L \propto a_p^4$ e $F_D \propto a_p$) e sia della velocità del flusso.

I grafici riportati in [Figura 31](#) mostrano l'andamento dell'intensità di F_L e F_D in funzione della portata e del diametro particellare.

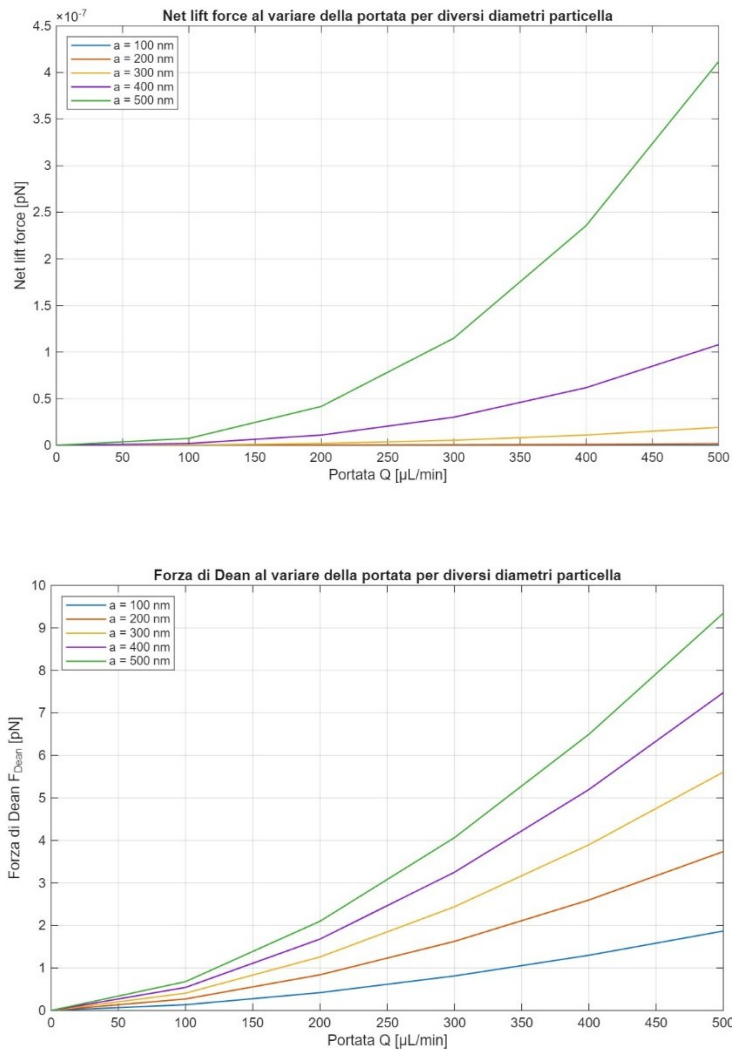


Figura 31: Forza di Lift e Forza di Dean al variare della portata volumetrica e della dimensione delle particelle.

L'analisi dei risultati evidenzia come l'aumento della portata in ingresso del flusso influenzi in modo sistematico il regime di migrazione particellare, modificando il bilanciamento tra forza di sollevamento inerziale F_L e forza di Dean F_D . In particolare, all'aumentare della portata si osserva un progressivo incremento dell'intensità dei vortici di Dean, con conseguente predominanza della forza F_D rispetto a F_L , che induce una migrazione laterale più marcata delle particelle verso la parete esterna del canale.

Dal punto di vista quantitativo, è possibile identificare una portata critica di focalizzazione, compresa tra 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, oltre la quale si osserva la transizione da una distribuzione

diffusa delle particelle a una configurazione progressivamente più allineata. Infatti, a $100 \mu\text{L}/\text{min}$ le particelle risultano distribuite in modo disordinato, indicando che l'intensità dei vortici secondari è insufficiente a indurre una focalizzazione stabile. Al contrario, nel range $200\text{--}500 \mu\text{L}/\text{min}$, l'incremento del numero di De favorisce la formazione di vortici secondari più intensi, che inducono una migrazione laterale più marcata delle particelle lungo le strutture di flusso, portandole ad allinearsi in posizioni di equilibrio localizzate in prossimità della parete esterna del canale, come mostrato in [Figura 32](#).

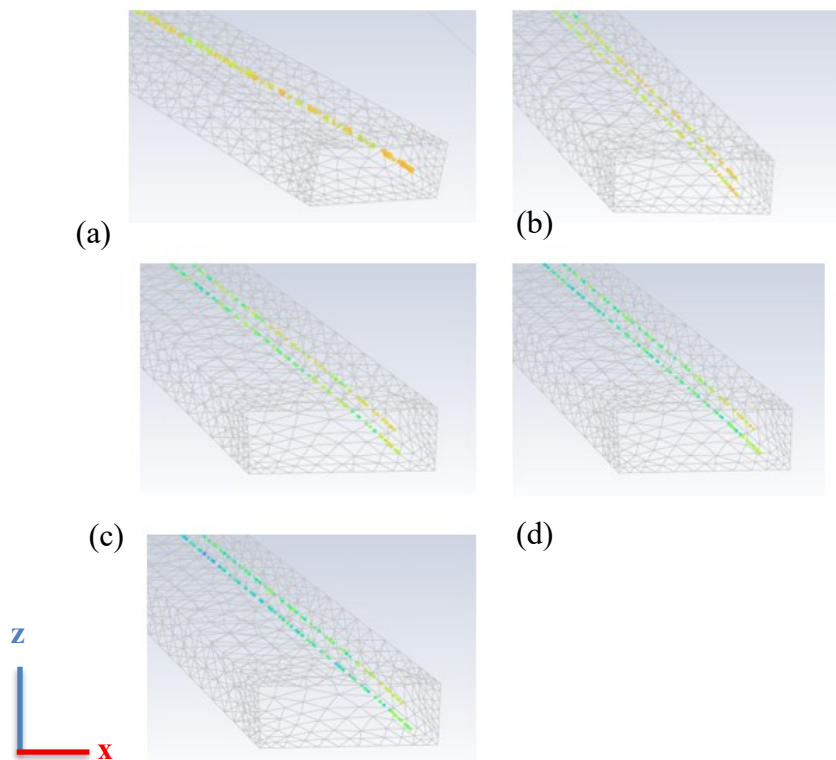


Figura 32: Distribuzione delle particelle nei microcanali per diverse portate in ingresso: (a) $100 \mu\text{L}/\text{min}$, (b) $200 \mu\text{L}/\text{min}$, (c) $300 \mu\text{L}/\text{min}$, (d) $400 \mu\text{L}/\text{min}$, (e) $500 \mu\text{L}/\text{min}$.

Un ulteriore parametro quantitativo significativo è rappresentato dal numero di loop necessari al raggiungimento della focalizzazione. I risultati mostrano una riduzione sistematica di tale numero all'aumentare della portata: si passa infatti da 5 loop a $100 \mu\text{L}/\text{min}$ a 3 loop per portate pari o superiori a $300 \mu\text{L}/\text{min}$. Questo comportamento indica che l'incremento della velocità del flusso accelera il processo di allineamento particellare, riducendo la lunghezza caratteristica necessaria per il raggiungimento delle posizioni di equilibrio.

Portata	Numero di loop necessari
100 $\mu\text{L}/\text{min}$	5
200 $\mu\text{L}/\text{min}$	4
300 $\mu\text{L}/\text{min}$	3
400 $\mu\text{L}/\text{min}$	3
500 $\mu\text{L}/\text{min}$	3

Tabella 3: Portate in ingresso e i corrispettivi numeri minimi di triangoli necessari per la focalizzazione.

Capitolo 3: Fabbricazione del dispositivo microfluidico

Il presente capitolo è dedicato alla fase di fabbricazione del dispositivo, documentata da immagini acquisite al microscopio ottico e a fluorescenza, che consentono una caratterizzazione qualitativa e quantitativa delle principali geometrie del dispositivo. In particolare, sono riportate le misure di interesse, fondamentali per la corretta validazione del prototipo e per garantire la coerenza tra progetto teorico e realizzazione sperimentale.

Il punto di partenza è lo sviluppo di un modello tridimensionale del chip basato sulle specifiche di progetto.

Dal modello CAD è stato generato il G-code, necessario per l'esecuzione su una macchina utensile a CNC. Il G-code traduce il modello digitale in istruzioni precise, definendo i movimenti della macchina, le coordinate spaziali (x, y, z) da raggiungere, la velocità di avanzamento, il tipo di interpolazione (lineare o circolare) e operazioni accessorie quali l'accensione del mandrino, il cambio utensile o l'attivazione di sistemi ausiliari.

La macchina utensile impiegata consente l'uso di punte di diverso diametro e tipo: selezionate in funzione della geometria e delle dimensioni dello scavo da realizzare.

In particolare, per la lavorazione sono stati adottati parametri operativi ottimizzati, con velocità di avanzamento pari a 100 mm/min e velocità di rotazione dell'utensile fissata a 20.000 rpm.

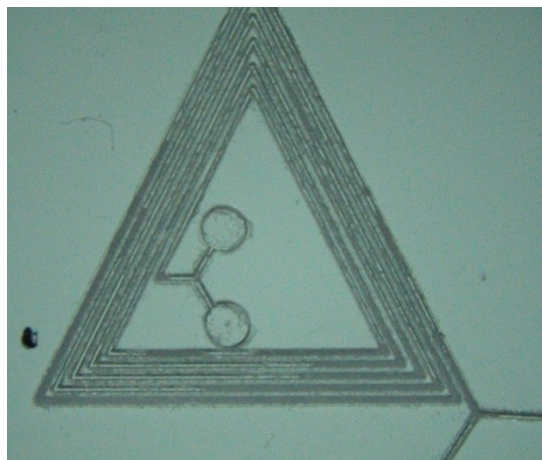
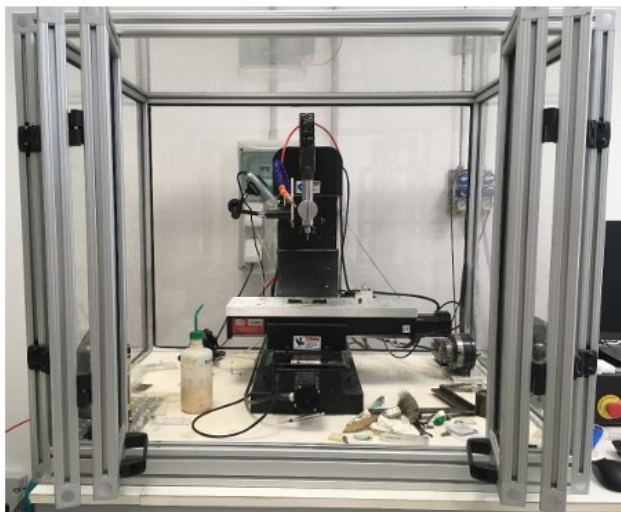


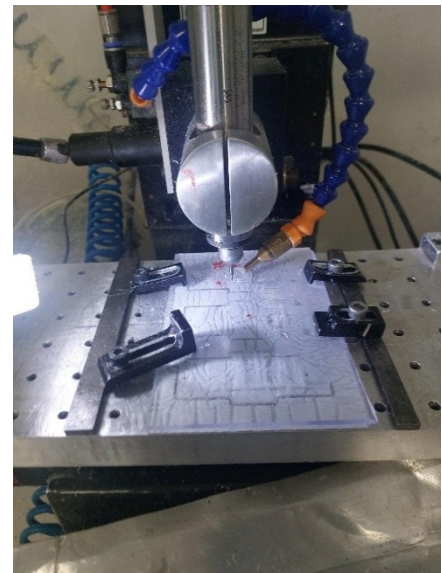
Figura 33: Vista del microchip realizzato.

Per la realizzazione dei microcanali è stata impiegata la microfresatrice *Minitech* (Figura 34(a)), una macchina CNC capace di interpretare ed eseguire con precisione il G-code. La lavorazione è stata effettuata utilizzando una punta ad alta precisione della ditta *Alfatool*, con diametro di 100 μm , selezionata per garantire elevata definizione geometrica, uniformità delle superfici interne e rispetto rigoroso delle tolleranze micrometriche previste dal progetto.

Il processo di lavorazione ha inizio con il corretto posizionamento del pezzo sul piano della microfresatrice, che viene successivamente vincolato tramite apposite clip di fissaggio (Figura 34(b)). Tale accorgimento assicura stabilità durante l'operazione e previene eventuali danni al materiale, quali deformazioni o rotture, che potrebbero verificarsi a seguito del contatto tra l'utensile e il substrato.



(a)



(b)

Figura 34: Minitech Mini-Mill/GX (a) Posizionamento del pezzo sul piano della microfresatrice(b).

Il G-code viene fornito in input alla macchina, dando avvio alla fase preliminare di programmazione del percorso utensile. Si procede all'azzeramento degli assi, con particolare attenzione all'asse z, operazione cruciale per garantire il corretto controllo della profondità dei canali durante l'intera lavorazione. A tal fine, l'utensile viene avvicinato con precisione alla superficie del pezzo, abbassato gradualmente fino a stabilire un contatto controllato con la

superficie. Concluse queste microregolazioni, il G-code può essere avviato per l'esecuzione effettiva della fresatura, assicurando accuratezza dimensionale e uniformità dei canali.

Il materiale scelto per la realizzazione del LOC è il Polimetilmetacrilato (PMMA), un polimero termoplastico trasparente, rigido e incolore, ampiamente impiegato come alternativa al vetro grazie alle sue eccellenti proprietà ottiche e meccaniche (Figura 35). In particolare, l'elevata trasparenza del PMMA consente un'agevole osservazione del flusso all'interno dei canali, mentre la sua buona lavorabilità lo rende particolarmente idoneo alla realizzazione di geometrie microfluidiche complesse, garantendo precisione dimensionale e superfici interne di qualità elevata. [16]

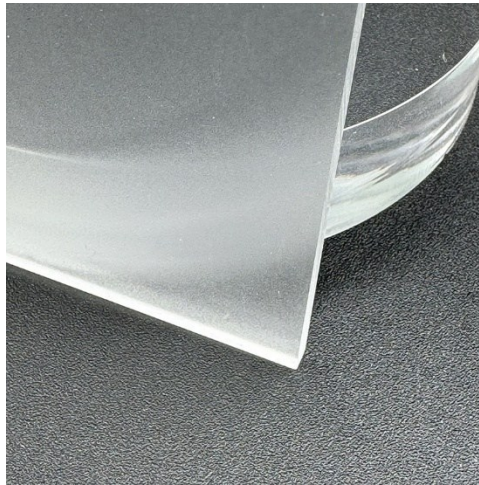


Figura 35: Polimetilmetacrilato (PMMA).

3.1 Validazione del dispositivo

Al termine del processo di realizzazione, il chip è stato sottoposto a un primo trattamento di pulizia mediante immersione in isopropanolo puro a temperatura ambiente, volto a rimuovere eventuali residui superficiali. Successivamente, è stato effettuato un lavaggio in macchina a ultrasuoni per circa 10–15 minuti, impiegando isopropanolo puro come detergente di lavaggio (Figura 36), al fine di garantire la completa detersione delle superfici interne del microcanale e assicurare la conformità alle specifiche di qualità previste.



Figura 36: Macchina a ultrasuoni utilizzata nella cleanroom.

In conclusione, è stata effettuata un'analisi dimensionale dei canali per valutare la precisione della realizzazione. Le immagini sono state acquisite ed elaborate mediante un microscopio a fluorescenza Zeiss (Figura 37), permettendo la misurazione accurata dei principali parametri geometrici di interesse.

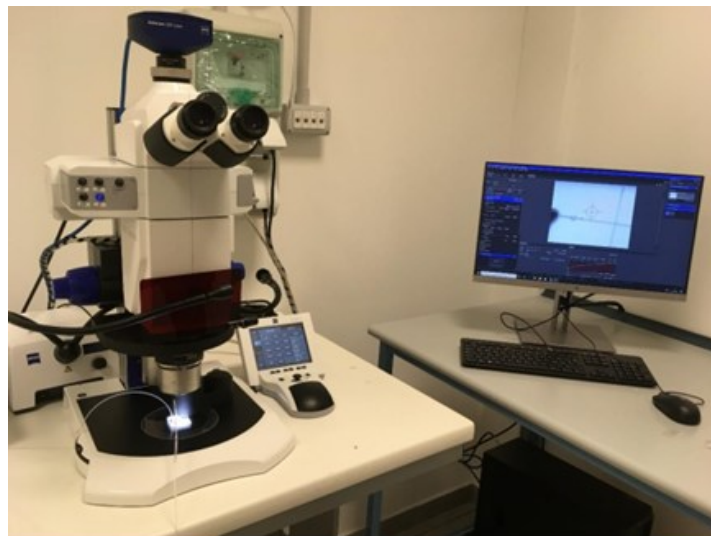


Figura 37: Microscopio a fluorescenza Zeiss.

3.2 Realizzazione e caratterizzazione dimensionale del dispositivo microfluidico

La realizzazione del dispositivo è stata effettuata mediante un processo di microlavorazione su un substrato plastico.

Considerate le dimensioni del canale, pari a $110\ \mu\text{m}$, la lavorazione è stata eseguita mediante elevate velocità di rotazione, basse velocità di avanzamento e passate di asportazione leggere.

Dall'analisi preliminare è emerso che la realizzazione del dispositivo, caratterizzato da cinque elementi triangolari, ha presentato una notevole complessità operativa, dovuta alla limitata distanza tra i percorsi utensile (pari a $300\ \mu\text{m}$) e ai movimenti ravvicinati della punta durante la transizione tra un triangolo e il successivo (Figura 38).

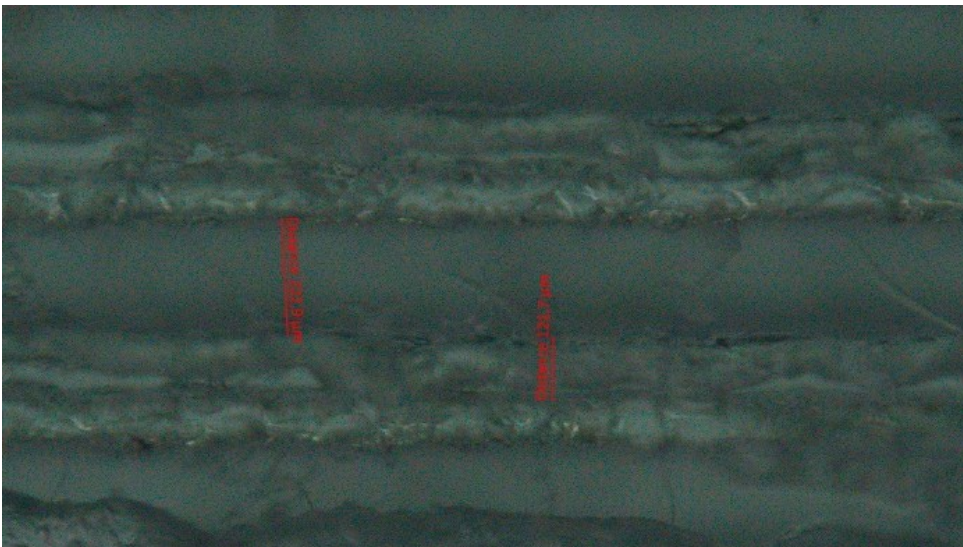


Figura 38: Immagini al microscopio relative alla prima prova di fabbricazione del dispositivo.

Alla luce delle criticità emerse durante le prove preliminari, la distanza intercanale è stata incrementata a 500 μm al fine di facilitare i movimenti della macchina utensile e migliorare la gestione dei percorsi durante il processo di fabbricazione (Figura 39).

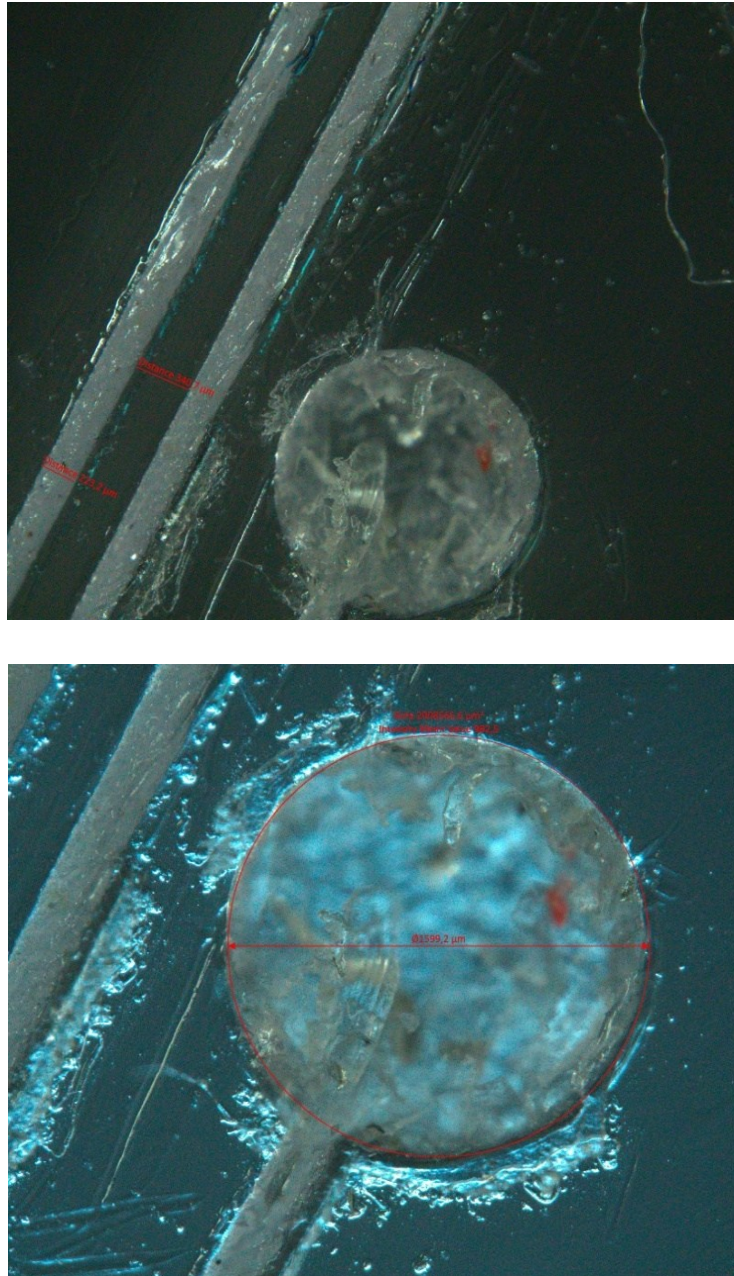


Figura 39: Immagini al microscopio relative alla prova di fabbricazione con distanza inter-canale pari a 500 μm . Nonostante le accortezze prese, la dimensione dei canali ottenute non corrispondeva a quella di progetto. Al fine di ridurre le discrepanze riscontrate si è proceduto a un lieve incremento della larghezza del canale. Le geometrie dei canali sono state ridimensionate ottenendo tre configurazioni con larghezze pari a 112, 113 e 130 μm , mantenendo la spaziatura intercanale

fissata a 500 μm ; i risultati corrispondenti sono rispettivamente riportati nelle Figure 40, 41 e 42.

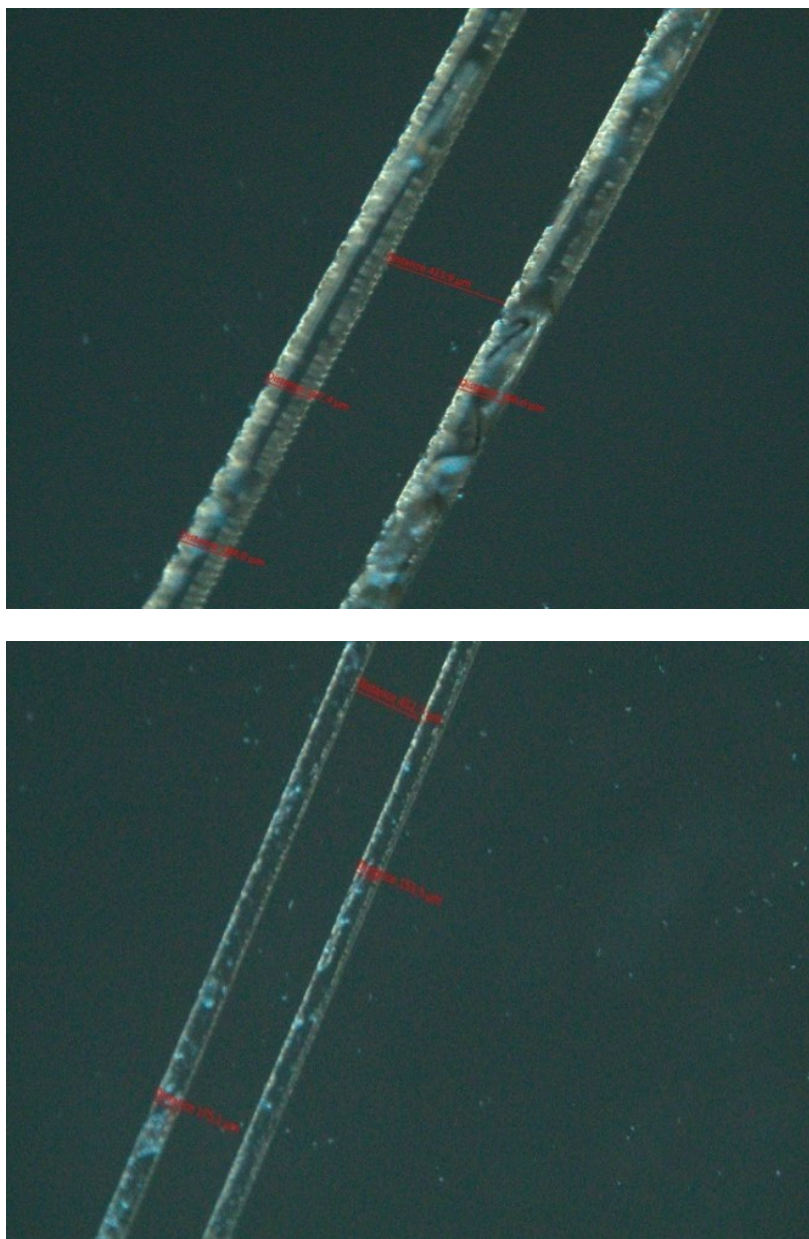


Figura 40: Immagini al microscopio relative alla prova di fabbricazione con larghezza del canale di 112 μm .

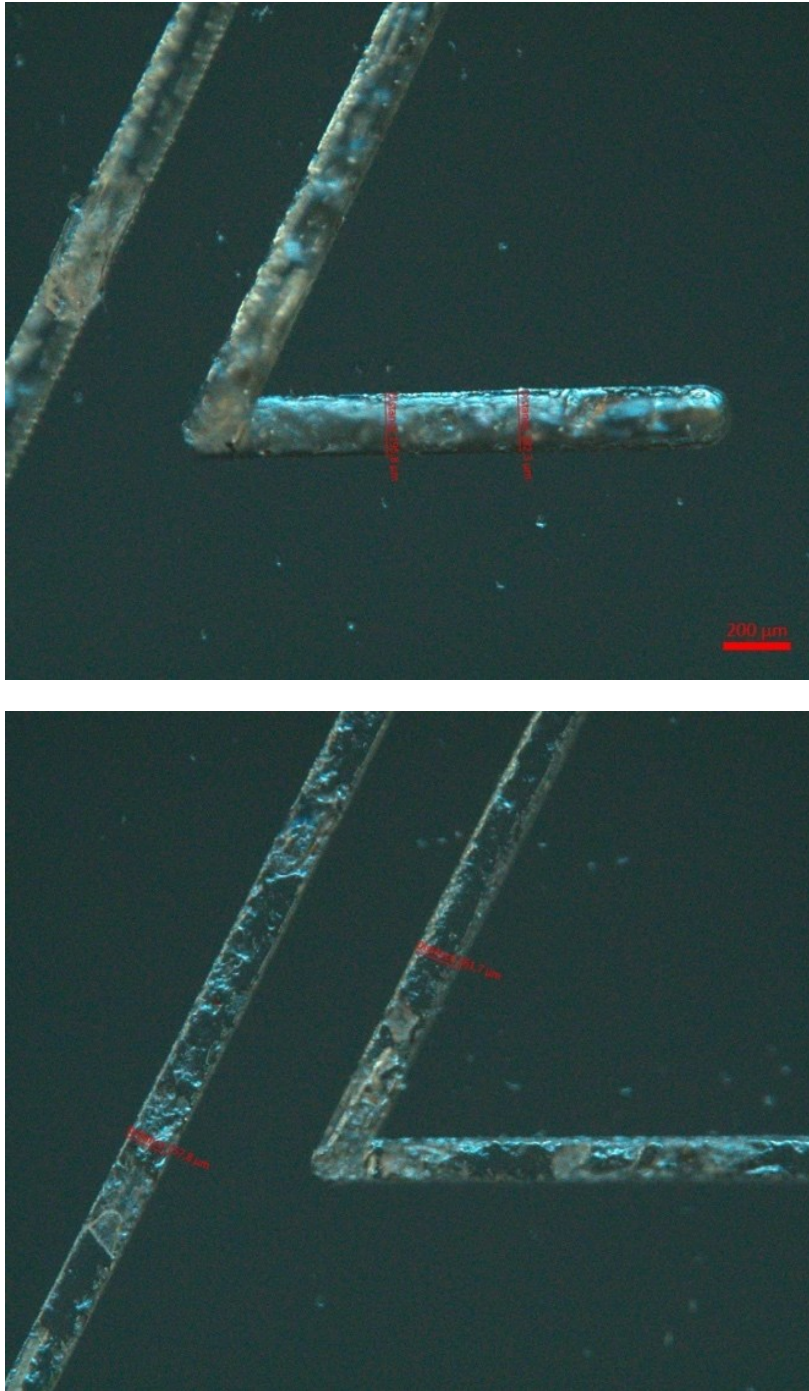


Figura 41: Immagini al microscopio relative alla prova di fabbricazione con larghezza del canale di $113\mu\text{m}$.

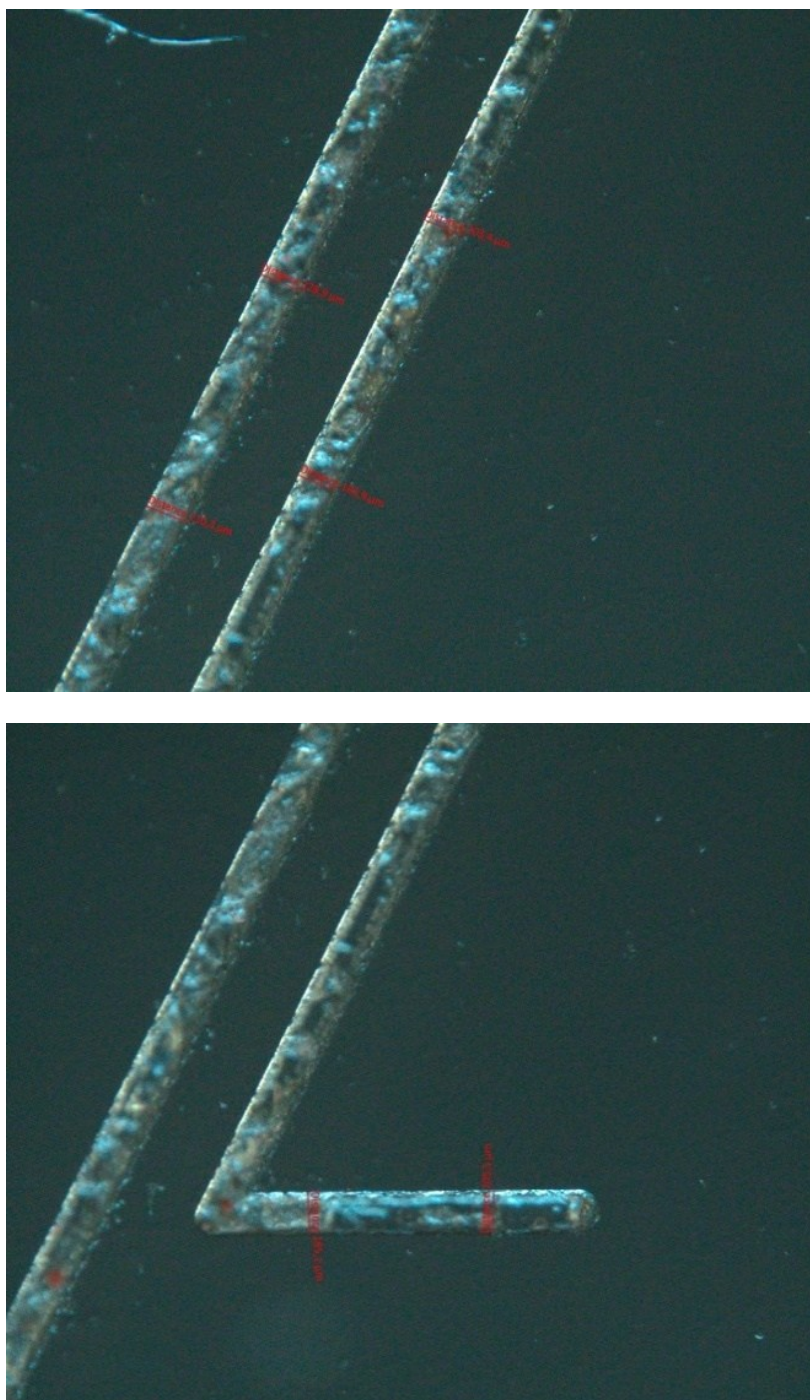


Figura 42: Immagini al microscopio relative alla prova di fabbricazione con larghezza del canale di 130 μm .

In tutte e tre le configurazioni dimensionali, i canali realizzati presentano uno scostamento rispetto ai valori progettuali. Tale discrepanza può essere attribuita alle limitazioni intrinseche del processo di lavorazione e alle tolleranze operative dello strumento utilizzato, fattori che possono influenzare la precisione finale delle geometrie ottenute.

Capitolo 4: Conclusioni

Il presente lavoro si colloca nell'ambito dello sviluppo di dispositivi LOC passivi per applicazioni di separazione microfluidica in regime inerziale, con particolare riferimento alla progettazione e analisi numerica di una configurazione per la focalizzazione particellare.

È stata progettata e analizzata una configurazione microfluidica basata su microcanali a sezione rettangolare con angoli retti, scelta supportata da studi precedenti [10], [13] e compatibile con i vincoli di fabbricazione. L'analisi numerica, condotta mediante simulazioni fluidodinamiche, ha permesso di identificare i principali parametri che influenzano il processo di focalizzazione, tra cui portata, geometria e lunghezza del canale.

Come già evidenziato la focalizzazione è strettamente legata alla formazione di flussi secondari indotti dalle curvature del canale e alla conseguente redistribuzione del campo di velocità, che determina gradienti di pressione responsabili delle forze trasversali agenti sulle particelle. In particolare, è stata individuata una portata critica compresa tra 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, oltre la quale si osserva la transizione da una distribuzione dispersa a una configurazione focalizzata. Per portate pari o superiori a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, si osserva la formazione di posizioni di equilibrio stabili in prossimità della parete esterna del microcanale, con un progressivo miglioramento dell'allineamento all'aumentare della portata.

Dal punto di vista quantitativo, l'incremento della portata determina una progressiva riduzione del numero di loop necessari per il raggiungimento della focalizzazione, che passa da 5 a 3 nel range analizzato, evidenziando una diminuzione della lunghezza caratteristica del processo.

Nel complesso, l'introduzione di indicatori quali la portata critica di focalizzazione, il numero di loop necessari all'allineamento e la localizzazione delle posizioni di equilibrio consente di trasformare l'analisi da puramente qualitativa a quantitativa, migliorando la confrontabilità dei risultati e la robustezza delle conclusioni.

Un limite significativo del presente studio è rappresentato dall'assenza di una validazione sperimentale del dispositivo, che non consente di confermare in modo definitivo le prestazioni di separazione ottenute numericamente. Le simulazioni, sebbene coerenti con i principi della microfluidica inerziale, non sono sufficienti a descrivere completamente il comportamento reale del sistema in condizioni operative.

Pertanto, i risultati ottenuti devono essere considerati come una valutazione numerica preliminare della configurazione proposta, e non come una dimostrazione sperimentale delle prestazioni del dispositivo.

In questa prospettiva, futuri sviluppi dovranno includere una validazione sperimentale sistematica e un confronto diretto con i risultati numerici, al fine di verificare l'efficacia della soluzione proposta e consolidare le potenziali applicazioni.

Bibliografia

- [1] Chiriaco M.S., Bianco M., Nigro A., Primiceri E., Ferrara F., Romano A., Quattrini A., Furlan R., Arima V., Maruccio G., *Lab-on-Chip for Exosomes and Microvesicles Detection and Characterization*, *Sensors*, 18 (2018), 3175. <https://doi.org/10.3390/s18103175>
- [2] Tang W., Zhu S., Jiang D., Zhu L., Yang J., Xiang N., *Channel innovations for inertial microfluidics*, *Lab on a Chip*, 20 (2020), 3485-3499. <https://doi.org/10.1039/d0lc00714e>
- [3] Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O'Driscoll L., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV 2023): From basic to advanced approaches*, *Journal of Extracellular Vesicles*, 13 (2024), e12404. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>
- [4] Bianciardi S., Merlotti D., Materozzi M., *Vescicole extracellulari e metabolismo osseo: ruolo e possibili implicazioni cliniche*, *L'Endocrinologo*, 22 (2021), 28-33. <https://doi.org/10.1007/s40619-021-00817-4>
- [5] Berumen Sánchez G., Bunn K.E., Pua H.H., Rafat M., *Extracellular vesicles: mediators of intercellular communication in tissue injury and disease*, *Cell Communication and Signaling*, 19 (2021), 104. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00787-y>
- [6] Di Carlo D., Irimia D., Tompkins R.G., Toner M., *Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (2007), 18892-18897. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704958104>
- [7] Petruzzellis I., Martínez Vázquez R., Caragnano S., Gaudioso C., Osellame R., Ancona A., Volpe A., *Lab-on-Chip Systems for Cell Sorting: Main Features and Advantages of Inertial Focusing in Spiral Microchannels*, *Micromachines*, 15 (2024) 1135. <https://doi.org/10.3390/mi15091135>
- [8] Bhagat A.A.S., Kuntaegowdanahalli S., Papautsky I., *Enhanced particle filtration in straight microchannels using shear-modulated inertial migration*, *Physics of Fluids*, 20 (2008). <https://doi.org/10.1063/1.2998844>
- [9] Mishra S., Mukherjee J., Chaturvedi D., Jain R., Dandekar P., *The mechanisms and properties of inertial microfluidics: from fundamental models to biomedical applications*, *Microfluidics and Nanofluidics*, 27 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10404-023-02692-x>
- [10] Bazaz S.R., Mihandust A., Salomon R., Joushani H.A.A.N., Li W., Amiri H.A., Mirakhorli F., Zhand S., Shrestha J., Miansari M., Thierry B., Jin D., Warkiani M.E., *Zigzag microchannel for rigid inertial separation and enrichment (Z-RISE) of cells and particles*, *Lab on a Chip*, 22 (2022). <https://doi.org/10.1039/d2lc00290f>
- [11] Amini H., Lee W., Di Carlo D., *Inertial microfluidic physics*, *Lab on a Chip*, 14 (2014). <https://doi.org/10.1039/c4lc00128a>

- [12] Nivedita N., Ligrani P., Papautsky I., *Dean flow dynamics in low-aspect ratio spiral microchannels*, Scientific Reports, 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep44072>
- [13] Khodayari A., Ebrahimi S., Topaheidari M., Shamloo A., *High-throughput microfluidics for precise separation and focusing of circulating tumor cells with optimized triangular microchannel design*, Talanta (2025), in press.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128022>
- [14] Hua X., Zhu Q., Liu Y., Zhou S., Huang P., Li Q., Liu S., *A double tangential flow filtration-based microfluidic device for highly efficient separation and enrichment of exosomes*, Analytica Chimica Acta, 1258 (2023) 341160. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341160>
- [15] Yildiz-Ozturk E., Yesil-Celiktas O., *Diffusion phenomena of cells and biomolecules in microfluidic devices*, Biomicrofluidics, 9 (2015). <https://doi.org/10.1063/1.4923263>
- [16] Hajduk B., Bednarski H., Jarka P., Janeczek H., Godzierz M., Tański T., *Thermal and optical properties of PMMA films reinforced with Nb₂O₅ nanoparticles*, Scientific Reports, 11 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01282-7>
- [17] Papkov V., Shadymov N., Pashchenko D., *CFD-modeling of fluid flow in ANSYS Fluent using Python-based code for automation of repeating calculations*, International Journal of Modern Physics C, 34 (2023). <https://doi.org/10.1142/S0129183123501140>
- [18] Erickson D., *Towards numerical prototyping of labs-on-chip: modeling for integrated microfluidic devices*, Microfluidics and Nanofluidics, 1 (2005).
<https://doi.org/10.1007/s10404-005-0041-z>
- [19] Çengel Y.A., Cimbala J.M., *Meccanica dei fluidi*, McGraw-Hill, 2010, pp. 257–332.
- [20] ANSYS Inc., *Fluent Theory Guide*, ANSYS Help Documentation.
https://ansyshelp.ansys.com/public/account/secured?returnurl=/Views/Secured/corp/v242/en/flu_th/flu_th.html
- [21] Shyy W., Garbey M., Appukuttan A., Wu J., *Evaluation of Richardson extrapolation in computational fluid dynamics*, Numerical Heat Transfer, Part B: Fundamentals, 58 (2010).
<https://doi.org/10.1080/104077902317240058>

