

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA
DIPARTIMENTO DI PRINCIPI E IMPIANTI DI INGEGNERIA CHIMICA
“I. SORGATO”



TESI DI LAUREA IN INGEGNERIA CHIMICA
(Laurea triennale DM 509/99)

VALIDAZIONE DI UNO SCAMBIATORE DI GAS A
MEMBRANA REALIZZATO CON TECNOLOGIA
MICROFLUIDICA

Relatore: Ing. Nicola Elvassore

Correlatore: Ing. Federica Michielin

Laureando: Riccardo De Angeli

Anno Accademico 2010-2011

Riassunto

In questo lavoro di tesi viene studiato uno scambiatore di ossigeno a membrana, realizzato tramite tecnologia microfluidica, al fine di trovare i parametri operativi che ne regolano il processo di scambio dell'ossigeno e di ottimizzare le condizioni operative per ottenere una rapida variazione della concentrazione di ossigeno nella fase liquida.

Si descrive il modello matematico utilizzato per determinare il profilo della concentrazione di ossigeno in stato stazionario all'interno dello scambiatore e si conducono prove sperimentali per determinare l'efficienza di scambio. Si valuta inoltre la rapidità della risposta dinamica ad un disturbo a gradino nella fase gassosa e si individuano i valori dei parametri operativi che meglio soddisfano le richieste sperimentali.

Indice

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 – Introduzione e stato dell’arte	3
1.1 L’OSSIGENO NELLE COLTURE CELLULARI	3
1.2 TECNOLOGIA MICROFLUIDICA	3
1.3 SCAMBIATORI D’OSSIGENO MICROFLUIDICI: STATO DELL’ARTE	5
1.4 SCAMBIATORE DI OSSIGENO A MEMBRANA	7
1.5 SCOPO E MOTIVAZIONI DELLA TESI	9
CAPITOLO 2 – Materiali e metodi	11
2.1 PRODUZIONE DELLA PIATTAFORMA MICROFLUIDICA	11
2.1.1 Produzione dello strato del liquido	11
2.1.1.1 Fotolitografia	11
2.1.1.2 Wet-etching	12
2.1.2 Produzione della membrana	13
2.1.3 Produzione dello strato della fase gas	14
2.1.4 Tecnica di adesione al plasma	14
2.2 MISURA DELLA CONCENTRAZIONE DI OSSIGENO DISCOLTO	15
2.2.1 Principio di funzionamento	15
2.2.2 Sonda a fluorescenza	16
2.2.3 Taratura della sonda	17
2.3 REGOLAZIONE DELLE PORTATE DELLA FASI LIQUIDA E GASSOSA.	19
2.3.1 Pompa a siringa	20
2.3.2 Flussimetri digitali	20
CAPITOLO 3 – Modello matematico	23
3.1 DEFINIZIONE DEL SISTEMA	23
3.2 BILANCI DI MATERIA	24
3.3 IMPLEMENTAZIONE DEL MODELLO MATEMATICO	26
3.3.1 Coefficiente di scambio di materia nella fase liquida	26
3.3.2 Costanti utilizzate	27
3.3.3 Risultati	27
3.3.3.1 Dipendenza dalla portata	27
3.3.3.2 Dipendenza dalla profondità dei canali	29
3.3.3.3 Dipendenza dalla concentrazione di ossigeno in fase gassosa	29
3.4 EFFICIENZA DI SCAMBIO	30

CAPITOLO 4 – Prove sperimentali	33
4.1 METODO DI CONDUZIONE DELLE PROVE	33
4.1.1 Preparazione della strumentazione	33
4.1.2 Procedura	34
4.2 RISULTATI	35
4.2.1 Stimoli ipossici	35
4.2.2 Stimoli con concentrazioni variabili in fase gas	36
4.2.3 Valutazione della dinamica del processo	37
CONCLUSIONI	41
APPENDICE A	43
NOMENCLATURA	49
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	51

Introduzione

Gli studi su culture cellulari *in vitro* necessitano di strumenti in grado di controllare in tempo reale la concentrazione di ossigeno disciolto nel *medium* di coltura. In questo lavoro di tesi verrà testata una piattaforma microfluidica in grado di controllare la concentrazione di ossigeno di una fase liquida per ottenere una bassa concentrazione di ossigeno in uscita nel più breve tempo possibile. Lo scambio di ossigeno avviene tramite una sottile membrana polimerica con una riserva di gas a pressione parziale di ossigeno nota.

Nel Capitolo 1 verrà illustrata l'importanza del controllo della concentrazione di ossigeno nelle colture cellulari *in vitro*; si spiegheranno i vantaggi delle tecniche microfluidiche in questo campo e i dispositivi finora sviluppati. Si illustrerà infine la struttura della piattaforma e si discuteranno le motivazioni e lo scopo di questo lavoro.

Nel Capitolo 2 verranno illustrate le tecniche di microfabbricazione impiegate per produrre la piattaforma testata e la strumentazione di controllo usata nelle prove sperimentali.

Nel Capitolo 3 verrà sviluppato un modello matematico che permette di tracciare i profili della pressione parziale di ossigeno all'interno della fase liquida che fluisce nella piattaforma, in condizioni di stato stazionario, al variare delle condizioni operative. Questo consentirà di individuare le condizioni operative che consentono di ottenere una pressione parziale di ossigeno in uscita inferiore al 5%.

Nel Capitolo 4 si descriverà l'apparato sperimentale e la metodologia seguita nell'effettuare le prove. Si riporteranno i risultati ottenuti e si calcolerà l'efficienza di scambio rispetto al modello teorico. Infine si individuerà la coppia di parametri altezza/portata che soddisfano le richieste sperimentali, ossia un'elevata riduzione di concentrazione e la rapidità del transiente.

CAPITOLO 1

Introduzione e stato dell'arte

In questo capitolo si illustrano l'importanza del controllo dell'ossigeno all'interno delle colture cellulari, le tecniche microfluidiche e alcune loro applicazioni in ambito biologico con particolare attenzione ai dispositivi realizzati per regolare il livello di ossigeno disciolto nel *medium* di coltura. Infine viene illustrata la struttura della piattaforma microfluidica studiata e si spiegheranno le motivazioni e lo scopo della tesi.

1.1 L'ossigeno nelle colture cellulari

L'ossigeno è una specie chimica fondamentale per la sopravvivenza e la crescita delle specie cellulari. In un ambiente di coltura *in vitro* che simuli l'ambiente *in vivo*, la condizione normossica è data da una concentrazione di ossigeno che va dal 12 al 0,5% in termini di pressione parziale. Al di sopra di tale intervallo si ha una condizione di iperossia, dannosa per la cellula, mentre al di sotto si ha la morte cellulare per mancanza di ossigeno (ipossia) (Nock *et al.*, 2008).

All'interno di questo intervallo però, la concentrazione di ossigeno nell'ambiente di coltura ha una notevole influenza su molti processi cellulari, come la crescita cellulare, la differenziazione delle cellule staminali e la regolazione dei segnali cellulari (Muschler *et al.*, 2004).

Dato che l'ossigeno ha un ruolo chiave nelle dinamiche cellulari è fondamentale non solo regolare la sua concentrazione all'interno delle camere di coltura, ma anche essere in grado di impartire stimoli specifici per studiare la correlazione tra la variazione della pressione parziale di ossigeno e la variazione delle risposte cellulari stesse.

1.2 Tecnologia microfluidica

La microfluidica è una tecnologia che consente di lavorare con volumi di fluidi dell'ordine dei microlitri, usando canali delle dimensioni di alcune decine o centinaia di micrometri (Whitesides, 2006). In queste condizioni il sistema è caratterizzato da un numero di Reynolds (Re) inferiore a 2100 in quanto i fluidi si muovono all'interno dei canali in regime di moto laminare, completamente risolvibile attraverso le equazioni di

Navier-Stokes. Inoltre il ridotto volume dei canali determina una elevata superficie specifica che consente un rapido scambio di materia attraverso pareti permeabili. La combinazione di queste due caratteristiche consente di creare sistemi che presentano rapidi gradienti di materia ad elevata risoluzione, fino alla scala cellulare. In questo modo si possono controllare in modo localizzato le condizioni sperimentali del sistema e studiare le risposte cellulari a un determinato input esterno. È possibile per esempio impartire un rapido cambiamento della concentrazione di ossigeno per studiare la variazione dei flussi delle molecole segnale attraverso la membrana cellulare. Questo tipo di operazioni prevede che il *medium* di coltura fluisca all'interno del bioreattore rinnovandosi in continuazione, in colture cellulari statiche invece questo tipo di studi non sarebbe possibile poiché come in un reattore *batch* le concentrazioni dei componenti del fluido extracellulare cambiano nel tempo anche in assenza di input specifici (Kim et al., 2007).

Tabella 1.1: Valori di proprietà fisiche relative al PDMS e H₂O

Proprietà	PDMS	H ₂ O
Diffusione dell'ossigeno [m ² /s]	4.1×10^{-9}	2×10^{-9}
Permeabilità all'ossigeno [mol×m/m ² ×s×Pa]	1.59×10^{-13}	-
Solubilità dell'ossigeno (in equilibrio con aria atmosferica) [mol/m ³]	1.8	0.2
Densità [kg/m ³]	965	998

Il materiale più utilizzato per la produzione di piattaforme microfluidiche è il polidimetilsilossano (PDMS) in quanto oltre a essere biocompatibile e ad avere un'elevata permeabilità all'ossigeno (Tabella 1.1), grazie alla tecnica della soft litografia permette di produrre una serie di piattaforme uguali in modo rapido e a basso costo (Xia et al., 1998).

In Figura 1.1 è schematizzata la procedura di soft litografia mediante la quale si ottiene una piattaforma in PDMS sulla quale sono impressi dei microcanali. Essa si articola in diversi punti: si produce la fotomaschera sulla quale è disegnato il pattern dei canali (fotoresist positivo canali opachi e fondo trasparente), si deposita il fotoresist su di un wafer di silicio e lo si tratta con uno *spin-coater* per produrre uno strato uniforme dello spessore voluto, si tratta il fotoresist in una lampada UV per far polimerizzare le parti non coperte, si lava con solvente per eliminare il fotoresist non polimerizzato, infine si depone il PDMS sulla matrice e dopo che lo si è fatto reticolare si toglie lo stampo così ottenuto.

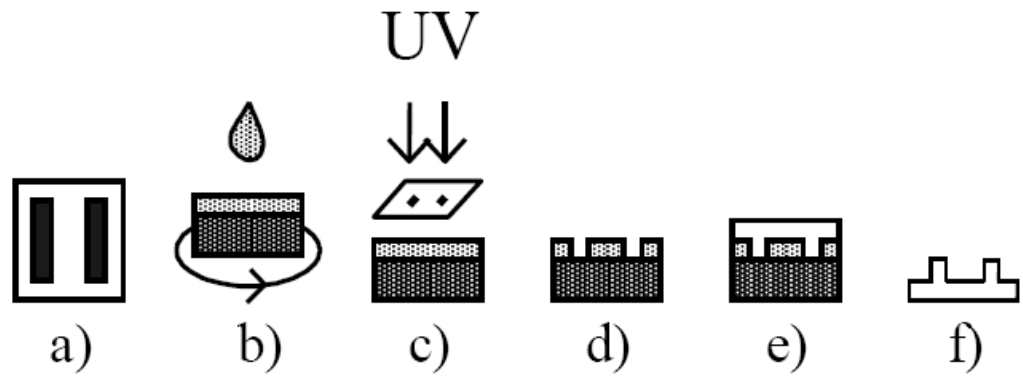


Figura 1.1: Schematizzazione dell'intero processo di soft-litografia: a) realizzazione della fotomaschera; b) deposizione del fotoresist su wafer di silicio tramite spin-coate; c) esposizione a raggi UV; d) sviluppo del master con opportuno solvente, con eliminazione delle zone non reticolate; e) deposizione del PDMS liquido e successiva reticolazione; f) ottenimento dello stampo solido in PDMS.

1.3 Scambiatori di ossigeno microfluidici: stato dell'arte

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi scambiatori di ossigeno microfluidici allo scopo di impartire gradienti spazio-temporali della pressione parziale di ossigeno in colture cellulari. Tutti questi dispositivi sono costituiti da piattaforme multistrato nelle quali il *medium* di coltura scorre in microcanali posti in una strato separato da un secondo strato in cui scorre la fase gas a pressione parziale di ossigeno nota. I due strati sono separati da una membrana in materiale siliconico, permeabile all'ossigeno, attraverso la quale avviene lo scambio. In Figura 1.2 è schematizzato il processo di scambio di ossigeno attraverso la membrana.

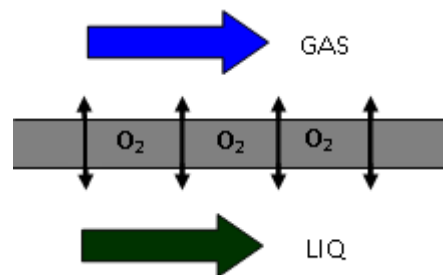


Figura 1.2: Schematizzazione dello scambio di ossigeno attraverso la membrana

Le maggiori differenze fra questi dispositivi consistono nelle geometrie dei microcanali e nelle condizioni operative utilizzate, in particolare la velocità del fluido, che regolano il profilo di concentrazione di ossigeno nei canali.

Vollmer *et al.* (2005) hanno realizzato una piattaforma per ossigenare una fase liquida tramite una fase gas che scorre vicino ad essa. I due fluidi scorrono in canali sovrapposti e lo scambio di ossigeno avviene attraverso una membrana di PDMS. La piattaforma è

dotata di sensori ottici incorporati che permettono di misurare la concentrazione di ossigeno in entrata e in uscita.

In Figura 1.3 è mostrato lo scambiatore nel suo complesso (d), una sezione dei microcanali (c), uno schema del loro percorso e uno schema che illustra il posizionamento dei sensori ottici.

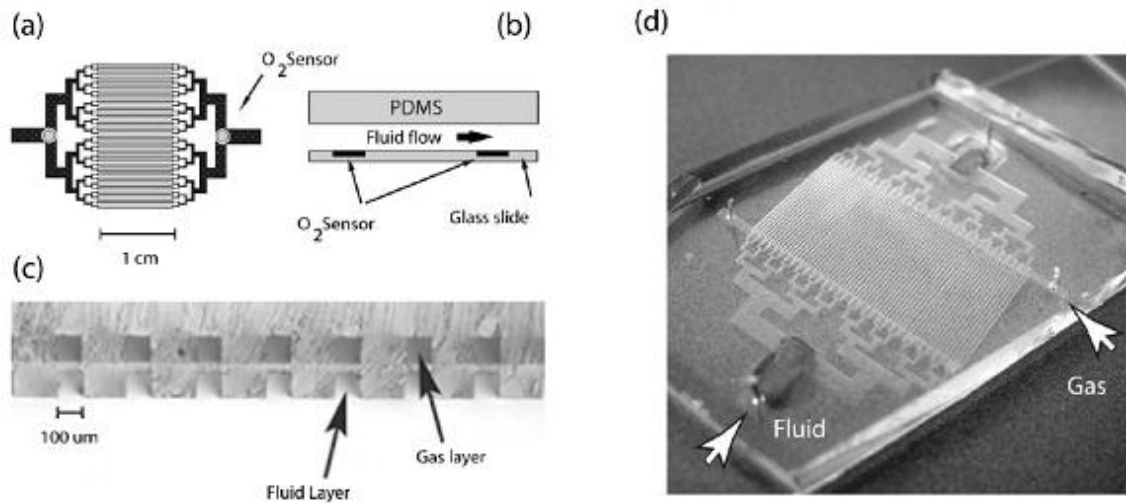


Figura 1.3: Ossigenatore microfluidico con sensore ottico incorporato. (a) Schematizzazione dei microcanali e localizzazione del sensore. (b) Sezione longitudinale della piattaforma microfluidica. (c) Sezione trasversale in cui si nota l'allineamento dei canali. (d) Visione complessiva della piattaforma.

Polinkovsy *et al.* (2009) hanno realizzato uno scambiatore in grado di produrre profili di concentrazione arbitrari nella fase liquida per lo studio della dipendenza della crescita della cultura dalla concentrazione di ossigeno nel *medium*. In questo caso lo strato della fase gassosa è costituito da una prima zona di *mixing* che genera diverse miscele di aria/azoto. In una seconda zona i canali del gas, contenenti ognuno una diversa miscela, intersecano perpendicolarmente quelli del liquido. In questo modo si crea un gradiente spaziale della concentrazione di ossigeno lungo i micro canali in cui scorre il *medium*. Nel caso si miscelino ossigeno e azoto si produce una variazione lineare della concentrazione lungo i canali della fase liquida. Se si miscelano aria e azoto (usando un' differente geometria per i microcanali) si ottiene un profilo di concentrazione di ossigeno che varia in modo esponenziale. In Figura 1.4a sono illustrate le geometrie dei due scambiatori mentre in Figura 1.4b è illustrato l'andamento della concentrazione d'ossigeno nella fase liquida in funzione del numero dei canali della fase gassosa che la intersecano, ossia dello spazio percorso dal liquido.

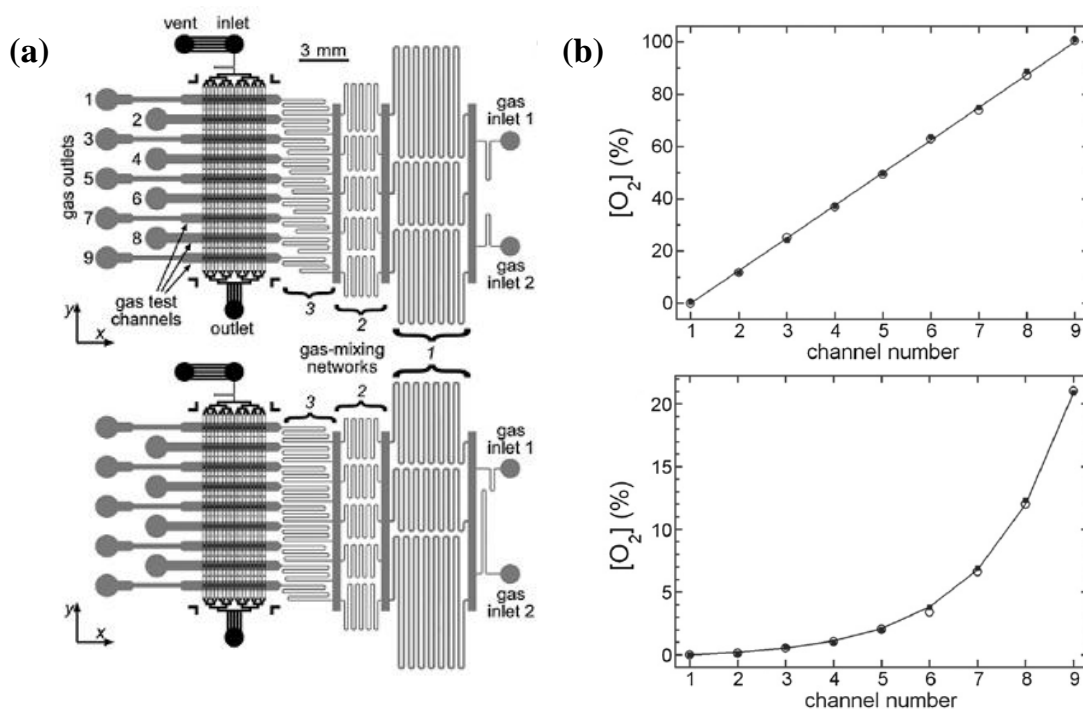


Figura 1.4: (a) Rappresentazione dei due dispositivi microfluidici per generare gradienti lineare (da 0 a 100%) ed esponenziale (da 0 a 20.9%) della concentrazione di ossigeno. (b) Profilo delle concentrazioni di ossigeno all'interno dei due dispositivi in funzione del numero di canali del gas, rilevate tramite fluorescenza.

1.4 Scambiatore di ossigeno a membrana

In questo lavoro di tesi si usa uno scambiatore di ossigeno progettato in un lavoro precedente (Michielin, 2010) (Figura 1.5). Questo scambiatore è stato progettato per imprimere a una coltura cellulare di cardiomiociti uno stimolo ipossico, con pressione parziale di ossigeno inferiore al 5%, nel più breve tempo possibile allo scopo di studiare la dinamica del flusso dello ione calcio (responsabile della contrazione cardiaca) attraverso la membrana cellulare in queste condizioni.

La piattaforma microfluidica è composta da tre strati sovrapposti (Figura 1.6): quello inferiore è costituito da un vetrino sul quale è impresso un pattern di microcanali dove scorre il liquido, sopra è posta una membrana in PDMS che permette lo scambio di ossigeno tra il liquido e il gas, e infine vi è lo strato di gas che scorre in una camera dalle pareti di silicone sigillata con un secondo vetrino.

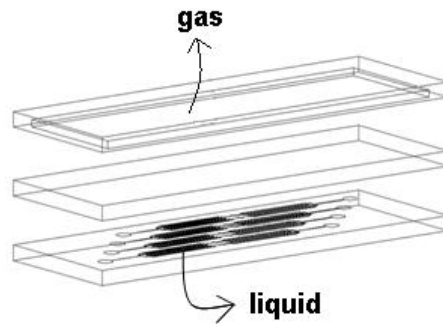


Figura 1.5: Schema delle parti della piattaforma

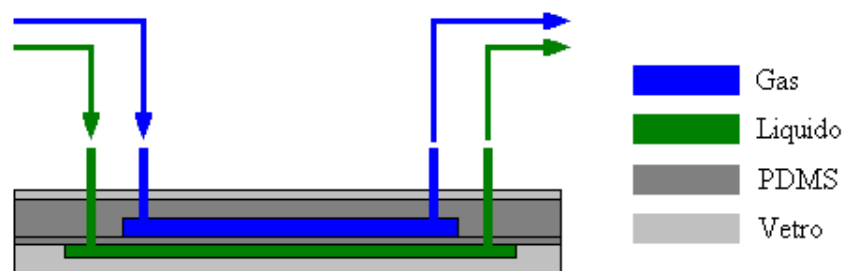


Figura 1.6: Schema del percorso di fluidi

La figura 1.8 mostra la struttura dei micro canali, composta da quattro unità modulari (Zambon, 2009) collegate in serie. Il liquido iniettato in uno dei nodi esterni scorre nel canale principale che in seguito si divide prima in quattro e poi in otto microcanali da 100 μm , ciò consente di diminuire la velocità media con cui il liquido scorre nella piattaforma rispetto un singolo canale di pari sezione, aumentando così il tempo permanenza nei canali e favorendo lo scambio di ossigeno.

A metà dello scambiatore i canali si congiungono a gruppi di quattro in due nodi, questo accorgimento si è reso necessario per la riuscita della loro produzione (§2.1.1), in quanto se lo scambiatore avesse un rapporto lunghezza/altezza troppo elevato si formerebbero delle tensioni interne al *fotoresist* che tenderebbero a fratturarlo.

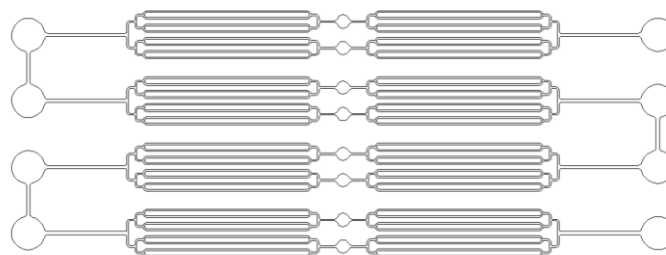


Figura 1.8: Struttura dei canali, schema complessivo

A differenza dei scambiatori illustrati nel paragrafo precedente, in questo caso il *pattern* dei canali è stato impresso su di un supporto in vetro per evitare l'effetto *buffer* che si riscontrerebbe se il supporto fosse in PDMS. L'effetto *buffer* consiste nel rallentamento della dinamica dello scambio d'ossigeno dovuto all'alta permeabilità allo stesso del PDMS (Tabella 1.1); infatti lo stampo in PDMS tenderebbe ad accumulare l'ossigeno quando fluisce l'aria nella camera del gas e a rilasciarlo nel liquido, attraverso le pareti, quando si dà lo stimolo di azoto rallentando il raggiungimento dello stato stazionario a bassa pressione parziale d'ossigeno.

Per questo motivo si sono abbandonate le seppur pratiche tecniche della soft litografia e del *replica molding* usate per produrre stampi in PDMS e si è utilizzata la tecnica del *chemical etching* per imprimere il pattern dei canali sul vetrino erodendolo tramite acido fluoridrico (HF). Il vetro essendo impermeabile all'ossigeno non consente l'effetto *buffer* migliorando notevolmente le prestazioni dello scambiatore.

Tale dispositivo consente di stimolare una coltura cellulare con gradienti di concentrazione di ossigeno rapidi e definiti e senza perturbare il sistema di acquisizione dati.

1.4 Scopo e motivazioni della tesi

La necessità di produrre dei rapidi gradienti di ossigeno, al fine di osservare la risposta cellulare a questo tipo di stimoli, porta a dover studiare lo scambio di materia all'interno dello scambiatore così da determinare le variabili che regolano questo processo e ottimizzare i parametri operativi per massimizzarlo.

In questo lavoro di tesi si definirà un modello matematico che descrive il processo di scambio di ossigeno nella piattaforma in stato stazionario per trovare i parametri operativi che lo regolano e calcolare i profili di concentrazione di ossigeno lungo i canali al variare dei parametri stessi.

In seguito si condurranno prove sperimentali per validare i risultati ottenuti con il modello matematico, per valutare l'efficienza dello scambiatore e per trovare le combinazioni di condizioni operative che massimizzano lo scambio di ossigeno.

Infine si valuterà la dinamica del processo di scambio nel caso di un disturbo a gradino della concentrazione di ossigeno nella fase gassosa.

CAPITOLO 2

Materiali e metodi

In questo capitolo si illustrano le tecniche utilizzate per la fabbricazione della piattaforma microfluidica, la strumentazione di misura della concentrazione di ossigeno e di regolazione delle portate delle fasi liquida e gassosa.

2.1 Produzione della piattaforma microfluidica

Il dispositivo microfluidico utilizzato nel corso delle prove sperimentali è composto da tre differenti strati prodotti con le tecniche di seguito riportate.

2.1.1 Produzione dello strato del liquido

La produzione dello strato del liquido prevede l'utilizzo delle tecniche di fotolitografia e di *wet-etching* per imprimere un determinato pattern di micro canali su un vetrino.

2.1.1.1 Fotolitografia

Si pone un vetrino in borosilicato (75x50mm) in forno a 130°C per 1 ora e lo si tratta successivamente con esadimetilsilazano, HDMS (Sigma) per 3 min a 130°C. Tale trattamento favorisce l'adesione del fotoresist al substrato.

Si depositano circa 2 ml di fotoresist positivo SPR 220-07 (Rohm-Haas) al centro del vetrino precedentemente posto su di uno *spin-coater* (Laurell) e si aziona un opportuno programma di rotazione per ottenere uno strato uniforme. La velocità di rotazione determina lo spessore del fotoresist, come mostrato dalla Tabella 2.1; per ottenere uno spessore di 18µm si usa un programma a cinque *step* la cui velocità massima è di 800 rpm.

Tabella 2.1 Velocità di rotazione da utilizzare in funzione dello spessore del fotoresist.

Spessore	Velocità di rotazione
microns	rpm
20	500
18	800
14	1000
7	2000

In seguito si tratta il vetrino termicamente su piastra riscaldante (Falc) per innescare la polimerizzazione e far evaporare il solvente contenuto nel resist. Si imposta una temperatura di 90°C, per un tempo che dipende dallo spessore del fotoresist secondo quanto riportato in Tabella 2.2.

Tabella 2.2 Tempi di precottura consigliati, a 90°C in funzione dello spessore del fotoresist.

Spessore	Tempo di precottura
microns	(90°C)
	minutes
7	30
18	55
36	70
54	90

Il *pattern* di micro canali, disegnato con il programma AUTOCAD 2D, viene impresso tramite una fotomaschera. Posizionata la fotomaschera sul vetrino si procede all'esposizione tramite lampada UV (AOI) che emette a 365 nm; l'energia di esposizione (E) dipende dallo spessore del fotoresist, come mostrato in Tabella 2.3. Per uno spessore di 18 µm è richiesta un'energia di 1000 mJ/cm². Nota la potenza della lampada (P) in mJ/cm²sec, variabile nel tempo, si può calcolare il tempo di esposizione $t = E / P$.

Tabella 2.3 Energia di esposizione in funzione dello spessore del fotoresist.

THICKNESS	EXPOSURE
microns	ENERGY
	mJ/cm²
7	1000
10	1000
18	1000
36	2000

La fase di sviluppo ha una durata di qualche minuto e viene condotta immergendo il vetrino nell'apposito *developer* (MF19).

2.1.1.1 Wet-etching

La tecnica del *wet-etching* permette di imprimere un pattern di canali microfluidici su un vetrino tramite un trattamento con HF (acido fluoridrico) al 40%.

In una prima fase si depone un *coating* sulle parti del vetrino che non si vuole vengano intaccate dall'acido, mentre nella seconda si effettua l'*etching* vero e proprio e si rimuovono i residui della corrosione lavando in sequenza con H₂O distillata per togliere le tracce di HF e con H₂SO₄ al 98% per togliere i residui derivati dalla reazione tra l'acido e i silicati; infine si rimuove il fotoresist con un solvente organico, pirrolidone o dimetilformaldeide (Sigma).

Il tempo di immersione nell'HF determina la profondità dei canali. Prove a 5 e 10 minuti danno i risultati di Figura 2.1. Si suppone una relazione lineare tra la profondità dei canali e il tempo di immersione e si conducono prove a 2'30", 5' e 7'30". Le successive misure al microscopio ottico (Leica) mostrano che si sono ottenute profondità rispettivamente di 40, 70 100 μm.

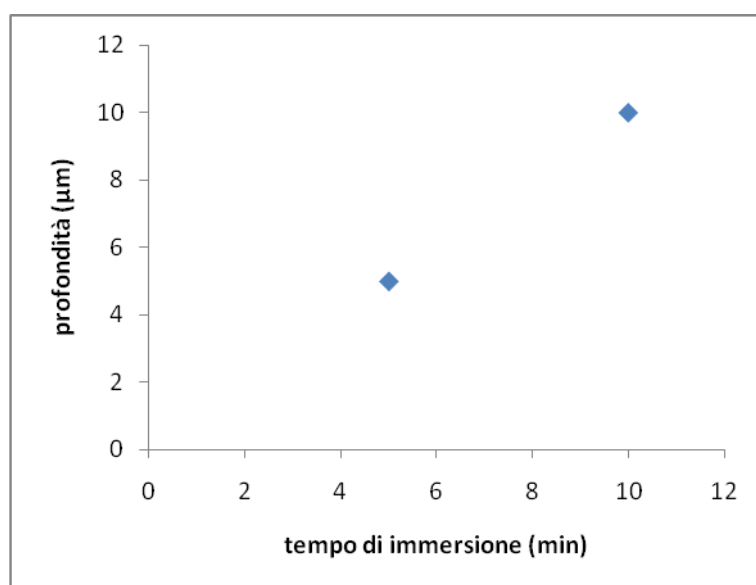


Figura 2.1 Profondità del pattern ottenuta con il processo di *etching* in funzione del tempo di immersione in acido fluoridrico al 40%.

2.1.2 Produzione della membrana

Lo scopo di questa fase è quello di produrre una membrana di polidimetilsilossano PDMS, uniforme dello spessore di qualche decina di μm.

Si utilizza come substrato un wafer di silicio del diametro di 5" (~12,7 cm) che viene trattato con HDMS per 30 min sottovuoto per favorire l'adesione della membrana col substrato.

Il PDMS viene ottenuto miscelando 5g di base e agente reticolante (Sylgard 184, Daw Corwing) in rapporto 10:1. La miscela viene posta sottovuoto in un essiccatore per eliminare le bolle d'aria e quindi depositata sul wafer. Il wafer viene condizionato per 15 min a 37°C su piastra riscaldante e posto sullo *spin-coater*. Secondo un programma di spin che prevede uno step di 15 sec a 500 rpm ed un secondo di 60 sec a 1200rpm, si

ottiene uno spessore finale di 45 μm . La Figura 2.2 mostra la dipendenza dello spessore finale ottenuto dalla velocità di spin.

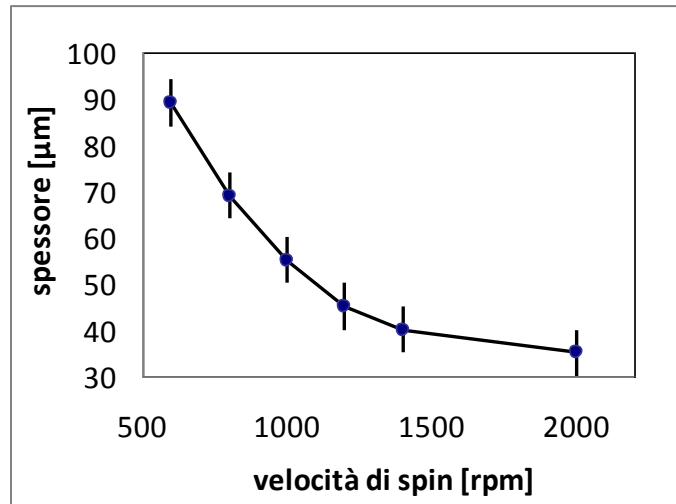


Figura 2.2 Spessore delle membrane in PDMS in funzione della velocità di spin.

La polimerizzazione del PDMS avviene per via termica ad 80°C per 1 ora circa.

2.1.3 Produzione dello strato della fase gas

Lo strato in cui si fa fluire la fase gassosa è costituito da una camera rettangolare in PDMS dotata di un ingresso e di una uscita laterali. Questa verrà sigillata alla membrana da un lato e dall'altro ad un vetrino per contenere il gas.

Si miscelano 40 g di silicone e 4 g di reticolante, si mette la miscela in una petri da 8,5 cm di diametro e si degasa il tutto in un essiccatore creando il vuoto. Dopo aver fatto reticolare in forno a 80°C per 1h si estrae il blocco di silicone; lo si ritaglia e si effettuano i fori di entrata/uscita tramite un ago.

2.1.4 Tecnica di adesione al plasma

La tecnica di adesione al plasma consente di unire permanentemente due superfici tra loro. Il plasma è un gas neutro ma parzialmente ionizzato che attiva le superfici esposte e permette di unirle covalentemente quando queste vengono a contatto.

Si pongono i substrati che si intende unire nella camera di un *plasma cleaner* (Harrick Plasma) con le superfici da incollare rivolte verso l'alto. Dopo aver generato una pressione di 0.3 mbar, tramite una pompa da vuoto, si avvia il plasma che, generando campi magnetici, ionizza l'aria rarefatta all'interno della camera. Si espongono le superfici per due minuti e quindi le si fa aderire una sull'altra facendo una leggera pressione.

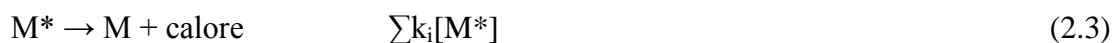
2.2 Misura della concentrazione di ossigeno disciolto

In questo paragrafo si descrive la sonda utilizzata per misurare *online* la concentrazione dell'ossigeno presente nella soluzione in uscita dallo scambiatore e come è stata eseguita la sua taratura.

2.2.1 Principio di funzionamento

La sonda utilizzata per misurare la concentrazione dell'ossigeno disciolto nella fase liquida si basa sul principio del quenching della fluorescenza, ossia lo smorzamento della fluorescenza di un fluoroforo ad opera di un *quencher* che, reagendo con esso, lo disattiva, senza che si producano effetti chimici rilevanti. In questo caso si parlerà di quenching dinamico (o collisionale) poiché i *quenchers* sono molecole di ossigeno sparse in soluzione che diffondono verso il fluoroforo per inibire la fluorescenza.

Il meccanismo che regola il processo di quenching dinamico comprende diverse reazioni, anche tra loro concorrenti, ognuna delle quali ha una propria cinetica. Le principali reazioni coinvolte nel processo sono le seguenti:



Dove M^* e M rappresentano la molecola di fluoroforo eccitata e nello stato fondamentale rispettivamente, hv e hv' sono quanti di luce, alle rispettive frequenze di assorbimento ν e emissione ν' del fluoroforo, Q indica il *quencher*, mentre le k_i indicano le costanti cinetiche di eccitamento dovuto all'assorbimento di luce (k_{abs}) e di diseccitamento: radiativo (k_f), termico (k_i) e relativo al quenching (k_q)

Se consideriamo il processo di quenching stazionario si può scrivere la resa quantica di fluorescenza come:

$$\phi_f = \frac{k_f^0}{k_f^0 + \sum k_i + k_q[Q]} \quad (2.5)$$

In assenza di *quencher* invece si ha:

$$\phi_f^0 = \frac{k_f^0}{k_f^0 + \sum k_i} \quad (2.6)$$

e sapendo che il tempo di vita in assenza di *quencher* è dato da:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_f^0 + \sum k_i} \quad (2.7)$$

si ottiene l'equazione detta di Stern-Volmer, definendo come costante il termine $\tau_0 \cdot k_q$:

$$\frac{\phi_f^0}{\phi_f} = 1 + \frac{1}{k_f^0 + \sum k_i} k_q [Q] = 1 + \tau_0 k_q [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2.8)$$

Va notato come il tempo di vita è quello in assenza del *quencher*, e quindi è indipendente da esso.

La costante di Stern-Volmer dipende dalla temperatura, dal tipo di fluoroforo e dalla viscosità dell'ambiente in cui il fluoroforo è posto, ma non dal tipo di campione.

Nel caso in cui la specie che emette sia una sola e vi sia un solo *quencher* si possono ottenere delle altre espressioni lineari in funzione del rapporto tra l'intensità in assenza e in presenza di *quencher* I_0/I o del rapporto tra i tempi di vita in assenza e in presenza di *quencher* τ_0/τ , che sono più semplici da misurare:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2.9)$$

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2.10)$$

In questo caso è l'ossigeno a fungere da *quencher*: la molecola di ossigeno nel suo stato fondamentale di tripletto, venendo a contatto con una molecola di fluoroforo eccitata, reagisce sottraendole energia e passando allo stato eccitato di singoletto secondo la reazione illustrata in Figura 2.3:

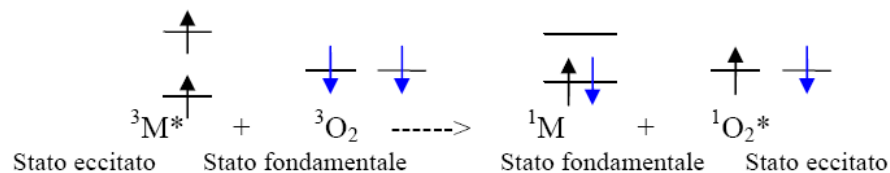


Figura 2.3 Passaggio della molecola di ossigeno dallo stato di tripletto (stabile) allo stato di singoletto (eccitato).

2.2.2 Sonda a fluorescenza

La sonda a fluorescenza (OceanOptics) utilizzata nel corso delle prove sperimentali usa come fluoroforo un composto a base di rutenio e immerso in una matrice porosa di sol-gel. Il sol-gel è permeabile all'ossigeno, che quindi è libero di reagire con il rutenio, ma, essendo idrofobico, isola il fluoroforo dalla soluzione acquosa.

In Figura 2.4 è rappresentato il sistema completo di rilevazione dell'ossigeno formato dalla sonda, la fibra ottica, la sorgente luminosa e il PC per l'acquisizione dei dati.

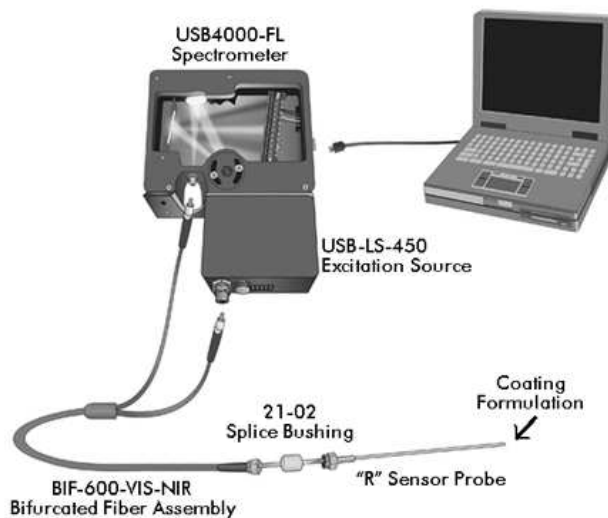


Figura 2.4 Sistema di rilevazione dell'ossigeno: sonda, fibra ottica, sorgente luminosa, spettrometro, pc per acquisizione dati.

La sonda è collegata tramite un cavo a fibra ottica ad un LED e a uno spettrometro. Il LED emette ad intermittenza a 475 nm e invia il segnale alla punta della sonda immersa nella soluzione, eccitando così il rutenio che emette in fluorescenza a 600 nm. La fluorescenza è poi riflessa attraverso il cavo a fibra ottica verso lo spettrometro e il segnale acquisito viene rielaborato in termini di intensità luminosa dal software OOISensor (OceanOptics)

Il rapporto tra l'intensità luminosa in assenza e in presenza di ossigeno è correlabile alla pressione parziale dell'ossigeno all'interno della soluzione secondo la legge di Stern-Volmer.

2.2.3 Taratura della sonda

La sonda è stata tarata effettuando diverse misure su campioni a concentrazione nota di ossigeno.

La strumentazione utilizzata è quella schematizzata in Figura 2.5: in un bagno termostato, costituito da un beker pieno d'acqua posto su piastra riscaldante (IKA), si immerge un contenitore di vetro contenente 20 ml di soluzione salina, PBS (*phosphate buffer solution*) e isolato dall'ambiente esterno. La soluzione viene strippata con argon per ottenere una pressione parziale di ossigeno prossima allo 0%, dopodiché si insuffla per 15 min una miscela di azoto e aria a concentrazione nota di ossigeno ottenuta con un sistema di flussimetri digitali, dando ogni volta il tempo al sistema di arrivare all'equilibrio. Per ogni diversa concentrazione si misura il corrispondente valore di intensità luminosa.

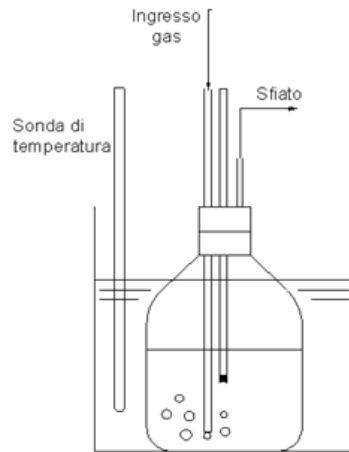


Figura 2.5 Apparato sperimentale per la taratura della sonda a fluorescenza

In Tabella 2.4 sono mostrate le combinazioni delle portate di azoto e aria utilizzate per ottenere le diverse composizioni della fase gas.

Tabella 2.4 Combinazione delle portate dei gas, azoto e ossigeno, in uscita dai flussimetri digitali per ottenere miscele con pressione parziale di ossigeno compresa tra 0 e 20.9%.

Azoto [ml/min]	Aria [ml/min]	COMPOSIZIONE MISCELA, %pO ₂
100	0	0
24	76	5,97
48	52	10,89
71.5	28.5	15,92
0	100	20.95

In Tabella 2.5 si riportano i valori dell'intensità del segnale misurati alle diverse pressioni parziali di ossigeno a 25°C e i valori del rapporto tra l'intensità luminosa in assenza e in presenza di ossigeno I_0/I .

Tabella 2.5 Valori di intensità luminosa rilevati a diverse pressioni parziali di ossigeno nel campione e calcolo del rapporto tra le intensità in assenza ($p_{O_2} = 0\%$) e in presenza di quencher a temperatura 25°C.

% pO ₂	I	I_0/I
0	12700	1
5,97	10450	1,215
10,89	9300	1,366
15,92	8500	1,494
20.95	7850	1,618

Dall'equazione di Stern-Volmer (2.9) è possibile calcolare la costante K_{SV} che regola la dipendenza lineare fra la pressione parziale nella soluzione e il rapporto fra le intensità.

In particolare tramite regressione lineare e impostando 1 come valore dell'intercetta si ottiene un valore per la costante di Stern-Volmer di 0,0308 con una coefficiente di correlazione lineare R^2 di 0,9885 come mostrato nel Figura 2.6.

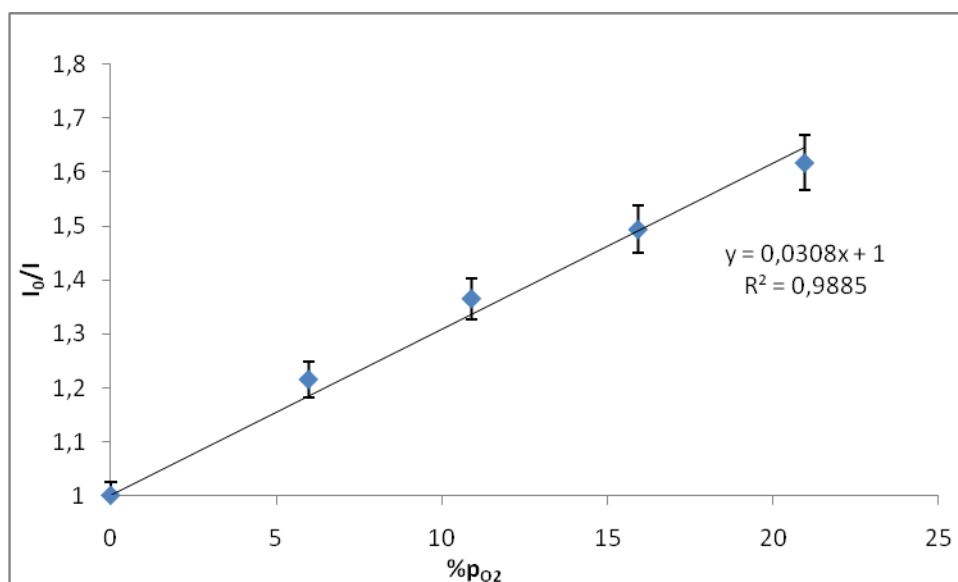


Figura 2.6 Rapporto tra le intensità luminose in assenza e in presenza di quencher in funzione della pressione parziale di ossigeno, espressa in %.

2.3 Regolazione delle portate delle fasi liquida e gassosa

In questo paragrafo si descrivono gli strumenti utilizzati per la movimentazione dei fluidi durante le prove sperimentali. Si utilizza una pompa a siringa per la fase liquida mentre per controllare la portata e la composizione della fase gassosa si utilizzano dei flussimetri digitali.

2.3.1 Pompa a siringa

Per ottenere portate di liquido dell'ordine dei $\mu\text{l}/\text{min}$ è necessaria una strumentazione che consenta un elevato grado di accuratezza. A questo scopo si utilizza una pompa a siringa PHD20/2000 (Harvard apparatus) che consente una precisione di $0,1 \mu\text{l}/\text{min}$. Come mostrato in Figura 2.7 la pompa è composta da due parti distinte: la prima è costituita dal sistema di pompaggio vero e proprio, in cui si possono alloggiare fino a 10 siringhe di vario volume (da 1 a 30 ml), la seconda è l'unità di controllo nella quale si imposta il tipo di siringa utilizzata, il volume e la portata voluta.



Figura 2.7 Pompa a siringa.

Si utilizzano siringhe in plastica da 10 ml (BD) collegate a tubi in teflon (Cole-Parmer) del diametro di 0.01'' tramite ago da siringa 22G (SMALL PARTS, Inc.).

2.3.2 Flussimetri digitali

In Figura 2.8 è mostrato il sistema per il controllo della composizione e della portata della fase gas.

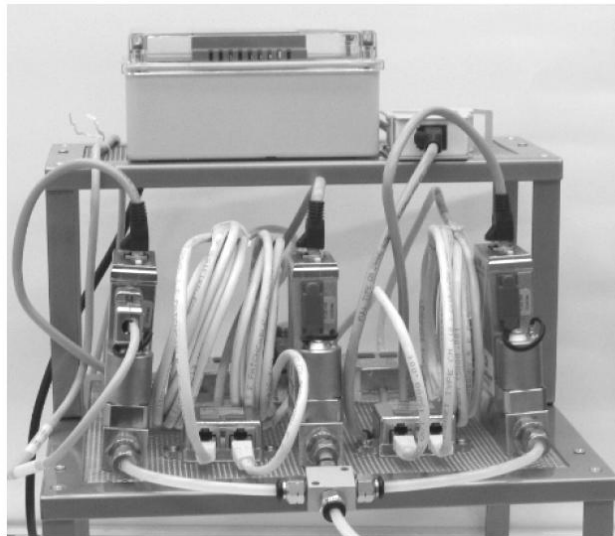
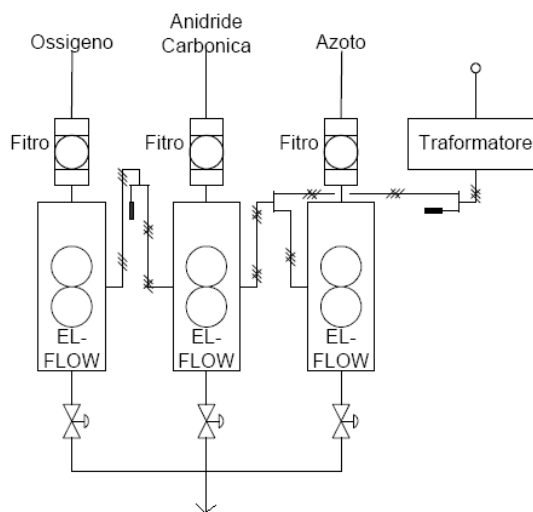


Figura 2.8 (a) Schematizzazione del sistema di regolazione delle miscele gassose. (b) Foto dei tre flussimetri digitali.

Esso è composto da tre linee ognuna delle quali regolata da un flussimetro digitale (EL-FLOW Mass Flow Meters/Controllers Bronkhorst High-Tech) e preceduta da un filtro (HAMMLET). Le linee utilizzate sono solamente due: aria e azoto che confluiscono in un unico canale per formare la miscela che verrà inviata alla piattaforma microfluidica. Per

l'alimentazione si usano bombole di gas puri (aria e azoto) al 99,999% a una pressione di 1 bar.

I flussimetri possono fornire una portata massima di 100 ml/min con una precisione dell'1% e sono collegati tra loro tramite un sistema di controllo elettronico digitale costituito da un *micro-controller* dotato di un circuito periferico per la misura, il controllo e la comunicazione.

Il *set-point* viene inserito da computer, a cui il sistema è collegato, e trasmesso ai flussimetri mediante un sistema di comunicazione digitale. Il segnale di portata misurata viene digitalizzato direttamente dal sensore ed elaborato dal software interno FlowDDE. La regolazione della portata avviene tramite una valvola automatica a solenoide di tipo compatto, caratterizzata da un tempo di risposta di 4-5 secondi.

CAPITOLO 3

Modello matematico

In questo capitolo si definisce il sistema nel quale avviene lo scambio di ossigeno e vi si applicano i bilanci di materia per sviluppare un modello matematico che consenta di calcolare le concentrazioni di ossigeno nella fase liquida, in uscita dallo scambiatore, allo stato stazionario, al variare di alcuni parametri operativi.

3.1 Definizione del sistema

Il sistema attraverso cui avviene lo scambio di ossigeno è formato da tre strati:

- la fase gas, composta da una miscela di aria e azoto, a pressione parziale di ossigeno nota;
- la membrana, in PDMS, permeabile all'ossigeno;
- la fase liquida, composta da una soluzione salina (PBS), che si intende ossigenare o deossigenare.

Ognuno di questi strati ha una resistenza allo scambio che dipende dalla geometria, dalle condizioni operative e dalle proprietà fisiche delle sostanze. In Figura 3.1 è mostrato il profilo delle concentrazioni nei diversi strati del sistema: c_{O_2} e $c_{O_2}^g$ sono le concentrazioni di *bulk* nella fase liquida e in quella gassosa, mentre $c_{O_2}^*$ e $c_{O_2}^{*g}$ sono le concentrazioni all'equilibrio all'interfaccia con la membrana nelle due fasi.

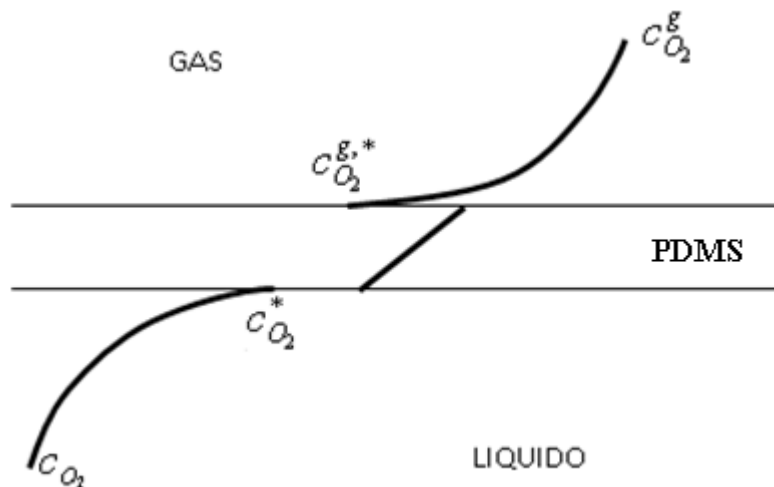


Figura 3.1 Profilo della concentrazione di ossigeno nelle tre fasi: liquida, solida e gassosa.

3.2 Bilanci di materia

Il sistema di riferimento usato per sviluppare i bilanci di materia nella fase liquida è dato da un singolo canale microfluidico di sezione rettangolare. In Figura 3.2 è rappresentata la sezione del canale e della membrana in PDMS sovrastante, e il relativo sistema di coordinate.

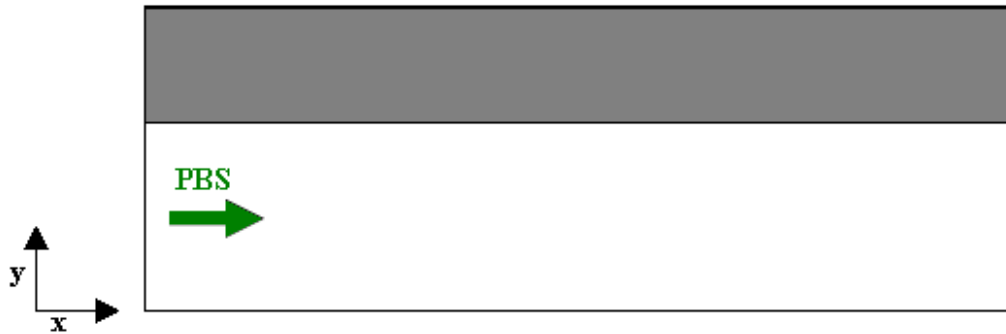


Figura 3.2 Sistema di riferimento del bilancio di materia.

Il bilancio dell'ossigeno può essere scritto come:

$$u \nabla c_{O_2} + \nabla(-D \nabla c_{O_2}) = 0, \quad (1)$$

dove D è il coefficiente di diffusione dell'ossigeno nella fase liquida e u il campo di velocità. Si ipotizza che il liquido si muova a velocità costante con un profilo di moto a pistone lungo il canale. Date le dimensioni micrometriche dei canali e le portate utilizzate nelle prove, dell'ordine delle centinaia di $\mu\text{l}/\text{min}$, il numero di Peclet (Pe) risulta essere dell'ordine delle migliaia. È possibile quindi trascurare la presenza di fenomeni diffusivi lungo la direzione assiale; inoltre, visto che le prove sono condotte in condizioni isoterme, si può considerare D costante. L'equazione (1) si può semplificare in:

$$u \frac{\partial c_{O_2}}{\partial x} - D \frac{\partial^2 c_{O_2}}{\partial y^2} = 0 \quad (2)$$

Il secondo termine dell'equazione (2) rappresenta la variazione del flusso di ossigeno lungo la coordinata y , perpendicolare alla direzione del flusso del liquido. Il flusso diffusivo di ossigeno nella fase liquida può essere definito come:

$$N_{O_2} = D \frac{\partial c_{O_2}}{\partial y} = k_1 (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \quad (3)$$

dove k_1 è il coefficiente di scambio di materia nella fase liquida.

Secondo la legge di Henry la concentrazione di un gas disciolto in un liquido, a temperatura costante, è proporzionale alla pressione che il gas esercita sul liquido stesso; per cui risulta che:

$$p_{O_2} = H c_{O_2} \quad (4)$$

Si può allora scrivere:

$$N_{O_2} = \frac{k_1}{H} (p_{O_2}^* - p_{O_2}). \quad (5)$$

Per la continuità dei flussi tale quantità è uguale al flusso di ossigeno che attraversa la membrana, dalla fase gas verso quella liquida:

$$N_{O_2}^m = \frac{p}{s} (p_{O_2}^{*g} - p_{O_2}^*), \quad (6)$$

dove p è la permeabilità del PDMS all'ossigeno e s è lo spessore della membrana. Uguagliando le equazioni (5) e (6) si può ricavare $p_{O_2}^*$:

$$p_{O_2}^* = \frac{\frac{k_1}{H} p_{O_2} + \frac{p}{s} p_{O_2}^{*g}}{\frac{k_1}{H} + \frac{p}{s}}, \quad (7)$$

che inserito nell'equazione (2) e tenendo conto delle (3), (4) e (5), da:

$$u \frac{\partial c_{O_2}}{\partial x} = K_G (c_{O_2}^{*g} - c_{O_2}) a. \quad (8)$$

K_G è il coefficiente di scambio globale che tiene conto delle resistenze alla diffusione date dalla membrana e dalla fase liquida, ed è espresso come segue:

$$\frac{1}{K_G} = \frac{1}{\frac{k_1}{H} + \frac{p}{s}}, \quad (9)$$

mentre a è la superficie specifica di scambio, e, visto che i canali hanno una sezione rettangolare equivalente all'inverso dell'altezza del canale.

La resistenza allo scambio nella fase gas è stata trascurata a causa dell'elevato coefficiente di diffusione dell'ossigeno in essa rispetto a quello delle altre due fasi, perciò la concentrazione dell'ossigeno all'interfaccia della membrana con la fase gassosa è equivalente a quella di *bulk* nella stessa fase. Risulta quindi:

$$u \frac{\partial c_{O_2}}{\partial x} = K_G (c_{O_2}^g - c_{O_2}) a. \quad (10)$$

L'equazione differenziale (10) può essere integrata per separazione delle variabili nella lunghezza del canale tra la concentrazione del liquido in entrata e in uscita; considerando un coefficiente globale di scambio medio si ha:

$$\int_{c_{O_2}^{in}}^{c_{O_2}^{out}} \frac{\partial c_{O_2}}{(c_{O_2}^g - c_{O_2})} = \frac{\langle K_G \rangle a}{u} \int_0^L \partial x. \quad (11)$$

Si può così calcolare la concentrazione di ossigeno in uscita dallo scambiatore:

$$c_{O_2}^{out} = c_{O_2}^g + (c_{O_2}^{in} - c_{O_2}^g) \exp \left(-\frac{\langle K_G \rangle a L}{u} \right) \quad (12)$$

Come si può osservare dalla (12) la concentrazione di ossigeno in uscita dallo scambiatore dipende, oltre che dalla lunghezza dello stesso, anche dalla geometria dei canali, dalla velocità e quindi dalla portata del liquido trattato e dalla resistenza al trasporto di materia nelle fasi coinvolte.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di ottimizzare il valore dell'altezza del *pattern* di canali e quello della portata di liquido, che ne determina la velocità, al fine di individuare la coppia di valori che consenta di ottenere una pressione parziale di ossigeno in uscita inferiore al 5%.

3.3 Implementazione del modello matematico

In questo paragrafo si userà l'equazione (12) per studiare come l'altezza dei canali e la portata del liquido agiscano sulla concentrazione di ossigeno raggiunta in uscita dallo scambiatore a stato stazionario, in seguito ad un disturbo a gradino nella fase gassosa.

3.3.1 Coefficiente di scambio di materia nella fase liquida

In un precedente lavoro di tesi si è verificato che k_1 espresso attraverso il numero di Sherwood:

$$Sh_h = \frac{k_1 h}{D} \quad (13)$$

dipende da un parametro adimensionale L^* definito come:

$$L^* = \frac{x}{h Pe_h}, \quad (14)$$

dove Pe_h è il numero di Peclet che ha come grandezza caratteristica l'altezza dei canali h :

$$Pe_h = \frac{u_{\infty} h}{D} \quad (15)$$

e x è la coordinata assiale.

La legge che regola questa dipendenza è la seguente:

$$\begin{cases} Sh_h = 1.233(L^*)^{-1/3} & \text{per } L^* < 0.1 \\ Sh_h = 2.62 & \text{per } L^* \geq 0.1 \end{cases} \quad (16)$$

Essendo:

$$Sh_h \propto Pe_h^{1/3}$$

si può notare come k_1 dipenda non linearmente sia dalla portata del liquido, che determina la velocità di *bulk*, sia dalla profondità dei canali.

Per calcolare $\langle K_G \rangle$ si usa l'equazione (9) integrando il k_1 ottenuto dall'equazione (16) lungo la coordinata x .

3.3.2 Costanti utilizzate

Nell'eseguire i calcoli si usano le seguenti costanti:

- H , costante di Henry, è stata trovata in letteratura: per l'ossigeno disciolto in PBS alla temperatura di 25°C ha un valore di $0.957 \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$;
- p , permeabilità all'ossigeno del PDMS, è $1.59 \cdot 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$ (Tabella 1.1);
- s , spessore della membrana, è $45 \text{ } \mu\text{m}$ (§2.1.2);
- L , lunghezza del canale microfluidico, è $0,08\text{m}$, considerando la lunghezza complessiva dello scambiatore lungo cui si realizza lo scambio.

3.3.3 Risultati

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti applicando il modello matematico, ossia l'andamento della concentrazione di ossigeno nello scambiatore in funzione della lunghezza del canale. Come condizioni iniziali si sono poste la concentrazione di ossigeno (in pressione parziale) della fase liquida in entrata pari al 20,95% e della fase gas pari allo 0%.

Il modello matematico è stato applicato per diversi valori di portata del liquido (100, 200, 300, 400 $\mu\text{l}/\text{min}$) e di profondità dei canali (40, 70, 100 μm).

3.3.3.1 Dipendenza dalla portata

In Figura 3.3 sono riportati gli andamenti della concentrazione di ossigeno lungo la coordinata x per un canale profondo 40 μm nel caso delle diverse portate.

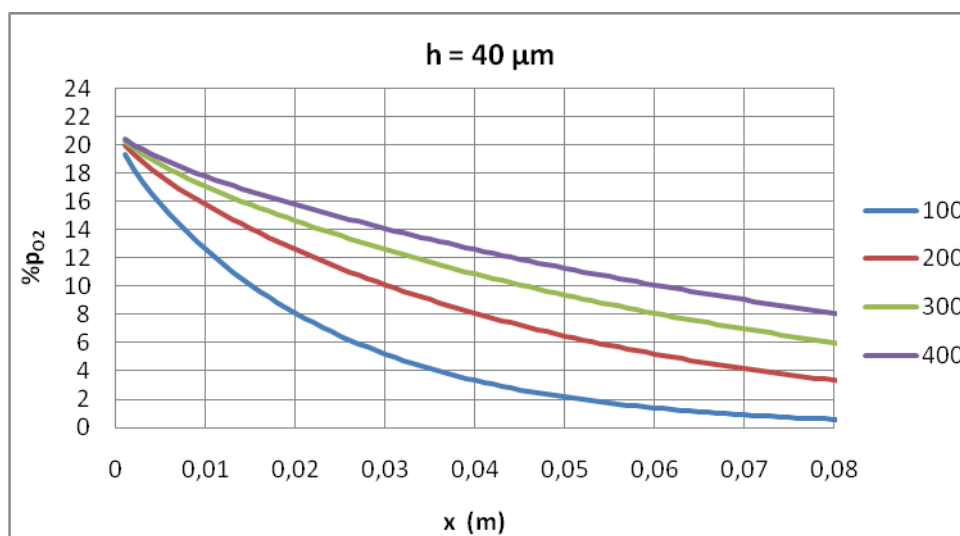


Figura 3.3 Andamento della pressione parziale di ossigeno lungo la coordinata x in canale profondo 40 μm , al variare della portata.

Da questo grafico si può vedere come, all'aumentare della portata della fase liquida, l'efficienza dello scambio di materia diminuisce e quindi la riduzione di concentrazione tra ingresso e uscita è minore.

In Figura 3.4 sono riportati gli andamenti della concentrazione di ossigeno lungo la coordinata x nei casi di canali profondi 70 e 100 μm per le diverse portate.

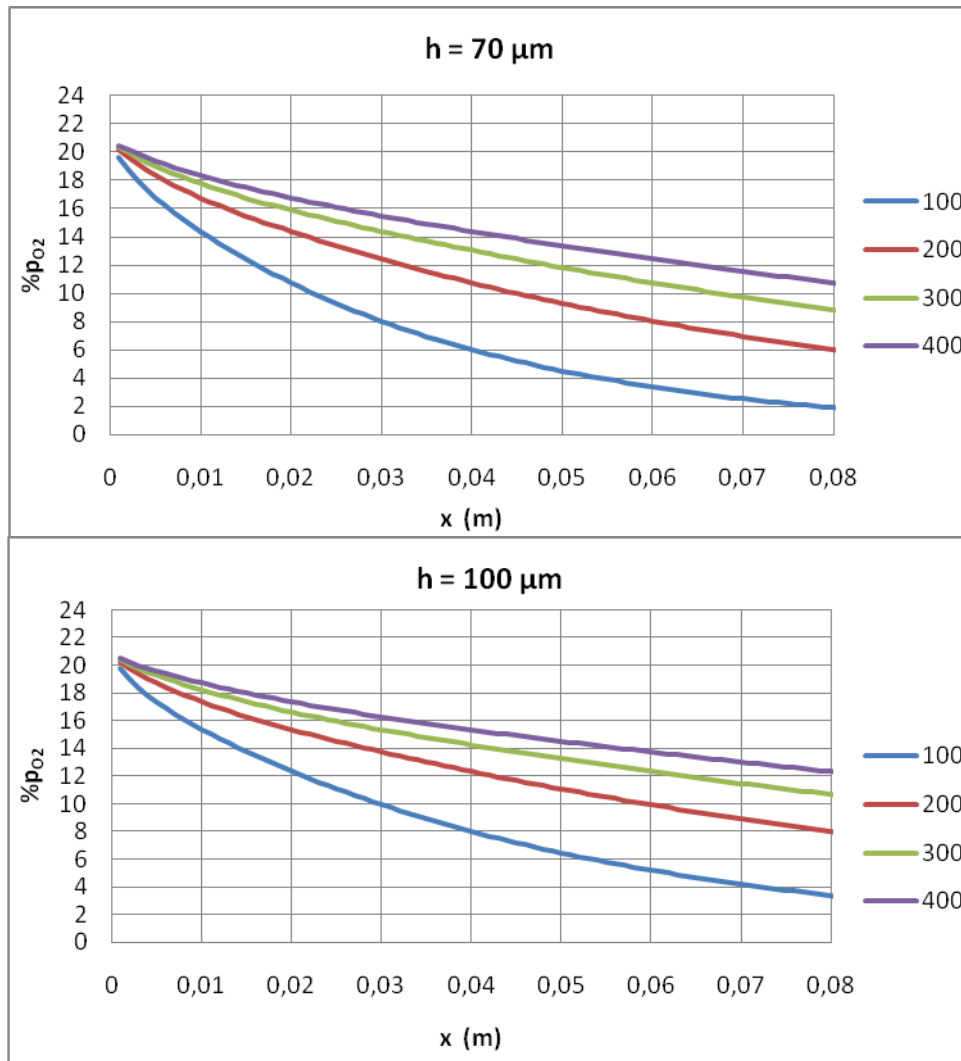


Figura 3.4 Andamento della pressione parziale di ossigeno lungo la coordinata x , in canali profondi 70 e 100 μm , al variare della portata.

I grafici di Figura 3.4 confermano l'influenza della portata sul profilo della concentrazione di ossigeno vista in precedenza e fanno notare anche che l'aumento dell'altezza diminuisce l'efficienza di scambio, a causa della diminuzione di superficie specifica disponibile per lo scambio.

3.3.3.2 Dipendenza dalla profondità dei canali

Dal confronto dei grafici delle Figure 3.3 e 3.4 si riscontra che lo scambio di ossigeno è sfavorito dalla profondità dei canali. Questo andamento è evidenziato in Figura 3.5 dove sono riportati i profili della concentrazione di ossigeno lungo x per una portata di liquido di $200 \mu\text{l}/\text{min}$ al variare della profondità dei canali.

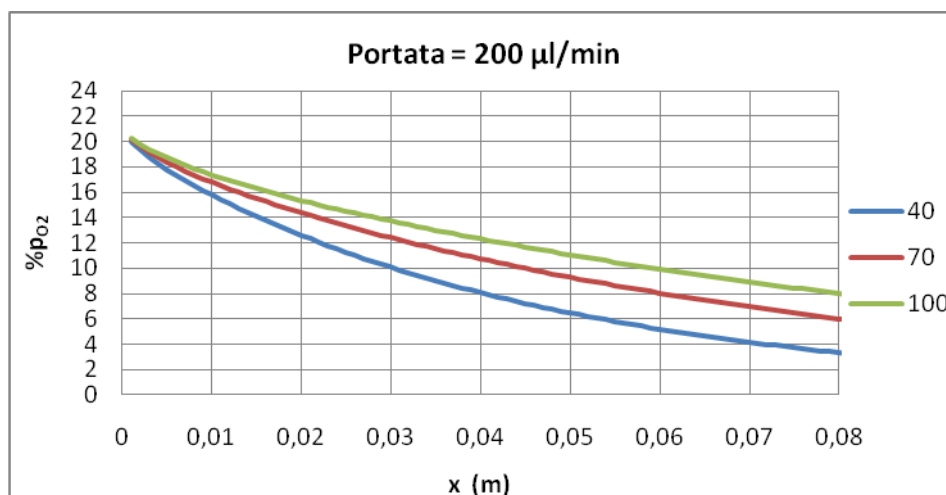


Figura 3.5 Andamento della pressione parziale lungo la coordinata x alla portata di $200 \mu\text{l}/\text{min}$, al variare della profondità del canale.

3.3.3.3 Dipendenza dalla concentrazione d'ossigeno in fase gassosa

La concentrazione di ossigeno raggiunta in uscita dipende anche dalla composizione della fase gassosa. In Figura 3.6 vengono riportati i risultati ottenuti, tramite il modello matematico, nel caso di diverse concentrazioni di ossigeno (0, 5, 10, 15%) nella fase gassosa per uno scambiatore con canali profondi $40 \mu\text{m}$ e una portata di $200 \mu\text{l}/\text{min}$.

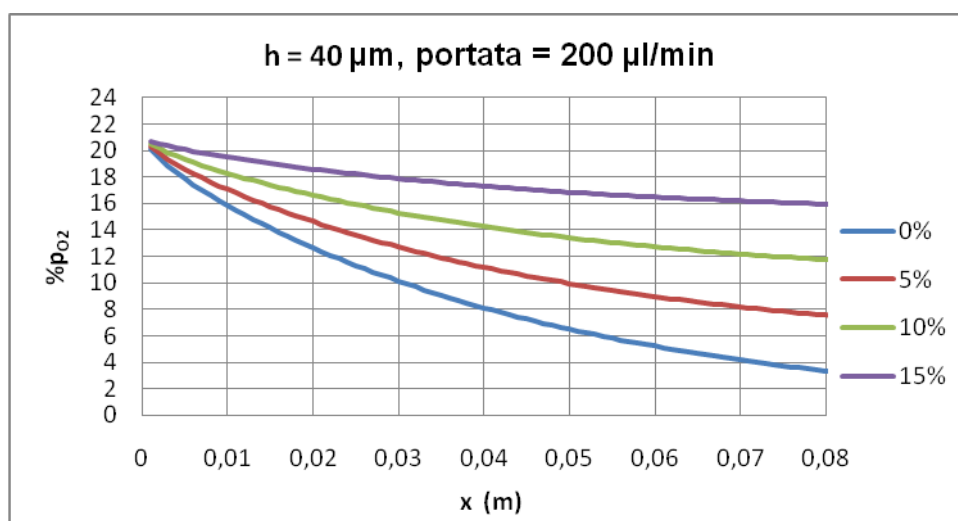


Figura 3.6 Andamento della pressione parziale di ossigeno in funzione della coordinata x in un canale profondo $40 \mu\text{m}$ alla portata di $200 \mu\text{l}/\text{min}$ al variare della perturbazione in fase gas.

Si verifica, tramite il grafico riportato in Figura 3.7, che le concentrazioni di ossigeno in uscita dal canale al variare della pressione parziale della fase gas è lineare, come stabilito dalla legge di Henry.

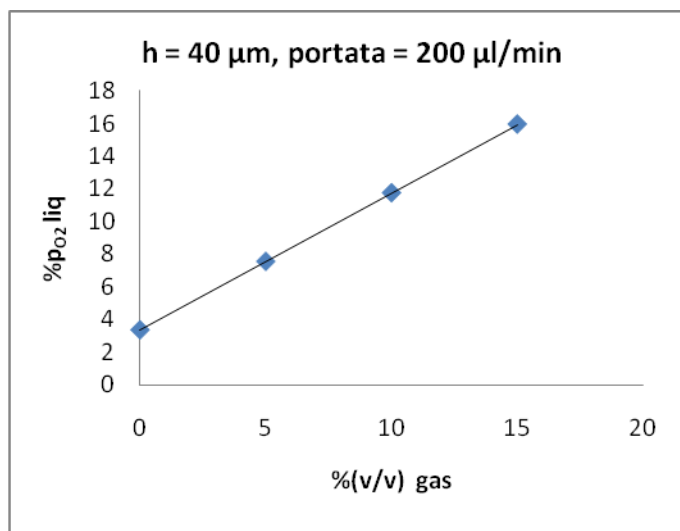


Figura 3.7 Andamento delle pressione parziale di ossigeno in uscita dal canale in fase liquida al variare della concentrazione di ossigeno della fase gas in entrata.

Dalla figura 3.7 si riscontra che la relazione fra la concentrazione del liquido in uscita dal canale e quella della fase gassosa è lineare, nel caso si mantengano invariate le altre condizioni operative.

3.4 Rendimento dello scambiatore

Si definisce l'efficienza sperimentale (ε) come:

$$\varepsilon = \frac{(c_{O_2}^{in} - c_{O_2}^{out})_{sper}}{(c_{O_2}^{in} - c_{O_2}^{out})_{teo}}$$

dove le concentrazioni indicate al numeratore sono quelle in entrata e in uscita dallo scambiatore misurate sperimentalmente, mentre le concentrazioni al denominatore sono quelle in entrata e in uscita ottenute con il modello matematico nelle stesse condizioni operative. La valutazione dell'efficienza dello scambiatore al variare delle condizioni operative, assieme all'applicazione del modello matematico, consente di valutare a priori la variazione di concentrazione di ossigeno ottenibile, in seguito ad un disturbo a gradino nella fase gas.

In Tabella 3.1 si riassumono i valori delle concentrazioni in uscita dalla piattaforma calcolati con questo modello al variare delle condizioni operative.

Tabella 4.1 Pressioni parziali di ossigeno all'uscita del canale calcolate tramite il modello matematico.

h (μm)	Portata ($\mu\text{l}/\text{min}$)	$P_{\text{O}_2}^{\text{out}}$ %
40	100	0.57
	200	3.34
	300	6.02
	400	8.09
70	100	1.89
	200	6.02
	300	8.86
	400	10.75
100	100	3.38
	200	8.01
	300	10.67
	400	12.33

Le combinazioni di valori dei parametri altezza/portata che garantiscono, almeno teoricamente, di ottenere una pressione parziale di ossigeno in uscita inferiore al 5% sono:

- $h = 40 \mu\text{m}$, portata = $100 \mu\text{l}/\text{min}$;
- $h = 40 \mu\text{m}$, portata = $200 \mu\text{l}/\text{min}$;
- $h = 70 \mu\text{m}$, portata = $100 \mu\text{l}/\text{min}$;
- $h = 100 \mu\text{m}$, portata = $100 \mu\text{l}/\text{min}$.

CAPITOLO 4

Prove sperimentali

In questo capitolo si descrive come sono state condotte le prove sperimentali al fine di valutare l'efficienza di scambio di ossigeno all'interno della piattaforma e di determinare i parametri operativi che consentono di ottenere pressioni parziali di ossigeno inferiori al 5% in qualche minuto.

4.1 Metodo di conduzione delle prove

In questo paragrafo si illustra la strumentazione utilizzata e la procedura seguita nell'effettuare le prove sperimentali.

4.1.1 Preparazione della strumentazione

In Figura 4.1 è mostrata una schematizzazione dell'intero apparato sperimentale: tramite una pompa a siringa si inietta la soluzione salina attraverso lo scambiatore alla portata desiderata, mentre all'uscita viene rilevata la concentrazione di ossigeno tramite la sonda a fluorescenza. Nella camera dedicata viene regolata la portata e la composizione della fase gassosa tramite dei flussimetri digitali, comandati via pc.

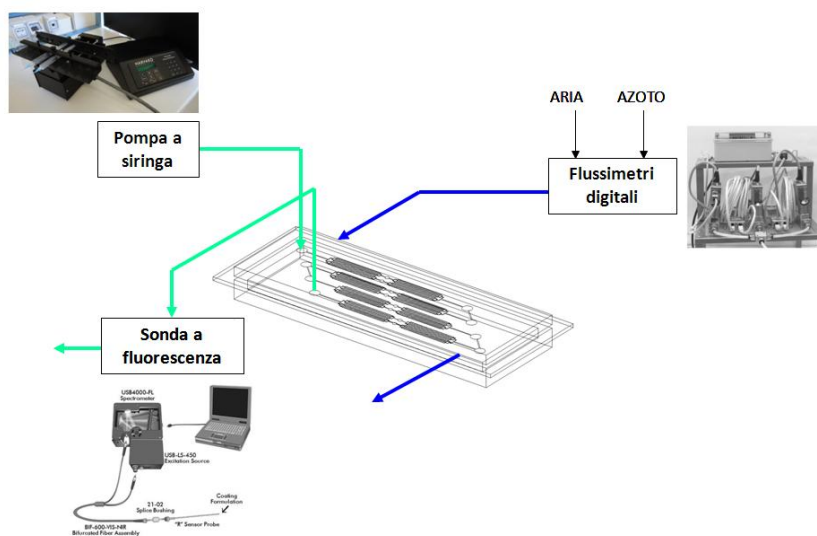


Figura 4.1 Schema della strumentazione utilizzata nel corso delle prove sperimentali.

Il tubo proveniente dai flussimetri è collegato al foro di entrata della camera del gas tramite un ago 21G (Micro Parts Inc.), mentre il gas in uscita è inviato, tramite un secondo tubo, ad un recipiente con dell'acqua per verificare che la fase gassosa fluisca correttamente. Dalla siringa posta sulla pompa parte un tubo in teflon, impermeabile ai gas, infilato direttamente nel foro per l'entrata del PBS; al foro d'uscita della fase liquida è collegato un ago da siringa che porta ad un raccordo a Y, in cui sono innestati la sonda a fluorescenza e un tubo per eliminare il PBS.

4.1.2 Procedura

Si riempie la siringa (BectonDPlastic) da 10 ml di PBS, portato alla temperatura di 25°C con una piastra riscaldante (IKA), evitando la formazione di bolle d'aria e la si pone sulla pompa.

Si imposta la portata desiderata e si posiziona la sonda a fluorescenza in uscita dallo scambiatore. Si imposta una portata di 60 ml/min per la fase gassosa alla composizione di ossigeno del 21%. In seguito si impartisce lo stimolo ipossico nel modo seguente: tramite il software FlowView si agisce sui flussimetri digitali portando la portata d'aria a 0 ml/min e quella di azoto a 60 ml/min e si inizia a registrare l'andamento dell'intensità del segnale della sonda tramite il software OOISensor. Dopo aver raggiunto lo stato stazionario si ripristina il flusso d'aria continuando a misurare il profilo di concentrazione fino al raggiungimento di un nuovo stato stazionario. In Figura 4.2 è mostrato un esempio di segnale registrato tramite la sonda (linea blu) e il corrispondente disturbo nella fase gas (linea rossa).

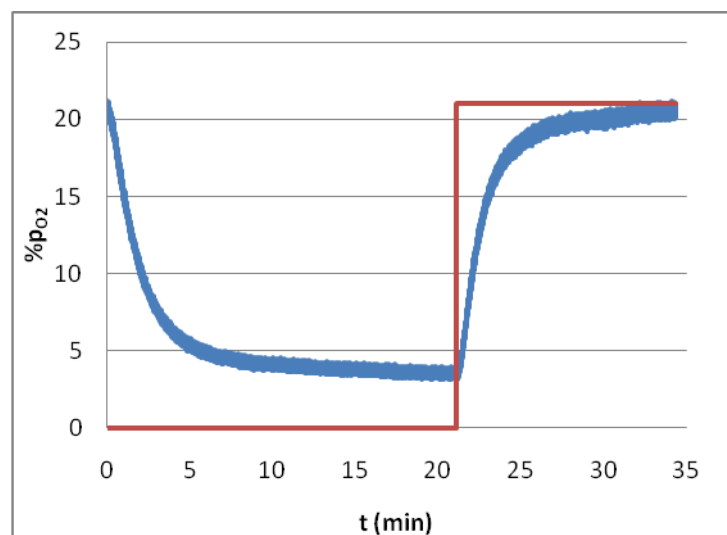


Figura 4.2 Profilo della pressione parziale di ossigeno nel liquido nel tempo in uscita dello scambiatore (linea blu) a seguito di un disturbo a gradino della fase gas (linea rossa) e al disturbo opposto.

Tutte le prove sperimentali effettuate sono riportate in appendice A.

4.2 Risultati

In questo paragrafo si riportano i risultati relativi alle prove sperimentali effettuate prendendo in considerazione solo le combinazioni altezza/portata che consentono di ottenere pressioni parziali di ossigeno in uscita dallo scambiatore inferiori al 5% secondo quanto riportato nel §3.3.3.1 e si calcola l'efficienza dello scambiatore nelle diverse condizioni operative. Si verifica poi la dinamica del sistema evidenziando quali configurazioni riescono a produrre transienti più rapidi.

4.2.1 Stimoli ipossici

In Figura 4.3 sono riportati i risultati delle prove fatte con lo scambiatore avente i canali profondi 40 μm .

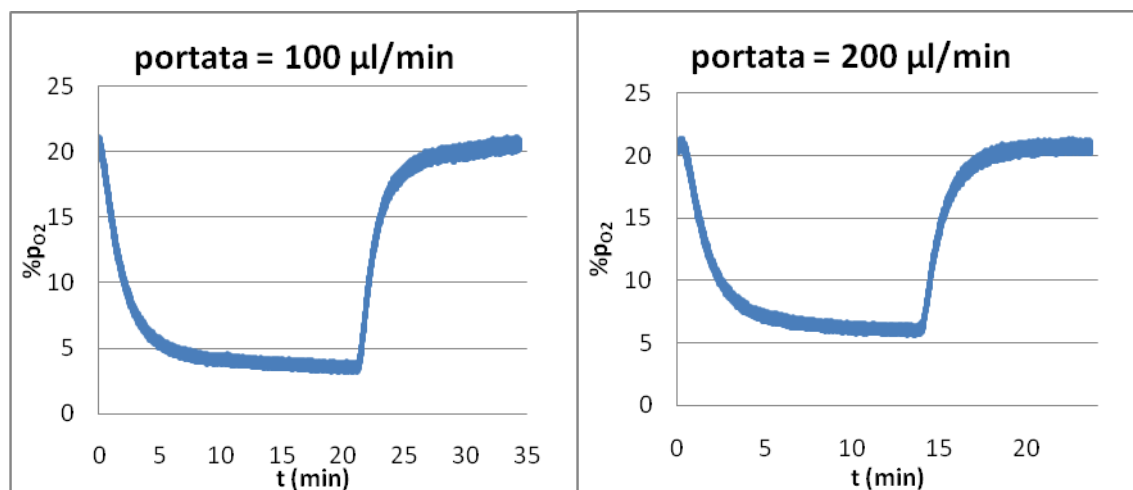


Figura 4.3 Profili della pressione parziale di ossigeno nel tempo a seguito al disturbo a gradino in fase gas ottenuti con canali profondi 40 μm .

Dai grafici si vede come all'aumentare della portata, la concentrazione di ossigeno all'uscita dello scambiatore aumenta in quanto il tempo di permanenza del liquido nello scambiatore diminuisce, consentendo un minore scambio di ossigeno. Con una portata di 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ si raggiunge una pressione parziale del 5% in uscita in cinque minuti, mentre con una portata di 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ si ottiene al massimo una pressione parziale del 6%. L'efficienza di scambio in entrambi i casi è dell'87%.

Nelle Figura 4.4 sono riportati i risultati delle prove effettuate con canali profondi rispettivamente 70 e 100 μm alla portata di 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

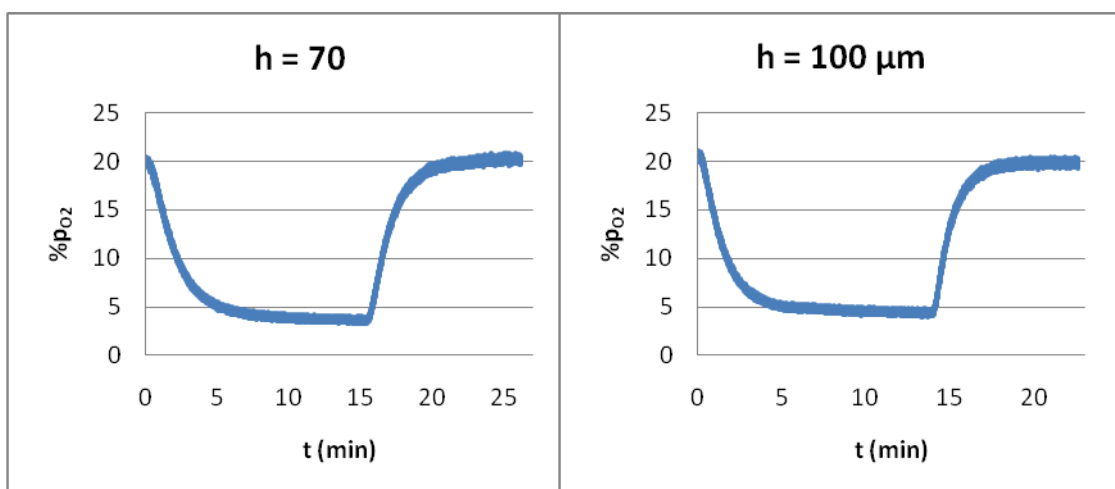


Figura 4.4 Profili della pressione parziale di ossigeno nel tempo a seguito al disturbo a gradino in fase gas ottenuti con canali profondi 70 e 100 μm alla portata di 100 μl/min.

Da un confronto tra i grafici delle Figure 4.3 e 4.4 alla portata di 100 μl/min si riscontra come la concentrazione raggiunta allo stato stazionario aumenti all'aumentare della profondità dei canali come visto nel capitolo precedente (§3.3.3.2). Con entrambe le configurazioni si ottengono pressioni parziali inferiori o uguali al 5%; le efficienze di scambio sono del 93 % nel caso di una profondità di 70 μm, e del 96% nel caso di 100 μm. In Tabella 4.1 sono riportate le efficienze sperimentali, calcolate per i diversi casi, in relazione alle rispettive profondità dei canali.

Tabella 4.1 Efficienze sperimentali relative per le diverse profondità dei canali.

Profondità dei canali (μm)	Efficienza sperimentale %
40	87
70	93
100	96

Si nota che l'efficienza aumenta all'aumentare della profondità dei canali; ciò vuol dire che il modello descrive meglio il fenomeno di scambio nel caso di canali profondi 100 μm e questo può essere dovuto alla geometria dei canali stessi. Si può ipotizzare ad esempio che il processo di *etching*, a bassi tempi di immersione, permetta di ottenere canali di forma più circolare che rettangolare, come ipotizzato nel modello.

In Figura 4.5 sono riportati i valori della pressione parziale di ossigeno in uscita dallo scambiatore allo stato stazionario in funzione della portata, con profondità dei canali costante e nel caso inverso.

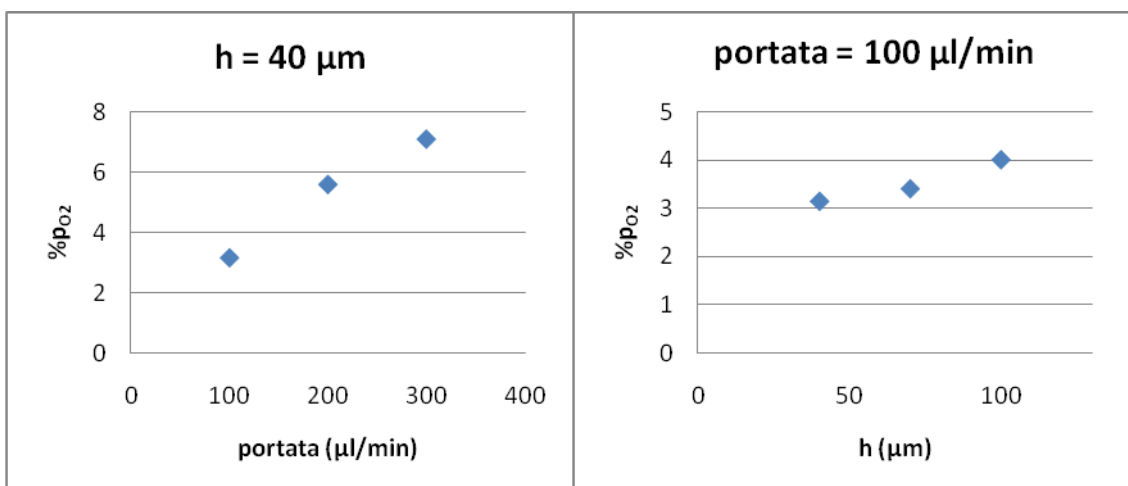


Figura 4.5 Pressioni parziali di ossigeno in uscita dallo scambiatore allo stato stazionari, h costante in funzione della portata e portata costante in funzione di h .

I grafici di Figura 4.5 mettono in risalto come i due parametri influiscano diversamente sulla concentrazione in uscita dallo scambiatore, infatti si può vedere come una variazione della portata della fase liquida incida maggiormente sulla pressione parziale in uscita che non una variazione della profondità dei canali.

4.2.2 Stimoli con concentrazioni variabili in fase gas

Di seguito si riportano i risultati ottenuti con stimoli in fase gassosa a diverse pressioni parziali di ossigeno (0, 5, 10, 15 %), nel caso dello scambiatore con canali profondi 40 µm e una portata di 200 µl/min.

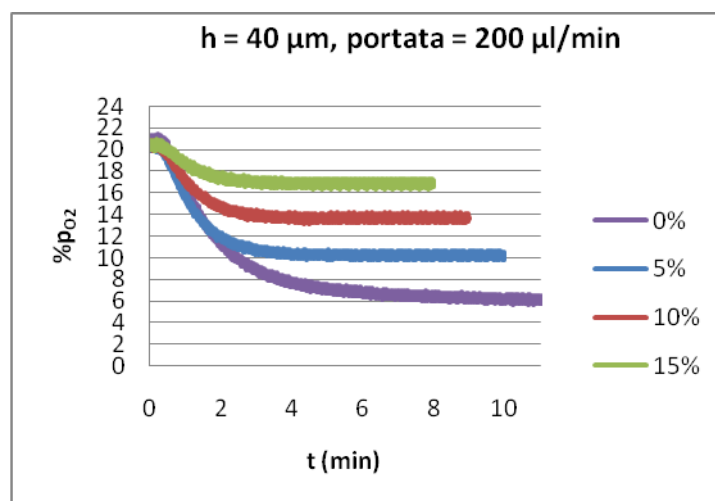


Figura 4.6 Profili della pressione parziale di ossigeno nel tempo a seguito al disturbo a gradino nella fase gas ottenuti con canali profondi 40 µm a una portata di 200 µl/min.

Anche questo grafico conferma gli andamenti predetti dal modello matematico con efficienze sperimentali attorno al 90%.

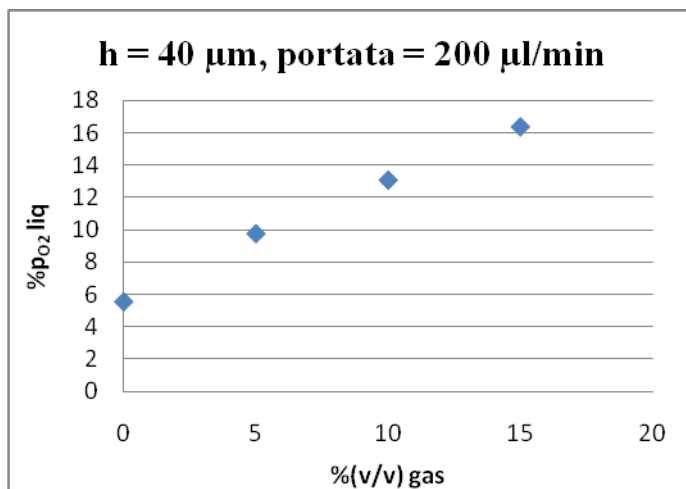


Figura 4.7 Valori delle pressioni parziali di ossigeno in uscita dallo scambiatore allo stato stazionario in funzione della composizione nella fase gas per canali profondi 40 μm alla portata di 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.

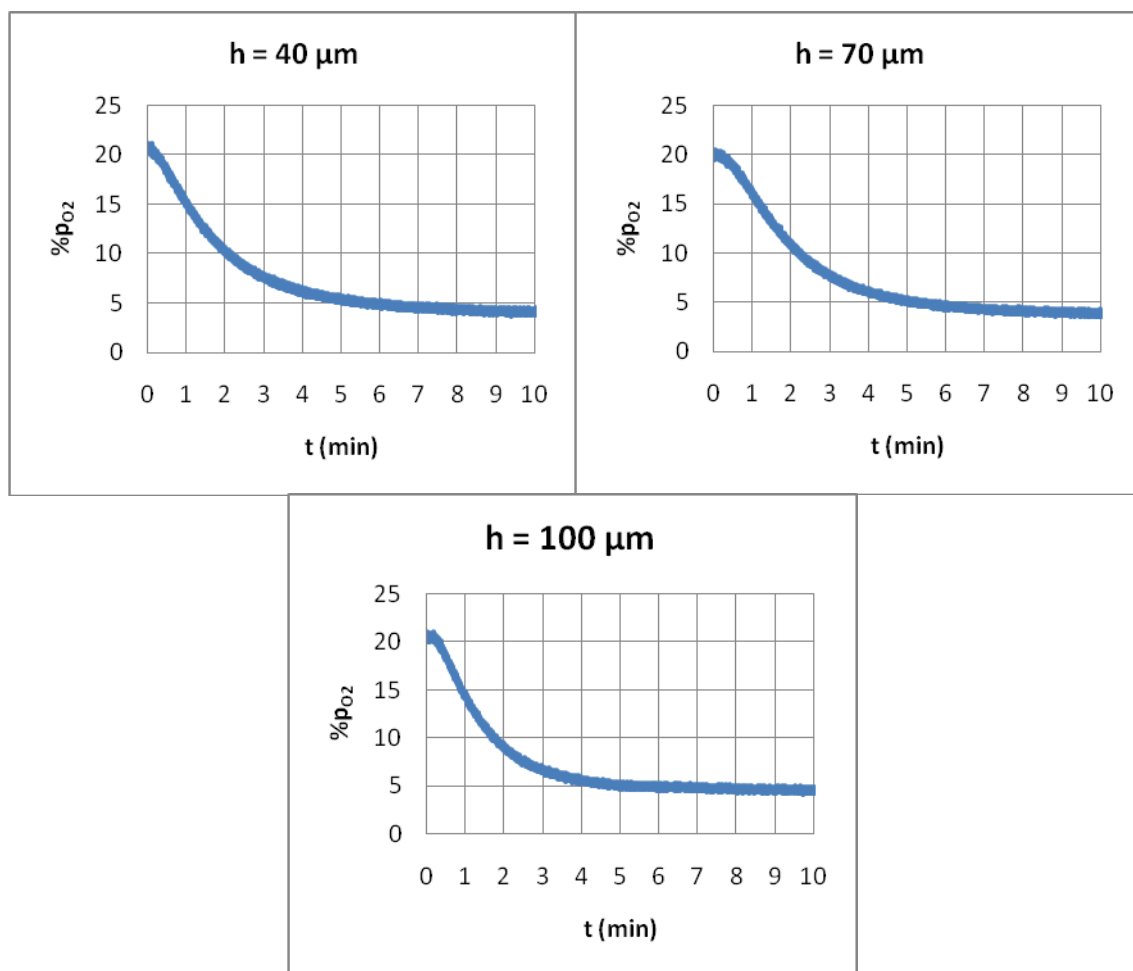


Figura 4.8 Profili della pressione parziale di ossigeno nel tempo a seguito al disturbo a gradino nella fase gas a una portata di 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

4.2.3 Valutazione della dinamica del processo

Lo scopo di questo scambiatore è quello di produrre una variazione della pressione parziale di ossigeno nella fase liquida nel più breve tempo possibile. In figura 4.8 sono riportati gli andamenti della pressione parziale nel tempo alla portata di 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ alle diverse profondità dei canali. Questi grafici mostrano che per ogni valore di altezza si ottiene una pressione parziale del 5% in un tempo inferiore o uguale a 5 minuti. I tempi ottenuti nelle tre prove sono tuttavia molto simili, con una variazione massima del 20%, anche a fronte di un aumento dell'altezza dei canali di oltre il 100%. Questo fenomeno può essere dovuto al fatto che la resistenza allo scambio di materia offerta dalla membrana, costante nelle tre prove, è maggiore di quella in fase liquida e quindi risulta determinante nella dinamica del processo.

Si ritiene che la configurazione migliore sia quella con altezza di 40 μm , che, rispetto alle altre due, garantisce una riduzione di concentrazione maggiore in seguito allo stimolo ipossico.

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata testata e ottimizzata una piattaforma microfluidica realizzata allo scopo di controllare, in tempi rapidi, la pressione parziale di ossigeno del *medium* in una coltura cellulare.

Per trovare le variabili che regolano lo scambio di ossigeno all'interno dei canali microfluidici è stato sviluppato un modello matematico, risolvendo i bilanci di materia dell'ossigeno nella fase liquida. Si è trovato che la concentrazione di ossigeno all'uscita dello scambiatore dipende, oltre che dalla lunghezza dei canali, anche dalla loro geometria, dalla velocità del liquido, dalla concentrazione di ossigeno nella fase gas e dalla resistenza al trasporto di materia nelle tre fasi. Si sono tracciati i profili di pressione parziale nello scambiatore al variare della profondità dei canali, della portata del liquido e della concentrazione della fase gassosa e si sono individuate le coppie di valori altezza/portata che consentono di ottenere pressioni parziali in uscita inferiori al 5%.

La piattaforma è stata validata sperimentalmente con diverse condizioni operative misurando nel tempo, tramite una sonda a fluorescenza, la pressione parziale di ossigeno nella fase liquida in uscita dallo scambiatore, a seguito di un disturbo a gradino nella fase gassosa.

I risultati ottenuti confermano gli andamenti ricavati dal modello matematico; in particolare all'aumentare della portata del liquido la pressione parziale raggiunta allo stazionario aumenta. Lo stesso effetto si ottiene con un aumento della profondità dei canali. Si è trovato, inoltre, che l'efficienza di scambio, definita come la variazione di concentrazione sperimentale rispetto a quella teorica, è circa il 90% per tutte le configurazioni.

Appendice A

In questa appendice verranno riportati i risultati di tutte le prove sperimentali effettuate.

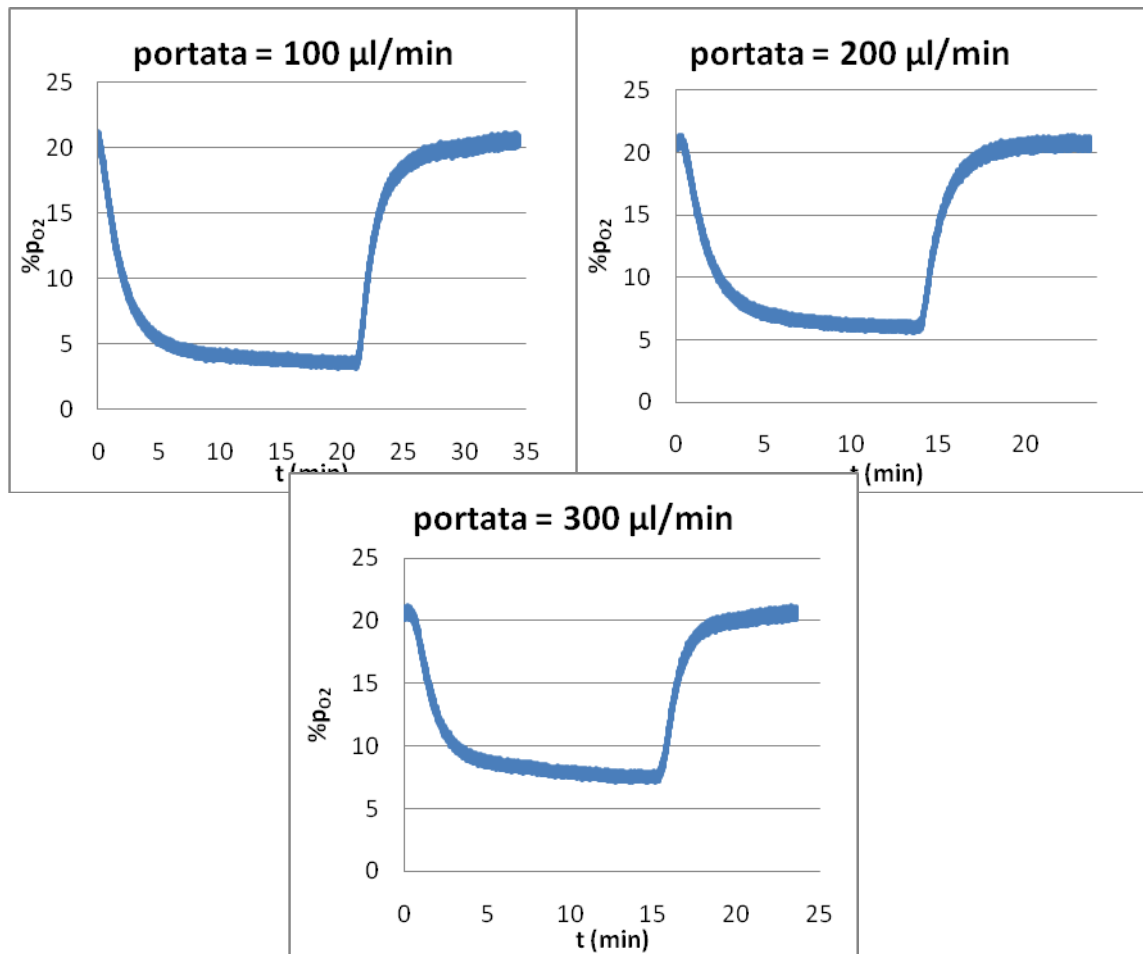


Figura A.1 Profili della pressione parziale di ossigeno nel tempo a seguito al disturbo a gradino in fase gas ottenuti con canali profondi 40 µm.

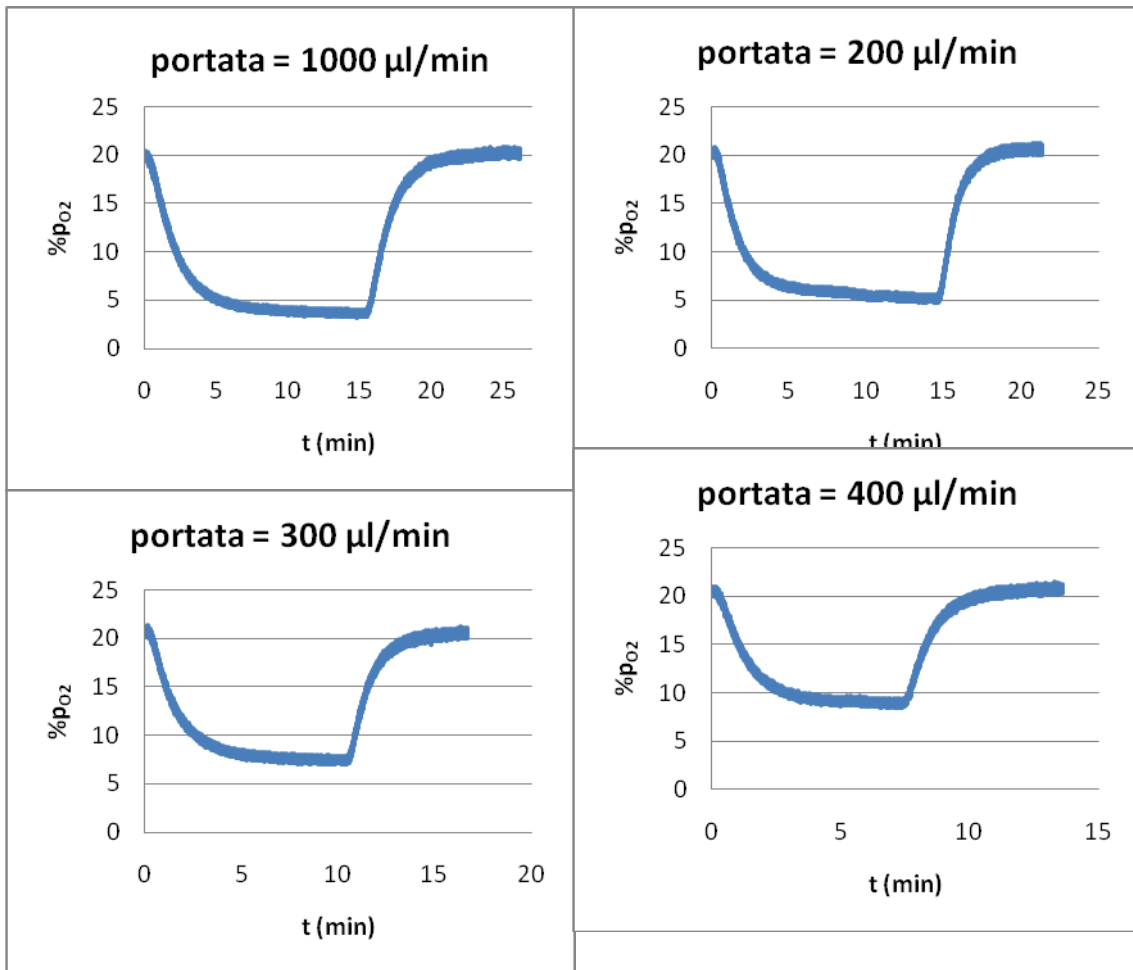


Figura A.2 Profili della pressione parziale di ossigeno nel tempo a seguito al disturbo a gradino in fase gas ottenuti con canali profondi 70 µm.

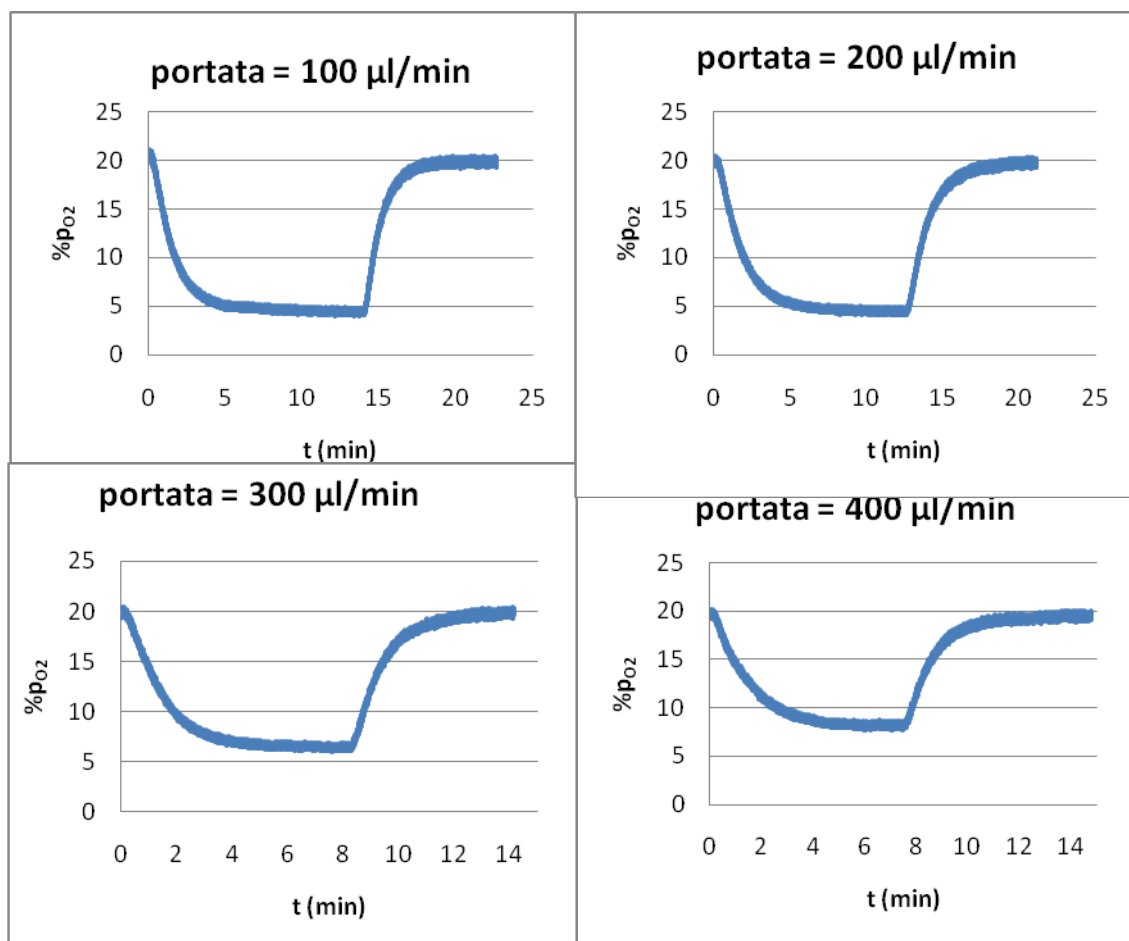


Figura A.3 Profili della pressione parziale di ossigeno nel tempo a seguito al disturbo a gradino in fase gas ottenuti con canali profondi 100 µm.

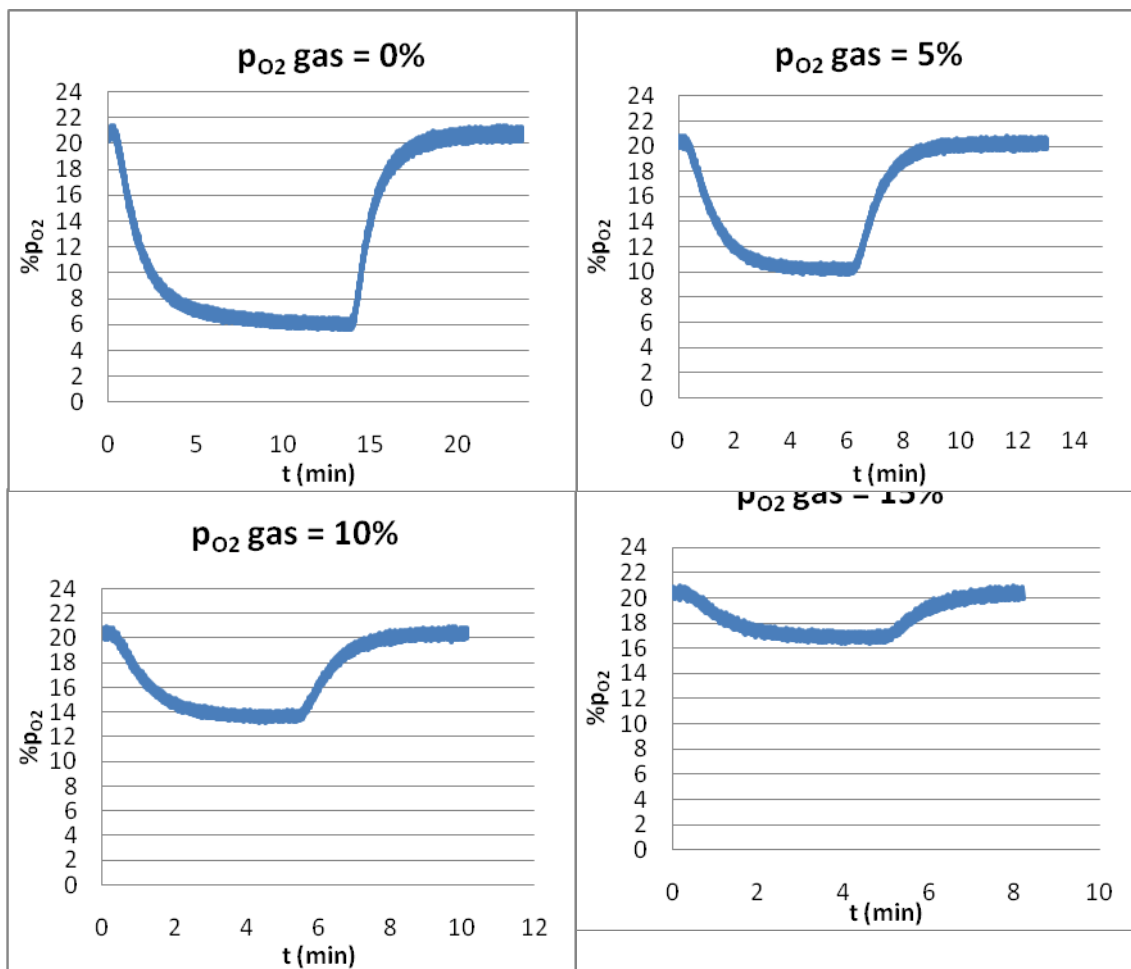


Figura A.4 Profili della pressione parziale di ossigeno nel tempo a seguito al disturbo a gradino in fase gas ottenuti con canali profondi 100 μm e una portata di 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Riferimenti bibliografici

- Kim L., Toh Y., Voldman J., and Yu H. (2007). "*A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells.*" Lab on a chip 7: 681-694
- Michielin F., "*Sviluppo di una piattaforma microfluidica per il controllo della concentrazione di ossigeno in colture cellulari.*" Tesi di laurea 2009-2010
- Muschler G.F., Nakamoto C., and Griffith L.G. (2004). "*Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering.*" J. Bone Joint Surg. Am. 86-A: 1541-1558
- Nock V., Blaikie R J. and David T. (2008). "*Patterning, integration and characterisation of polymer optical oxygen sensors for microfluidic devices.*" Lab on a Chip 8:1300-1307
- Polinkovsky M., Gutierrez E., Levchenko A., and Groisman A. (2009). "*Fine temporal control of the medium gas content and acidity and on-chip generation of series of oxygen concentrations for cell cultures.*" Lab on a chip 9: 1073-1084
- Whitesides G.M. (2006). "*The origins and the future of microfluidics.*" Nature 442: 368-373
- Van Stroey-Beize S.A.M., Janssen A.P.M., and Janssen L.J.J. (1993). "*Solubility of oxygen in glucose solutions.*" Analytica Chimica Acta 280: 217-222
- Vollmer A.P., Probst R.F., Gilbert R., and Thorsen T. (2005). "*Development of an integrated microfluidic platform for dynamic oxygen sensing and delivery in a flowing medium.*" Lab on a chip 5: 1059-1066
- Xia Y. and Whitesides G.M. (1998). "*Soft lithography.*" Ann. Rev. Mater. Sci. 28:153-184
- Zambon A., "*Sviluppo e fabbricazione di una piattaforma microfluidica multistrato per il controllo di colture cellulari microstrutturate.*" Tesi di laurea in ingegneria chimica 2008-2009