

Generador microfluídico de gradientes de concentración, independiente del caudal, impreso en 3D

Resumen: *Los generadores microfluídicos de gradientes de concentración (GMGC) del tipo árbol, así como otras geometrías, dependen de la difusión molecular para lograr los gradientes de concentración. Esta condición limita el caudal al que pueden funcionar, para el caso de los generadores de gradiente de flujo continuo, ya que la mezcla completa de dos corrientes debe ocurrir en una rama antes de llegar a la siguiente bifurcación. Es así que estos GMGC funcionan bien a bajo número de Peclet (Pe). En este trabajo, se presenta un concepto diferente de GMGC en el que se logra un preciso dosaje antes del mezclado, haciendo que este simple diseño sea independiente del caudal. Esto significa que se pueden lograr perfiles de concentración arbitrarios a cualquier caudal en el régimen laminar. Se presentan a continuación resultados de experiencias de este nuevo diseño propuesto. Los chips microfluídicos presentados en este trabajo fueron fabricados mediante impresión 3d en una impresora de resina LCD, mediante una resina comercial transparente lavable con agua.*

1. Introducción

Los generadores de gradientes de concentración se han convertido en una herramienta importante para el estudio de procesos biológicos como el crecimiento celular, quimiotaxis, procesos tales como nucleación y crecimiento de cristales, así como el screening de drogas, y la medicina personalizada [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Uno de los primeros GMGC fue introducido por Jeon *et al.* [8]. Durante los siguientes 20 años han surgido varias propuestas alternativas. Se pueden encontrar descripciones de estas alternativas en [9, 6, 10, 11]. En la configuración de tipo árbol, o de pre-mezcla, los líquidos de idéntico caudal y diferente concentración de soluto convergen en un canal. La difusión molecular es responsable de que ocurra el mezclado entre estas dos corrientes de modo que al final de dicho canal la concentración de soluto es la media de las dos corrientes que ingresaron. Luego el flujo se divide en dos y el proceso se repite. Si no ocurre un mezclado total antes de llegar a la bifurcación, esta configuración comienza a fallar y no se logra el gradiente de concentración

buscado. Dado que la dilución se realiza en serie (una después de la otra), el caudal queda limitado a aquél que permite una mezcla total en los canales de mezcla mencionados. En este trabajo se presenta una idea diferente. La red de microcanales es diseñada para que dos líquidos de concentración de soluto diferente converjan en un canal, pero con un caudal determinado previamente. Así, la concentración final en cada canal será una función de los caudales de los líquidos que llegan al mismo. En este trabajo se presenta un gradiente lineal con 8 ramas, pero el set-up se puede modificar fácilmente para lograr otro tipo de gradiente de concentración (cuadrático, exponencial, etc.) y tantas ramas como se desee. La performance de este diseño fue ensayada en el rango de 0.04 a 10 ml/h .

2. Materiales and Métodos

Para que un GMGC de tipo pre-mezcla funcione, debe ocurrir un mezclado completo en cada etapa de dilución. En un mezclador tipo T, el mezclado completo ocurre a una determinada distancia de la entrada. Esta distancia

es proporcional a la velocidad media del flujo. Para el caso de velocidad uniforme en el canal, esta distancia mínima de mezclado es proporcional al número de Peclet (Pe) como muestra la figura 1. En ella se puede observar que $L_{fulmix}^* \sim Pe/2.37$.

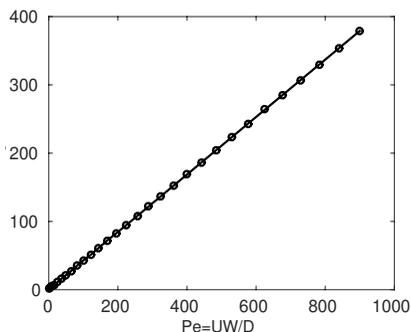


Figura 1: Distancia adimensional desde la entrada del mezclador tipo T, en función de Pe . Se observa dependencia lineal: $L_{fulmix}^* \sim Pe/2.37$.

En este trabajo, se presenta a modo de comparación un mezclador de tipo árbol, que tiene una longitud de mezcla de $3600 \mu m$ entre diluciones sucesivas.

Los canales tienen $400 \mu m$ de ancho y $200 \mu m$ de alto, por lo que este GMGC funcionará bien hasta $Pe = 21$, es decir para una velocidad media de entrada (en cada ingreso) de $U_{inlet} = 26 \mu m/s$ o un caudal $Q_{inlet} = 7.6 \mu l/h$. Con este caudal, el chip necesitaría $1600 s$ para establecer el gradiente de concentración.

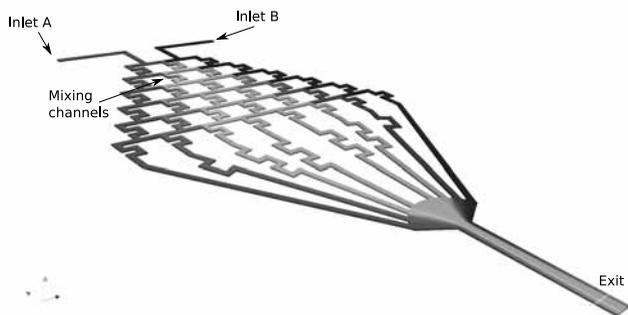


Figura 2: Diseño de GMGC tipo árbol. Entradas y canales de mezcla están indicados en la figura.

Por otro lado, presentamos en este trabajo un diseño diferente de GMGC. En lugar de mezclar dos líquidos con igual caudal y diferente concentración, diseñamos el chip para mezclar en cada nodo un caudal pre-seteado de dos concentraciones diferentes. Conociendo de antemano los caudales que ingresan en cada canal de mezcla, la concentración final en cada canal queda fijada, independientemente de los caudales, siempre y cuando se mantenga la relación de caudales. En flujo laminar, el caudal en cada rama es proporcional a la

caída de presión, e inversamente proporcional a la longitud del canal. Entonces proponemos un chip con dos entradas (llamadas A y B) como el de la figura 3.

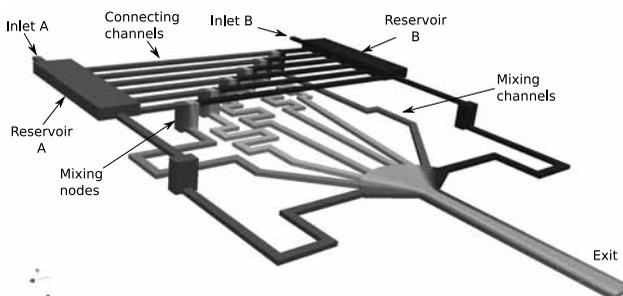


Figura 3: Nuevo diseño de GMGC. Entradas, reservorios, canales de conexión y canales de mezcla están indicados en la figura.

Estas entradas conducen a un reservorio cerrado de dimensiones lo suficientemente grandes para que la presión en su interior pueda considerarse constante. Luego, una serie de microcanales de diferente longitud conectan estos reservorios al canal de mezcla. La longitud de estos canales de conexión se calcula de modo de obtener un determinado caudal. La suma de las longitudes de los canales de conexión es constante, y la relación de caudales está dada por la relación de longitudes. El caudal en los canales de mezcla está dado por sus dimensiones (sección transversal y longitud). En el diseño propuesto aquí elegimos obtener caudales iguales en cada uno de los 8 canales de mezcla. Cabe aclarar que el número de canales de mezcla no está limitado. Además, en este diseño las longitudes de los canales de conexión fueron elegidas para obtener un gradiente lineal de concentración, pero cualquier función es posible cambiando las relaciones de longitud de los mismos.

Este nuevo diseño fue impreso en 3D mediante una impresora Anycubic Photon, usando una resina lavable con agua de 3Dresyns (WC clear color, biobased). Se conectaron tubos de Tygon directamente a los orificios de entrada y salida, los cuales eran ligeramente más pequeños en diámetro que los tubos. El flujo fue establecido mediante una bomba a jeringa desarrollada para tal fin [12].

Se realizaron experimentos con una solución acuosa coloreada azul en una de las entradas, y agua milliQ en la otra. También se realizaron experiencias mezclando soluciones acuosas coloreadas de azul y naranja. Se obtuvieron imágenes con un microscopio digital Andonstar V160, que luego fueron post-procesadas.

3. Resultados

En primer lugar se presentan los resultados del gradiente obtenido al mezclar dos soluciones coloreadas en el chip

impreso en 3D (Fig. 4). Esta imagen permite visualizar cualitativamente que, incluso a alto Pe , el gradiente de concentración logra formarse en el canal de salida. Además, a medida que aumenta el caudal, en la salida de cada canal de mezcla se observa un mezclado más pobre. Sin embargo, dado que cada canal contiene la dosis correcta de cada solución, cuando los canales de mezcla confluyen en el canal de salida el gradiente se forma de todos modos. A alto Pe se observan fluctuaciones en el gradiente de concentración. Es de notar, sin embargo, que no se ha realizado ningún esfuerzo en el diseño del presente chip para promover el mezclado en los canales de mezcla. Un patrón en zig-zag, o paredes onduladas podrían intensificar el mezclado debido a flujos secundarios en regímenes inerciales [13], aunque ese no es el objetivo de este trabajo.

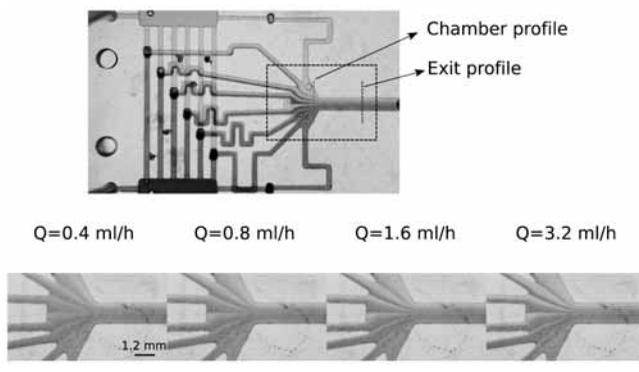


Figura 4: Nuevo diseño de GMGC. Visualización cualitativa del gradiente formado a distintos caudales de entrada, desde 0.4 a 3:2 ml=h. Imagen superior: chip completo. La región con línea punteada es ampliada en la parte inferior, a distintos caudales. Las líneas punteadas roja y azul indican las posiciones de los perfiles mostrados en la figura 5.

Los mismos experimentos fueron realizados con una solución coloreada, y agua milliQ en el otro ingreso. Se obtuvieron perfiles de concentración mediante post-procesado de imágenes (remoción del fondo, normalizado), en la posición indicada mediante las líneas punteadas azul y roja mostradas en la figura 4. La intensidad normalizada es proporcional a la concentración de tinta. El resultado se puede observar en la figura 5-a, para la cámara de mezcla, y en la figura 5-b para el canal de salida, a diferentes caudales. En dicha figura se puede observar que pese a que a altos caudales se observa un mezclado pobre a la salida de los canales de mezcla, el gradiente de concentración aún puede observarse en el canal de salida.

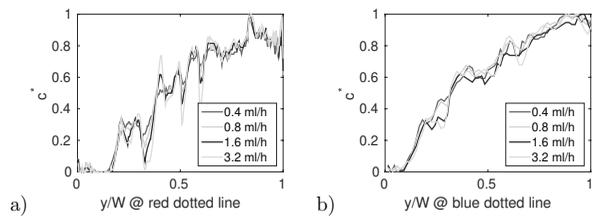


Figura 5: Nuevo diseño de GMGC. a) Perfiles de intensidad experimental en la cámara (línea roja en la figura 4). b) Perfiles de intensidad experimental en el canal de salida (línea azul en la figura 4). Distintos caudales desde 0.4 a 3:2 ml=h.

4. Conclusiones

En este trabajo se ha presentado un nuevo concepto de generador de gradiente de concentración microfluidico. La novedad reside en dosificar arbitrariamente el caudal de cada rama antes de mezclar las soluciones. De este modo, este diseño funciona independientemente del caudal inyectado. Asimismo, este diseño puede ser modificado para generar gradientes no lineales. Se ha mostrado como prueba de concepto un chip capaz de generar un gradiente de concentración lineal inclusive a caudales elevados. Las imágenes de este trabajo han sido tomadas de una publicación del mismo autor en la revista *Chemical Engineering Journal*, titulada: “Flowrate independent 3D printed microfluidic concentration gradient generator”, disponible online desde septiembre de 2019.

5. Referencias

- [1] N. Li Jeon, H. Baskaran, S. K. Dertinger, G. M. Whitesides, L. V. De Water, M. Toner, Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device, *Nature Biotechnology* 20 (8) (2002) 826-830. doi:10.1038/nbt712
- [2] T. Mulholland, M. Mcallister, S. Patek, D. Flint, M. Underwood, A. Sim, J. Edwards, M. Zagnoni, Drug screening of biopsy-derived spheroids using a self-generated microfluidic concentration gradient, *SCIENTIFIC REPORTS* 8 (2018) 14672. doi:10.1038/s41598-018-33055-0
- [3] W. Lim, S. Park, A Microfluidic Spheroid Culture Device with a Concentration Gradient Generator for High-Throughput Screening of Drug Efficacy, *Molecules* 23 (12) (2018) 3355. doi:10.3390/molecules23123355
- [4] N. T. Nguyen, S. A. M. Shaegh, N. Kashaninejad, D. T. Phan, Design, fabrication and characterization of drug delivery systems based on lab-on-a-chip technology, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (11-12) (2013) 1403-1419. doi:10.1016/j.addr.2013.05.008

- [5] M. H. Wu, S. B. Huang, G. B. Lee, Microfluidic cell culture systems for drug research, *Lab on a Chip* 10 (8) (2010) 939{956. doi:10.1039/b921695b
- [6] S. Kim, H. J. Kim, N. L. Jeon, Biological applications of microfluidic gradient devices, *Integrative Biology* 2 (11-12) (2010) 584{603. doi:10.1039/c0ib00055h
- [7] H. Shi, K. Nie, B. Dong, M. Long, H. Xu, Z. Liu, Recent progress of microfluidic reactors for biomedical applications, *Chemical Engineering Journal* 361 (2019) 635{650. doi:10.1016/J.CEJ.2018.12.104
- [8] N. L. Jeon, S. K. Dertinger, D. T. Chiu, I. S. Choi, A. D. Stroock, G. M. Whitesides, Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems, *Langmuir* 16 (22) (2000) 8311{8316. doi:10.1021/la000600b
- [9] T. M. Keenan, A. Folch, Biomolecular gradients in cell culture systems, *Lab on a Chip* 8 (1) (2007) 34{57. doi:10.1039/b711887b
- [10] A. G. G. Toh, Z. P. Wang, C. Yang, N.-T. Nguyen, Engineering microfluidic concentration gradient generators for biological applications, *Microfluidics and Nanofluidics* 16 (1) (2014) 1-18. doi:10.1007/s10404-013-1236-3
- [11] C.-Y. Lee, L.-M. Fu, Recent advances and applications of micromixers, *Sensors and Actuators B: Chemical* 259 (2018) 677-702. doi:10.1016/J.SNB.2017.12.034
- [12] J. M. Cabaleiro, E. Elizalde, syringe-pumpV2, <https://github.com/jmcabaleiro/syringe-pumpV2> (october 2018).
- [13] H. Amini, W. Lee, D. Di Carlo, Inertial microfluidic physics, *Lab on a Chip* 14 (15) (2014) 2739{2761. doi:10.1039/c4lc00128a