

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica



**PROGETTAZIONE DI UN SISTEMA MICROFLUIDICO
PER TEST FARMACOLOGICI**

Relatore: Prof. Gabriele DUBINI

Correlatore: Ing. Francesca NASON

Tesi di Laurea Specialistica di:

Simone BERSINI

Matricola 734617

Anno Accademico 2009-2010

Desidero ringraziare il Professor Gabriele Dubini per il supporto fornito, i preziosi suggerimenti e la disponibilità mostrata durante il lavoro di tesi.

Un sincero ringraziamento alla Professoressa Federica Boschetti per l'aiuto fornito durante le prove sperimentali ed al Professor Giancarlo Pennati per gli utili consigli che hanno contribuito al completamento del progetto.

Un grazie speciale a Francesca per la pazienza, disponibilità e competenza mostrate in questi mesi di lavoro e per essere stata un costante punto di riferimento.

Ai miei genitori e a coloro che mi sono stati vicino va il mio grazie più grande per avermi supportato nei momenti di difficoltà.

Indice

Sommario	I
Summary	XII
Obiettivo della Tesi	XXIII
Capitolo 1	
Stato dell'arte	1
Introduzione	2
1.1 Caratteristiche generali del tessuto osseo	2
1.1.1 <i>Struttura e composizione</i>	3
1.1.2 <i>Cellule ossee</i>	7
1.1.3 <i>Ossificazione</i>	9
1.1.4 <i>Metabolismo osseo</i>	11
1.1.5 <i>Malattie metaboliche ossee e tessuto osseo senescente</i>	13
1.1.6 <i>Conclusioni</i>	19
1.2 Le origini e il futuro della microfluidica	20
1.2.1 <i>Generazione di gradienti di concentrazione molecolari</i>	23
1.2.2 <i>Applicazioni microfluidiche</i>	38
1.2.3 <i>Conclusioni</i>	55
1.3 Microfabbricazione e materiali	56
1.3.1 <i>La microlitografia</i>	56
1.3.2 <i>Soft lithography</i>	60
1.3.3 <i>Il Polidimetilsilossano - PDMS</i>	61
1.3.4 <i>Microfabbricazione di un dispositivo microfluidico</i>	68
Capitolo 2	
Progettazione di un dispositivo microfluidico per la generazione di diverse concentrazioni di farmaco	72
2.1 Introduzione	73
2.2 Specifiche generali del dispositivo	73
2.3 Il progetto iniziale: dispositivo per la generazione di un gradiente di concentrazione	74
2.3.1 <i>Modello analitico</i>	75
2.3.2 <i>Simulazioni computazionali</i>	77
2.4 La soluzione progettuale sviluppata: dispositivo microfluidico innovativo	84
2.4.1 <i>Progettazione e ottimizzazione del dispositivo</i>	84
2.4.2 <i>Equivalenti elettrico del circuito</i>	86
2.4.3 <i>Perdite di carico</i>	87

2.4.4 Progettazione della rete di distribuzione ai pozzetti di coltura	88
2.4.5 Progettazione dei micromixer	90
2.4.6 Progettazione della rete di distribuzione del mezzo di coltura.....	93
2.4.7 Progettazione della rete di distribuzione del farmaco	96
2.4.8 Progettazione dei pozzetti di coltura e del sistema di distribuzione	96
2.5 Simulazioni numeriche dei componenti del sistema.....	97
2.5.1 Generazione della griglia di calcolo e condizioni al contorno del problema	97
2.5.2 Proprietà termofisiche del farmaco.....	99
2.5.3 Analisi di sensitività spaziale	99
2.5.4 Risultati e discussione	99
Capitolo 3	
Test sperimentali	110
3.1 Introduzione	111
3.2 Componenti del sistema μ PIV.....	111
3.3 Preparazione della Rodamina WT	112
3.4 Analisi sperimentale dei micromixer.....	113
3.5 Analisi sperimentale del meccanismo di spillamento	117
3.6 Calcolo del coefficiente di diffusione dello stronzio-cloruro	119
3.7 Scelta del materiale per la realizzazione del dispositivo	121
Capitolo 4	
Conclusioni e sviluppi futuri	125
Appendice	128
Bibliografia	150

Sommario

Introduzione

La microfluidica è la scienza e tecnologia di sistemi che processano e manipolano ridotte quantità di fluidi (da 10^{-9} a 10^{-18} litri) attraverso canali con dimensioni di centinaia di micrometri. Le prime applicazioni delle tecnologie microfluidiche si sono concentrate nel campo della microanalisi grazie alla possibilità di utilizzare ridottissime quantità di campioni e reagenti, di separare e individuare molecole con elevata risoluzione e sensibilità, di controllare nello spazio e nel tempo la concentrazione di determinate specie chimiche e di ottenere risultati significativi in tempi brevi con costi limitati [Whitesides, 2006]. La ricerca costante ha portato allo sviluppo di apparecchiature sempre più compatte e versatili ed ha consentito di individuare nuove potenziali applicazioni nei campi della biochimica e della biologia molecolare e cellulare. Un dispositivo microfluidico (figura A) è composto generalmente da una serie di componenti specifici, tra cui: un sistema per l'introduzione di campioni e reagenti, per la movimentazione e per l'eventuale miscelamento dei fluidi all'interno dei microcanali presenti sul *chip*, sensori per analisi chimiche ed eventuali sistemi di purificazione nel caso in cui il sistema sia utilizzato per scopi di sintesi.

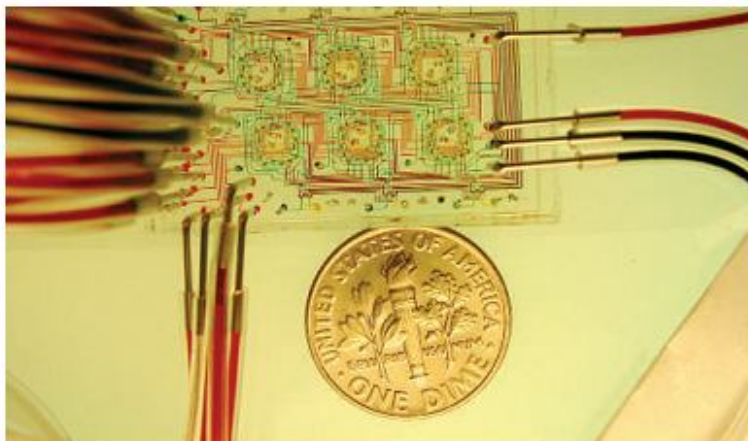


Figura A – Dispositivo microfluidico utilizzato per studi su cellule procariote. [Whitesides, 2006]

Lo sviluppo delle tecniche di *soft-lithography* e l'utilizzo del polidimetilsilossano (PDMS) hanno consentito di realizzare numerosi prototipi e di testare nuove soluzioni progettuali e componenti. Il PDMS, grazie alla trasparenza ottica, all'elevata permeabilità ai gas e all'ottima risposta evidenziata nei test di citotossicità costituisce un materiale adatto per la realizzazione di microcamere in cui coltivare cellule, osservarne il comportamento e studiarne il citoscheletro.

Un interessante campo di ricerca è quello rappresentato dallo studio delle malattie metaboliche ossee ed in particolare dell'osteoporosi, definita da Floman come "una patologia dell'età senescente caratterizzata da una progressiva diminuzione di massa ossea e dall'alterazione dell'intera architettura ossea" (figura B) [Bono et al., 2003].

Numerose terapie per il trattamento dell'osteoporosi sono basate sul tentativo di limitare l'attività degli osteoclasti o di stimolare l'attività degli osteoblasti ed i relativi processi di proliferazione e differenziazione cellulare. Diversi fattori di regolazione possono contribuire all'incremento nella capacità di apposizione di nuova matrice ossea; tuttavia il beneficio che tali molecole apportano sull'attività degli osteoblasti è bilanciato da potenziali effetti tossici che queste possono avere su altri tessuti oltre che da svariati effetti collaterali. Inoltre, i benefici apportati da diversi farmaci sono ottenibili solo in presenza di concentrazioni adeguate nel microambiente osseo; per questo motivo sviluppi futuri di terapie basate su fattori di crescita o altre molecole richiederanno un efficace meccanismo di rilascio così da garantire il raggiungimento della concentrazione desiderata nel sito di interesse.

Una classe di molecole in grado di promuovere l'attività degli osteoblasti ed al contempo limitare il riassorbimento osseo ad opera degli osteoclasti è rappresentata dai cosiddetti DABA (*dual action bone agents*) tra i quali è presente lo stronzio ranelato, oggetto di studio di numerose recenti ricerche.

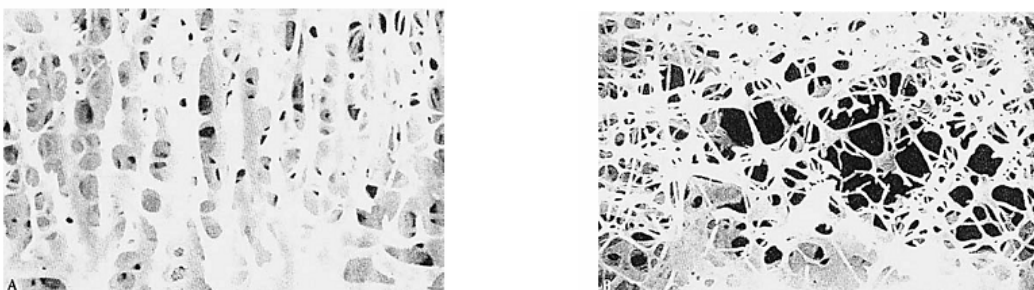


Figura B – Confronto tra osso fisiologico (sinistra) ed osteoporotico (destra) da cui è possibile osservare una notevole differenza in termini di interconnessioni e densità ossea. [Bono et al., 2003]

Obiettivo

Obiettivo del presente lavoro è la progettazione di un innovativo sistema microfluidico che consenta di valutare l'efficacia di un farmaco antiosteoporotico su popolazioni cellulari. In particolare, il fine ultimo è la possibilità di correlare la concentrazione del farmaco con gli effetti riscontrati sul metabolismo cellulare. Il dispositivo prevede l'esposizione di colture cellulari a cinque diversi livelli di concentrazione del farmaco, lo stronzio ranelato, mediante una rete microfluidica per la distribuzione dei fluidi alle cellule.

Il progetto è stato realizzato in collaborazione con il laboratorio di colture cellulari e biologia molecolare dell'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano e con il *Center for Materials and Microsystems* della Fondazione Bruno Kessler (FBK) di Trento grazie ad un finanziamento ottenuto dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Trento e Rovereto (Caritro).

Materiali e metodi

Le specifiche generali del dispositivo, concordate con i biologi dell'Istituto Ortopedico Galeazzi, hanno previsto la realizzazione di cinque livelli di concentrazione di stronzio ranelato all'interno di *medium* per colture cellulari da indirizzare verso i pozzetti di coltura contenenti le popolazioni di osteoblasti. Per ogni valore di concentrazione sono stati previsti nove pozzetti di coltura così da poter realizzare test di vitalità cellulare in sestuplicato e di proliferazione cellulare in triplicato. Un importante requisito è stato quello di garantire un tempo ottimale di riempimento delle microcamere: assumendo dei pozzetti caratterizzati da un diametro di 6.4 mm e da un volume di 200 μ l i biologi hanno sottolineato la necessità di creare un sottile velo di *medium* in un arco temporale di pochi minuti.

Dimensioni e possibili geometrie della piattaforma microfluidica sono invece state stabilite dal gruppo di ricerca di Trento tenendo conto dei limiti tecnici nel processo di microfabbricazione: le due alternative proposte sono state una struttura circolare con diametro 9 cm ed una quadrata con lato 7.18 cm.

La progettazione del dispositivo è stata inizialmente indirizzata verso un sistema di generazione di gradiente di concentrazione basato su spillamenti successivi: due microcanali in cui sono inseriti mezzo di coltura e stronzio ranelato confluiscono in un condotto centrale dal quale vengono spillate delle portate predeterminate con i livelli di concentrazione desiderati ottenuti unicamente mediante processi diffusivi (figura C).

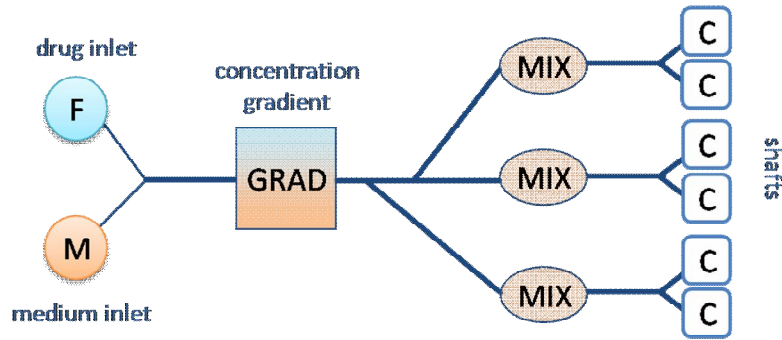
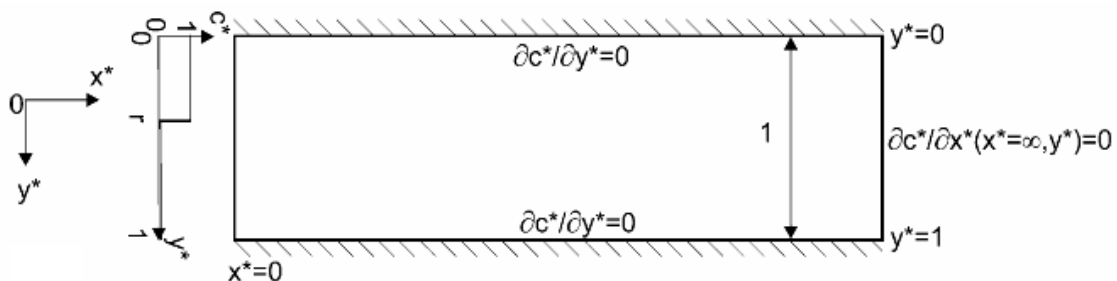


Figura C – Modello di dispositivo microfluidico basato su spillamenti successivi.

Assumendo le concentrazioni di farmaco presenti nei due ingressi del sistema pari a 0 ed 1 (0 e 10 mM rispettivamente) le concentrazioni richieste attraverso i quattro spillamenti sono state 0.01, 0.1 e 0.5 ed un valore prossimo ad 1 dipendente dalla quantità di farmaco presente nella porzione superiore del condotto principale e non ancora diffusa al termine del processo di miscelamento. Il livello 0 è stato direttamente ottenuto dall'ingresso contenente il *medium*.

Le analisi sono state condotte mediante l'utilizzo di due programmi in *Matlab* (*The Mathworks Inc.*) implementando le equazioni proposte negli articoli di Gorman et al. (2008) e di Wu et al. (2005). Il primo ha consentito di valutare il profilo di concentrazione del farmaco nel microcanale di riferimento una volta impostate le condizioni al contorno, mentre il secondo ha permesso di ricavare le distanze di spillamento ottimali tali da garantire un valor medio di concentrazione desiderato da poter indirizzare verso i pozzetti per colture cellulari (figura D).

I modelli analitici hanno permesso una valutazione preliminare del processo di miscelamento di *medium* per colture cellulari e stronzio ranelato. Dal momento che non è stato possibile rispettare le specifiche di progetto si è stabilito di utilizzare un differente approccio per la progettazione del dispositivo.



$$c^*(x^*, y^*) = \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\sin(n\alpha\pi)}{n} \cos(n\pi y^*) \exp\left(-\frac{2n^2\pi^2}{Pe + \sqrt{Pe^2 + 4n^2\pi^2}} x^*\right) + \alpha$$

$n = 1, 2, 3, \dots$

Figura D – Modello analitico utilizzato per il calcolo dei profili di concentrazione del farmaco. [Wu et al., 2005]

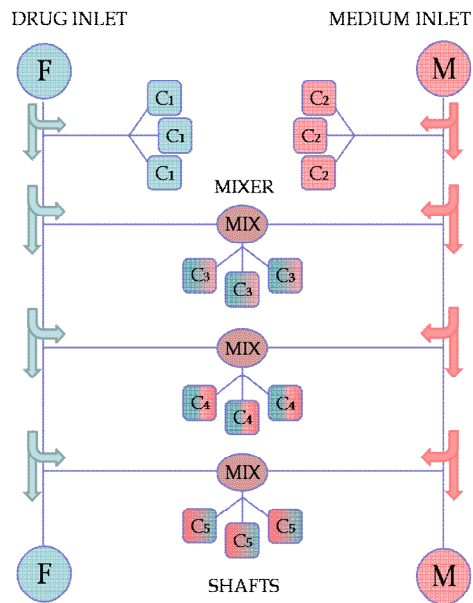


Figura E – Rappresentazione schematica del dispositivo microfluidico.

In figura E è mostrato uno schema della soluzione adottata. Le concentrazioni di farmaco desiderate (0, 0.01, 0.1, 0.5 ed 1) sono ottenute attraverso la miscelazione di portate proporzionali di farmaco e mezzo di coltura.

Il dispositivo finale prevede due differenti reti per l'erogazione del farmaco e del mezzo di coltura mediante una pompa a siringa. I condotti principali sono disposti sulla circonferenza del dispositivo, mentre canali di spillamento opportunamente dimensionati consentono l'estrazione di portate proporzionali di fluido che si misceleranno in corrispondenza dei punti di intersezione. Per assicurare la miscelazione completa dei due fluidi è stato posto un *micromixer* a valle di ogni punto di intersezione. Le concentrazioni 0 ed 1 sono estratte immediatamente a valle degli ingressi.

La dislocazione dei microcanali risponde ad esigenze di funzionalità e ad un preciso criterio logico e tiene conto dei limitati spazi a disposizione, data l'elevata compattezza del dispositivo.

Il principio generale seguito in fase di progettazione è stato quello di ottimizzare le resistenze fluidodinamiche delle differenti porzioni di circuito con lo scopo di garantire uguali perdite di carico nei rami in parallelo e portate ottimali. Dal momento che le lunghezze dei microcanali risultano quasi totalmente prestabilite a causa delle dimensioni del sistema, il rispetto del principio generale è stato assicurato grazie ad una ottimizzazione delle larghezze dei condotti e all'inserimento di perdite di carico localizzate in grado di equilibrare il sistema di resistenze presente. Tutti i microcanali sono caratterizzati da una profondità di 500 μm .

La progettazione del dispositivo è stata condotta inizialmente mediante un approccio analitico attraverso la realizzazione dell'equivalente elettrico del circuito (figura F); il sistema è stato

suddiviso in una serie di componenti analizzabili separatamente ed è stata adottata una trattazione a parametri concentrati per una prima valutazione delle perdite di carico distribuite in ogni singolo tratto. Simulazioni computazionali mediante il *software* commerciale *Fluent* (*Ansys Inc., Canonsburg, PA, USA*) sono state effettuate con lo scopo di valutare la bontà dei calcoli analitici e migliorare progressivamente la soluzione. Sia per i calcoli analitici che per le simulazioni computazionali il dominio è stato suddiviso in una serie di sottodomini e sono state imposte adeguate condizioni al contorno di pressione e portata.

Il sistema di distribuzione alle cellule del fluido ha previsto la realizzazione di un microcanale circolare disposto sulla circonferenza del pozzetto di coltura in prossimità della sommità; il condotto, posto 7 mm al di sopra del fondo del pozzetto, è caratterizzato da una profondità di 500 μm e da una ampiezza di 200 μm ; 36 fori dotati di ampiezza 5 μm , altezza 500 μm e profondità 40 μm sono disposti con passo uniforme lungo il canale e assicurano una omogenea distribuzione a pioggia del mezzo di coltura alla popolazione cellulare. Simulazioni computazionali del sistema di distribuzione ai pozzetti di coltura sono state effettuate imponendo come condizioni al contorno una portata in ingresso di $5.5555 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$ ed una pressione nulla in corrispondenza dei 36 fori di uscita.

Il dispositivo verrà realizzato con la tecnica della *soft lithography* in polidimetilsilossano (PDMS), polimero che grazie alle sue proprietà di superficie, alla permeabilità ai gas, alla propria inerzia e stabilità e all'elevata biocompatibilità si rivela particolarmente adatto per lavorare con le cellule.

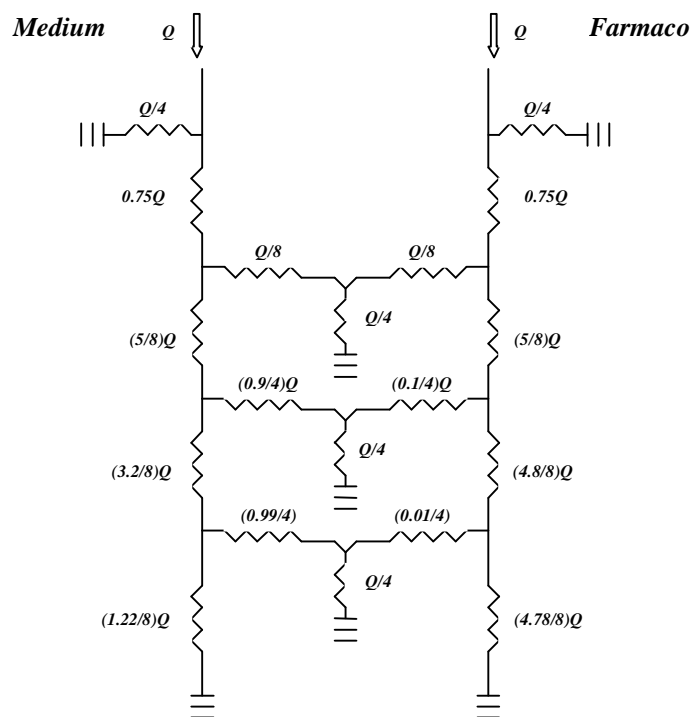


Figura F – Equivalente elettrico del circuito.

Numerosi prototipi di singoli componenti del circuito sono stati realizzati con lo scopo di ottimizzare il processo di microfabbricazione; test sperimentali effettuati mediante sistema *Micro Particle Image Velocimetry* (μ PIV, TSI Inc.) hanno consentito di validare i risultati delle simulazioni computazionali eseguite al calcolatore. Gli esperimenti sono stati condotti mediante Rodamina WT liquida (*Organic Dyestuffs Corporation*), molecola che eccitata da una sorgente laser ad una lunghezza d'onda di 532 nm genera fluorescenza.

Il processo di miscelazione è stato valutato mediante prove eseguite su *micromixer* caratterizzati da un profilo dentato con ampiezza del condotto di ingresso 200 μ m, profondità pari a 50 μ m o 210 μ m e lunghezza 3 mm. I condotti principali dei *micromixer* presentano due ingressi attraverso i quali sono inseriti acqua deionizzata e rodamina WT erogate da una pompa a siringa.

Le prove sono state condotte a due differenti portate pari a 0.3 μ l/min e 3 μ l/min. I risultati sono stati ottenuti ed analizzati in termini di deviazione standard sulla concentrazione di rodamina in corrispondenza dell'uscita del sistema.

Infine è stata eseguita una prova sperimentale volta all'individuazione del coefficiente di diffusione dello stronzio-cloruro, principio attivo dello stronzio ranelato, mediante un saggio colorimetrico.

Risultati e discussione

Il dispositivo progettato comprende una rete di microcanali di distribuzione di mezzo di coltura e farmaco, tre *micromixer* per il sistema di miscelazione e 45 pozzetti di coltura ciascuno dotato di 36 fori con ampiezza 5 μm , altezza 500 μm e profondità 40 μm per consentire un'omogenea erogazione del fluido alle cellule. È stata stabilita una portata Q pari a $2 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$ così da garantire un rapido riempimento dei pozzetti: il tempo stimato per il raggiungimento del volume di 200 μl risulta infatti pari a 36 secondi. In figura G viene proposto uno schema della piattaforma microfluidica in cui è possibile osservare la distribuzione dei diversi sottosistemi.

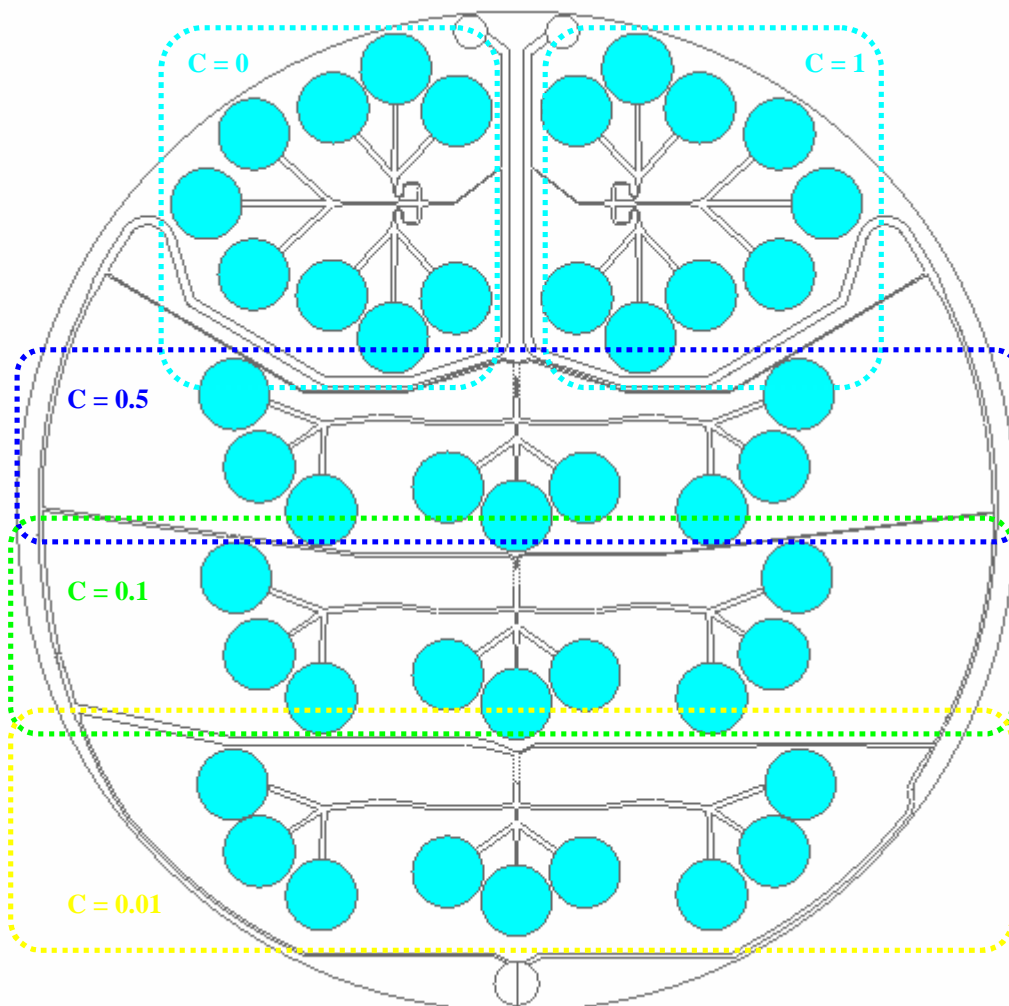


Figura G – Disegno completo del dispositivo microfluidico realizzato su una piattaforma circolare con diametro 9 cm.

I risultati delle simulazioni numeriche evidenziano come le perdite di carico siano in genere leggermente differenti rispetto a quanto previsto dal modello analitico, in particolare nei punti di restringimento/allargamento dei microcanali o nelle zone in cui sono presenti delle biforcazioni; per questo motivo sono state necessarie piccole correzioni nel dimensionamento dei condotti rispetto a quanto inizialmente calcolato.

In tabella A e B sono riportati i dati relativi alle dimensioni dei microcanali della rete di distribuzione del farmaco: l'espressione "microcanale di spillamento" indica i condotti che a partire dal circuito principale si portano verso i pozzetti di coltura.

	<i>Lunghezza [mm]</i>	<i>Larghezza [μm]</i>
<i>Blocco spillamento 0.01</i>		
Microcanale di spillamento	37.2	200
Microcanale di distribuzione	45.8	430
<i>Blocco spillamento 0.1</i>		
Microcanale di spillamento	42.9	100
Microcanale di distribuzione	21.9	250
<i>Blocco spillamento 0.5</i>		
Microcanale di spillamento	40.1	150
Microcanale di distribuzione	22.4	400
<i>Blocco spillamento 1</i>		
Microcanale di spillamento	8.3	100
Microcanale di distribuzione	62.1	800

Tabella A - Calcoli analitici relativi alla progettazione della rete di distribuzione del farmaco.

	<i>Lunghezza [mm]</i>	<i>Larghezza [μm]</i>
<i>Blocco spillamento 0.01</i>		
Microcanale di spillamento	37	200
Microcanale di distribuzione	45	437
<i>Blocco spillamento 0.1</i>		
Microcanale di spillamento	42	100
Microcanale di distribuzione	21	277
<i>Blocco spillamento 0.5</i>		
Microcanale di spillamento	33.5 + 6.5	150/200
Microcanale di distribuzione	14 + 7	400/350
<i>Blocco spillamento 1</i>		
Microcanale di spillamento	7	100
Microcanale di distribuzione	62	800

Tabella B - Dimensioni caratteristiche dei microcanali nella rete di distribuzione del farmaco a seguito delle simulazioni numeriche.

In tabella C vengono riportate le dimensioni caratteristiche dei *micromixer*. Le simulazioni computazionali effettuate sui *micromixer* hanno evidenziato un ottimale livello di miscelazione con una distribuzione omogenea di farmaco all'interno del mezzo di coltura in corrispondenza del punto di uscita. A titolo di esempio in figura H viene mostrata una mappa di concentrazione relativa al processo di miscelazione all'interno del *mixer* utilizzato per l'ottenimento del livello di concentrazione 0.1.

I risultati dei test sperimentali effettuati sono stati confrontati con quelli relativi alle simulazioni computazionali 3D condotte mediante *Fluent* sulla medesima geometria; i dati estratti dalle simulazioni numeriche sembrano concordare con un ridotto margine di errore con i valori sperimentali, come riassunto in tabella D, in cui viene riportata la deviazione standard sulla concentrazione di rodamina in uscita al sistema.

	<i>Larghezza ingresso mezzo</i> [μm]	<i>Larghezza ingresso farmaco</i> [μm]	<i>Portata mezzo</i>	<i>Portata farmaco</i>
<i>Micromixer 0.5</i>	200	200	Q/8	Q/8
<i>Micromixer 0.1</i>	300	100	(0.9/4)Q	(0.1/4)Q
<i>Micromixer 0.01</i>	800	200	(0.99/4)Q	(0.01/4)Q

Tabella C – Dimensioni e portate relative ai tre sistemi di miscelazione.

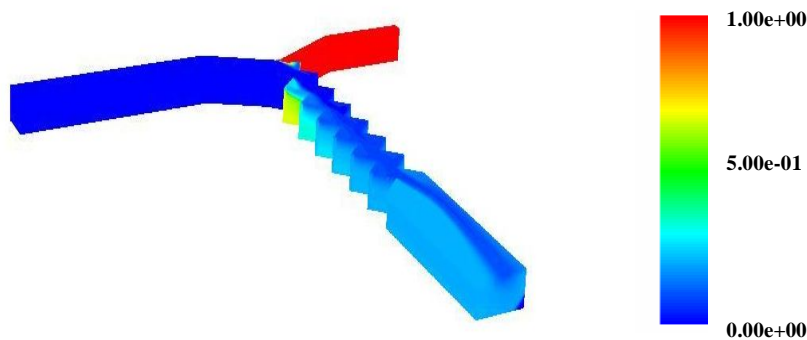


Figura H – Mappa di concentrazione relativa al processo di miscelazione all'interno del *mixer* utilizzato per l'ottenimento del livello di concentrazione 0.1.

	<i>Sperimentale</i>	<i>CFD</i>
$h=50\mu\text{m}, Q=3 \mu\text{l}/\text{min}$	0.3958	0.4285
$h=210\mu\text{m}, Q=3 \mu\text{l}/\text{min}$	0.1759	0.2403
$h=210\mu\text{m}, Q=0.3 \mu\text{l}/\text{min}$	0.0106	0.0534

Tabella D – Deviazione standard sulla concentrazione di rodamina in uscita ai *mixer*: confronto sperimentale/computazionale.

Infine prove sperimentali eseguite mediante un saggio colorimetrico per la detezone dei cloruri hanno permesso di identificare il coefficiente di diffusione dello stronzio cloruro, quantificandolo in circa $3 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Le simulazioni numeriche sono state eseguite considerando un valore di $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ con lo scopo di garantire un certo margine di sicurezza al processo di miscelamento nei *micromixer*.

Il sistema di erogazione alle cellule del fluido, analizzato al calcolatore, ha evidenziato una portata volumetrica media attraverso ognuno dei 36 fori di $1.5431 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$ con una deviazione standard di $0.0225 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$ ad indicare una omogenea distribuzione all'interno della camera di coltura.

Conclusioni

La progettazione di un dispositivo in grado di generare diverse concentrazioni di farmaco, inizialmente impostata su un meccanismo di spillamenti successivi, è stata indirizzata verso un sistema basato sulla miscelazione di portate proporzionali di mezzo di coltura e farmaco in grado di generare le concentrazioni di stronzio ranelato stabilite. I risultati raccolti dalle numerose simulazioni effettuate hanno mostrato come un progetto basato su spillamenti successivi sia incompatibile con le specifiche prestabilite: portate ridotte implicano lunghi tempi di riempimento tali per cui la sopravvivenza cellulare non è garantita; viceversa, l'impostazione di portate adeguate rispondenti alle specifiche non consente la generazione di un gradiente di concentrazione ottimale e richiede microcanali caratterizzati da lunghezze particolarmente elevate. Un dispositivo basato unicamente su processi diffusivi e su microcanali di spillamento risulta fortemente influenzato dal valore del coefficiente di diffusione, da difetti di fabbricazione e da particolari condizioni sperimentali; pertanto è stata intrapresa un'altra via progettuale basata sul miscelamento di portate proporzionali di farmaco e mezzo di coltura. Il dispositivo progettato è il risultato di calcoli analitici effettuati attraverso una trattazione a parametri concentrati e di simulazioni numeriche che hanno consentito di ottimizzare le dimensioni caratteristiche dei microcanali. Considerando che densità, viscosità e coefficiente di diffusione di diversi liquidi risultano confrontabili, il sistema si dimostra potenzialmente utile per lo *screening* di numerosi farmaci, adattando le ampiezze dei microcanali in base ai valori di concentrazione richiesti.

Summary

Introduction

Microfluidics is the science and technology of systems that process and manipulate small amounts of fluids (10^{-9} to 10^{-18} litres) using channels with dimensions of tens to hundreds of micrometres. The first applications of microfluidic technologies have been in microanalysis thanks to the possibility of using small quantities of sample and reagents, carrying out separations and detections of molecules with high resolution and sensitivity, controlling in space and time the concentrations of chemical species and obtaining significant results in short times with low costs [Whitesides, 2006]. Constant research has taken to the development of equipments more and more compact and versatile and has allowed to find new potential applications in the field of biochemistry and molecular and cellular biology. A microfluidic device (figure A) is generally composed of a series of specific components: a method of introducing reagents and samples, methods for moving and mixing the fluids into the microchannels on the chip, detectors for chemical analysis and components for purification of products for systems used in synthesis.

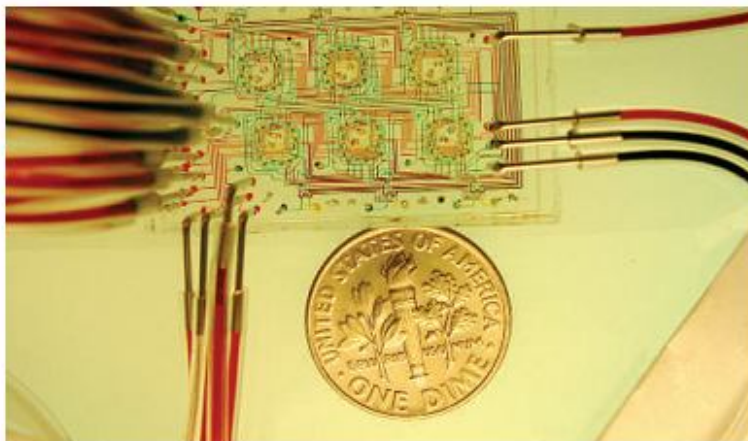


Figure A – Microfluidic device used to study microbial populations. [Whitesides, 2006]

The development of soft lithography and the use of polydimethylsiloxane (PDMS) have made possible to realize several prototypes and to test new planning solutions and components; PDMS, thanks to optical transparency, gas permeability and high biocompatibility represents an useful material for the creation of microchambers in which is possible to grow cells, to analyze their behaviour and to study their cytoskeleton.

An interesting research field is represented by the study of bone metabolic diseases and particularly of osteoporosis, defined by Floman as “an age-related disease characterized by a progressive decrease in bone mass and by the modification of the entire bone architecture” (figure B) [Bono et al., 2003].

Numerous therapies for the treatment of osteoporosis are based on the attempt to limit osteoclasts activity or to stimulate osteoblasts activity and the related processes of cellular proliferation and differentiation. Several regulatory factors can promote the capability to deposit new bone matrix; nevertheless the benefit that such molecules give on osteoblasts activity is balanced by potential toxic effects that they can take on other tissues and by several collateral effects.

Moreover the benefits given by several drugs are obtainable only with adequate concentrations in the bone microenvironment; for this reason future developments of therapies based on growth factors or other molecules will demand an effective release mechanism so that it will be possible to reach the desired concentration in the site of interest.

A group of molecules able to promote osteoblasts activity and at the same time limit bone resorption by osteoclasts is represented by the so-called DABA (dual action bone agents) among which there is strontium ranelate, object of study of several recent researches.

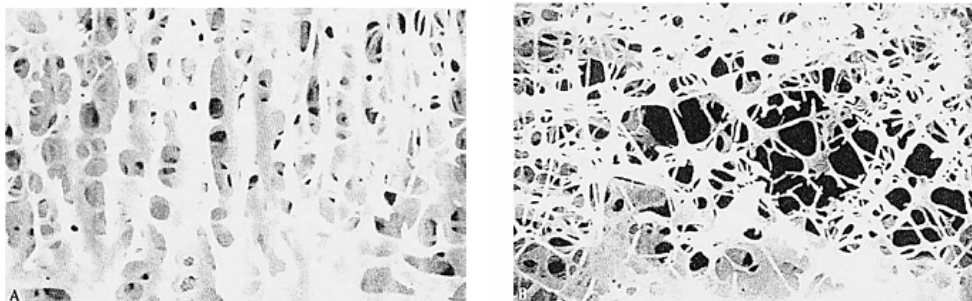


Figure B – Comparison between physiological (left) and pathological (right) bone; it is possible to observe the great difference in terms of interconnections and bone density. [Bono et al., 2003]

The aim of the work

The goal of this work is the design of an innovative microfluidic system that allows to evaluate the efficacy of an anti-osteoporotic drug on cellular populations. Particularly the aim is the possibility to connect the concentration of the drug with the effects on the cellular metabolism. The device is based on the exposure of cellular cultures to five different concentration levels of the drug, strontium ranelate, through a microfluidic network for the distribution of the fluids to the cells.

The project was developed in cooperation with the laboratory of cell culture and molecular biology of the Istituto Ortopedico Galeazzi located in Milan and with the Center for Materials and Microsystems of the Fondazione Bruno Kessler (FBK) located in Trento thanks to the financing of the Fondazione Cassa di Risparmio di Trento e Rovereto (Caritro).

Materials and methods

The general requirements of the device were established with the biologists of the Istituto Ortopedico Galeazzi; in particular five concentration levels of strontium ranelate were established to infuse the culture wells containing the populations of osteoblasts. For each concentration value nine shafts were required in order to perform cellular viability tests in six copies and proliferation tests in three copies. An important requirement was to guarantee an optimal filling time of the microchambers: using culture wells with a diameter of 6.4 mm and with a volume of 200 μ l the biologists highlighted the need to create a thin layer of medium in a space of time of few minutes.

Dimensions and possible geometries of the microfluidic platform were established by the research group in Trento considering the technical limits of the microfabrication process: the two proposed shapes were a circular structure with a diameter of 9 cm and a square structure characterized by a side of 7.18 cm.

In the beginning the design of the device was based on a concentration gradient generator with subsequent withdrawals: two inlets containing medium for cell cultures and strontium ranelate converge into a central channel from which predetermined flows at desired concentration levels are extracted (figure C); the entire system relies on pure diffusion processes.

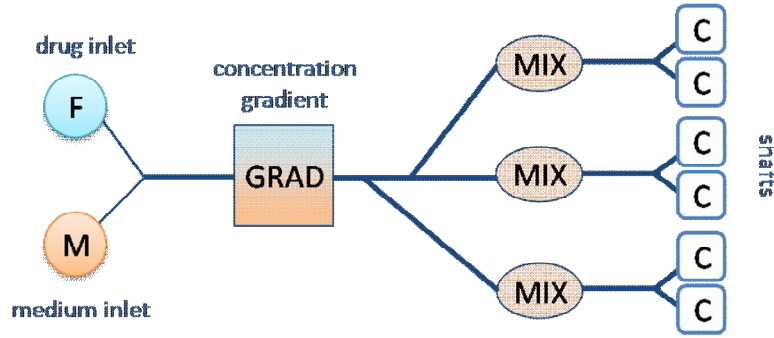
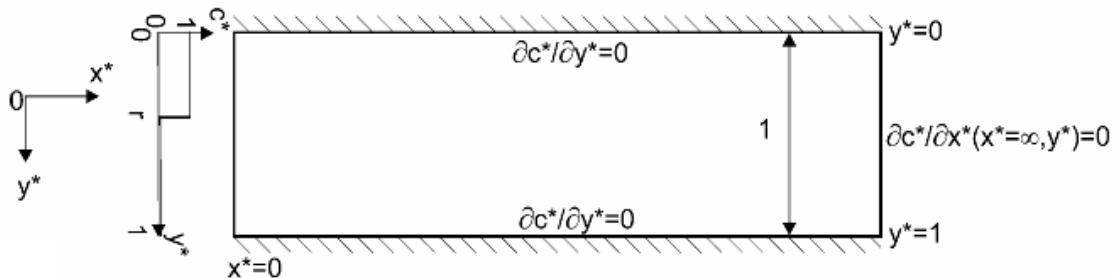


Figure C – Scheme of the microfluidic device based on successive extractions.

Taking the concentration levels of drug in the two inlets of the system equal to 0 and 1 (0 and 10 mM respectively) the requested concentration levels through the four extraction points were 0.01, 0.1 and 0.5 and a value near to 1 which is strictly related to the amount of drug in the upper zone of the main channel and not yet diffused after the previous flow withdrawals. The concentration level 0 was directly obtained from the inlet containing the medium.

The analyses were carried out using two scripts written in Matlab (The Mathworks Inc.) code implementing the equations found in the scientific articles written by Gorman et al. (2008) and by Wu et al. (2005). The first one allowed to evaluate the drug concentration profile in the main microchannel after the definition of the boundary conditions while the second one permitted to obtain the optimal positions of the withdrawal sections to guarantee a desired concentration mean value to be infused to the cell culture wells (figure D).

The analytical models allowed a preliminary evaluation of the mixing process of medium for cell cultures and strontium ranelate. Since with this method it was not possible to comply with the established general requirements it was decided to use a different approach for the design of the device.



$$c^*(x^*, y^*) = \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\sin(n\alpha\pi)}{n} \cos(n\pi y^*) \exp\left(-\frac{2n^2\pi^2}{Pe + \sqrt{Pe^2 + 4n^2\pi^2}} x^*\right) + \alpha$$

$$n = 1, 2, 3, \dots$$

Figure D – Analytical model for the evaluation of the concentration profiles of the drug. [Wu et al., 2005]

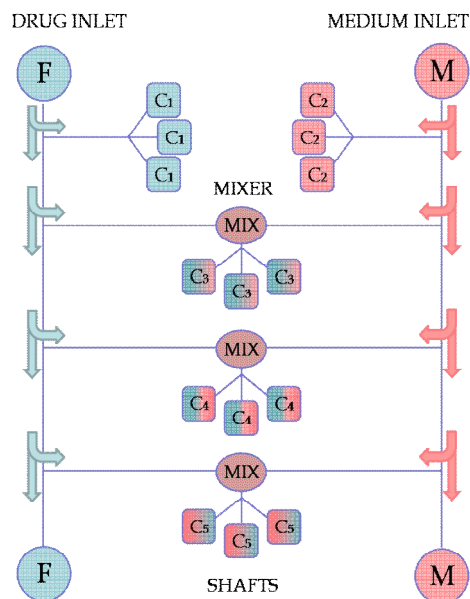


Figure E – Sketch of the microfluidic device.

In figure E the sketch of the ultimate solution is shown. The desired concentrations of drug (0, 0.01, 0.1, 0.5 and 1) are obtained through the mixing of proportional flows of medium and drug.

The final device is based on two different networks for the distribution of drug and medium using a syringe pump. The main channels are located on the circumference of the device while the extraction channels adequately designed make possible the drawing of proportional flows of fluid which will mix at the intersection points.

To insure the complete mixing of the two fluids a micromixer was put downstream from every intersection point. Concentration levels 0 and 1 are extracted immediately downstream from the inlets.

The distribution of the microchannels responds to functionality and to a precise logic criterion and considers the limited available spaces because of the compactness of the device. The general principle considered during the planning was to optimize the fluidic resistances of the different parts of the circuit so as to guarantee equal pressure drops in the parallel branches and optimal flows. Because of the lengths of the microchannels are almost completely determined due to the dimensions of the system, the respect of the general principle was insured by an optimization of the widths of the ducts and by the use of localized pressure drops able to balance the system of resistances. All the microchannels are characterized by a depth of 500 μm .

In the beginning the planning of the microfluidic device was made using an analytical approach designing the electric equivalent of the circuit (figure F); the system was divided in a series of components individually analyzable and a lumped parameters approach was adopted to get a first

evaluation of the pressure drops in every single area. Computational simulations with the commercial software Fluent (Ansys Inc., Canonsburg, PA, USA) were carried out to evaluate the reliability of the analytical results and to increasingly improve the solution. Both for analytical calculations and computational simulations the domain was splitted in a series of subdomains and adequate boundary conditions of pressure and flow were imposed.

The distribution system of the flow to the cells requested the fabrication of a circular microchannel placed on the circumference of the culture well near to the top; the duct, placed 7 mm over the bottom of the well, is characterized by a depth of 500 μm and by a width of 200 μm ; 36 holes characterized by a width of 5 μm , a height of 500 μm and a depth of 40 μm are uniformly placed along the channel and insure an homogeneous rainfall distribution of the culture medium to the cellular population. Computational simulations of the flow-distributors were carried out imposing an inlet flow of $5.5555 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$ and a pressure equal to zero on the 36 exits as boundary conditions.

The device will be realized with a soft lithography technique using polydimethylsiloxane (PDMS), a polymer that thanks to its surface properties, gas permeability, inertia, stability and high biocompatibility turns out to be particularly suitable to work with cells.

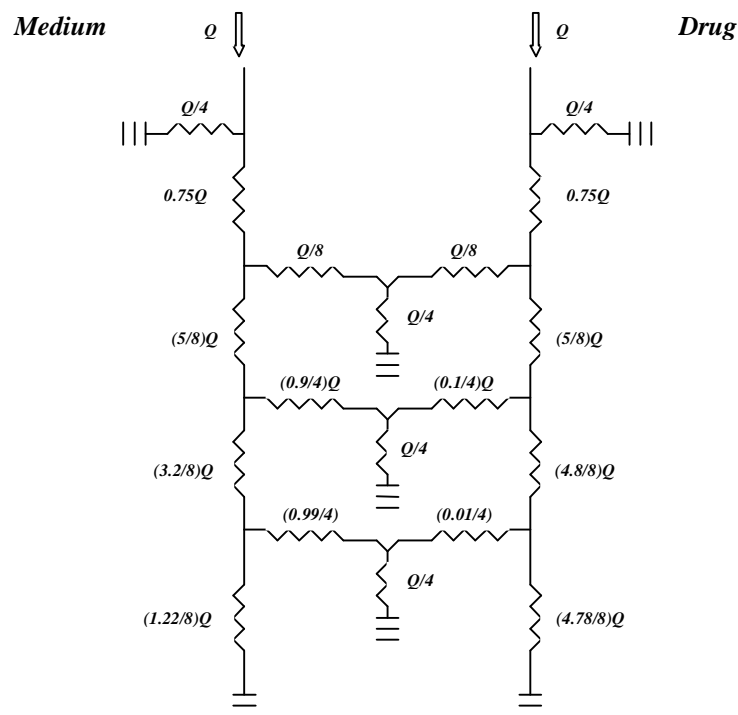


Figure F – Electric equivalent of the circuit.

Several prototypes of single components of the circuit were fabricated with the aim to optimize the microfabrication process; experimental tests carried out using a Micro Particle Image Velocimetry system (μ PIV, TSI Inc.) confirmed the results of the numerical simulations. The experiments were performed using liquid WT Rhodamine (Organic Dyestuffs Corporation), molecule that excited by a laser source with a wave length of 532 nm produces fluorescence. Micromixers with a wrinkled wall channel 200 μ m wide, 50 or 210 μ m deep and 3 mm long were tested. The main ducts of the micromixers have two inlets through which are introduced deionized water and rhodamine WT supplied by a syringe pump. The tests were conducted with two different flow rates of 0.3 μ l/min and 3 μ l/min. The results were obtained and analyzed in terms of standard deviation of the concentration of rhodamine at the microchannel outlet.

Finally an experimental test with a colorimetric assay was performed to evaluate the diffusion coefficient of strontium chloride, which is the active principle of strontium ranelate.

Results and discussion

The designed device includes a microchannels network for the delivery of medium and drug, three micromixers for the mixing system and 45 cell culture wells, each one characterized by 36 holes $5\ \mu\text{m}$ wide, $500\ \mu\text{m}$ high and $40\ \mu\text{m}$ deep, to allow an homogeneous distribution of the fluid to the cells. A flow rate $Q = 2 \times 10^{-7}\ \text{m}^3/\text{s}$ was set to grant a quick filling of each well: the estimated time to reach the volume of $200\ \mu\text{l}$ is about 36 seconds.

Figure G shows a scheme of the microfluidic platform in which the arrangement of the whole device is visible. The results of the numerical simulations highlight that the pressure drops are generally slightly different in comparison with the ones predicted by the analytical model, especially in the points of narrowing/enlargement of the microchannels or in the areas where bifurcations occur; for this reason little corrections in the dimensions of the ducts in comparison with the initial calculations were necessary.

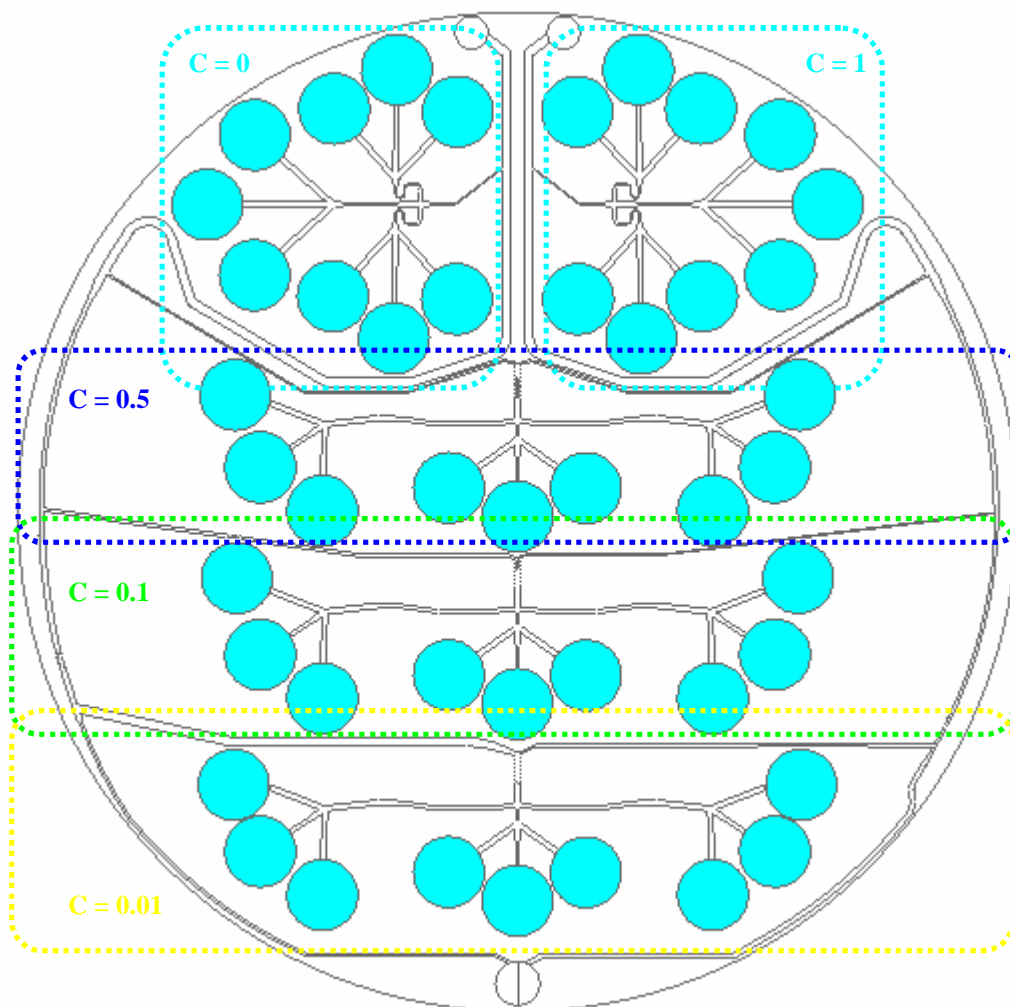


Figure G – Complete design of the microfluidic device realized on a circular platform with a diameter of 9 cm.

In table A and B are reported the dimensions of the microchannels of the distribution network of the drug: “extraction microchannel” is referred to the ducts which depart from the main circuit to reach the cell culture wells.

In table C the characteristic dimensions of the micromixers are reported. Computational simulations on the micromixers highlighted a complete mixing at the outlets.

	<i>Length [mm]</i>	<i>Width [μm]</i>
<i>Concentration level 0.01</i>		
Extraction microchannel	37.2	200
Distribution microchannel	45.8	430
<i>Concentration level 0.1</i>		
Extraction microchannel	42.9	100
Distribution microchannel	21.9	250
<i>Concentration level 0.5</i>		
Extraction microchannel	40.1	150
Distribution microchannel	22.4	400
<i>Concentration level 1</i>		
Extraction microchannel	8.3	100
Distribution microchannel	62.1	800

Table A – Analytical calculations for the design of the delivery network of the drug.

	<i>Length [mm]</i>	<i>Width [μm]</i>
<i>Concentration level 0.01</i>		
Extraction microchannel	37	200
Distribution microchannel	45	437
<i>Concentration level 0.1</i>		
Extraction microchannel	42	100
Distribution microchannel	21	277
<i>Concentration level 0.5</i>		
Extraction microchannel	33.5 + 6.5	150/200
Distribution microchannel	14 + 7	400/350
<i>Concentration level 1</i>		
Extraction microchannel	7	100
Distribution microchannel	62	800

Table B – Characteristic dimensions of the microchannels in the distribution network of the drug after numerical simulations.

As an example in figure H a concentration map related to the mixing process into the mixer used to get the concentration level 0.1 is showed.

The results of the experimental tests were subsequently compared with those of the 3D computational simulations performed with Fluent on the same geometry; a good agreement was obtained, as summarized in table D, where the standard deviation of the concentration of rhodamine at the outlet is presented.

	<i>Medium inlet width</i> [μm]	<i>Drug inlet width</i> [μm]	<i>Medium flow rate</i>	<i>Drug flow rate</i>
<i>Micromixer 0.5</i>	200	200	Q/8	Q/8
<i>Micromixer 0.1</i>	300	100	(0.9/4)Q	(0.1/4)Q
<i>Micromixer 0.01</i>	800	200	(0.99/4)Q	(0.01/4)Q

Table C – Characteristic dimensions and flow rates of the three mixing systems.

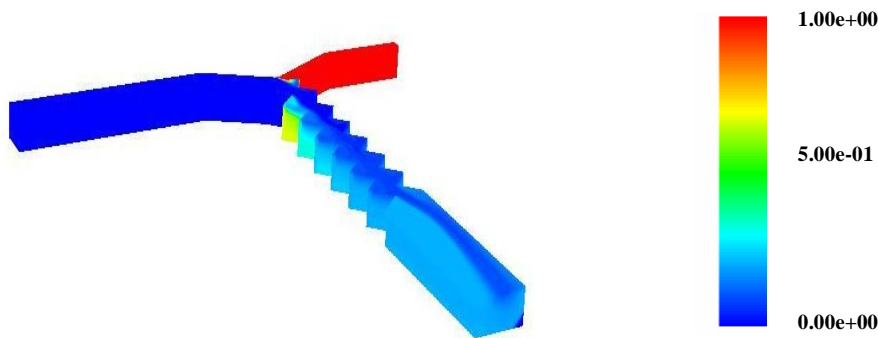


Figure H – Concentration map for the mixer used to obtain the concentration level 0.1.

	<i>Experimental data</i>	<i>CFD data</i>
<i>h=50μm, Q=3 $\mu\text{l}/\text{min}$</i>	0.3958	0.4285
<i>h=210μm, Q=3 $\mu\text{l}/\text{min}$</i>	0.1759	0.2403
<i>h=210μm, Q=0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$</i>	0.0106	0.0534

Table D – Standard deviation about the concentration of rhodamine at the exit point of the mixers: comparison between experimental and computational data.

Finally experimental tests executed with a colorimetric assay for the detection of chlorides allowed to identify the diffusion coefficient of strontium chloride, approximately equal to $3 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

A value of $1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ was set for the numerical simulations in order to guarantee a safety limit to the mixing process into the micromixers.

The flow-distributors simulations highlighted a mean flow rate through everyone of the 36 holes of $1.5431 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$ with a standard deviation of $0.0225 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$ indicating an homogeneous distribution of the flow to the culture shaft.

Conclusions

The design of a device able to generate several concentrations of drug, initially set on a mechanism of successive extraction points, was directed to a system based on the mixing of proportional flows of medium for cell culture and drug able to generate the established concentrations of strontium ranelate. The recorded data from the several simulations showed that a project based on subsequent withdrawals is incompatible with the fixed requirements: small flow rates imply long filling times, therefore the cellular survival is not assured; on the other side, adequate flows with respect to the requirements don't make possible the development of an optimal concentration gradient and need very long microchannels. A device exclusively based on diffusive processes and extraction microchannels is strongly influenced by the value of the diffusion coefficient, by fabrication defects and by particular experimental conditions; for these reasons another approach based on the mixing of proportional flows of medium for cell cultures and drug was followed. The designed device is the result of analytical calculations, which exploit a lumped parameters approach, and of numerical simulations that allowed the optimization of the characteristic dimensions of the microchannels. Considering that density, viscosity and diffusion coefficient of numerous liquids are comparable, the system proves potentially useful for the screening of several drugs, by adapting the widths of the microchannels with respect to the requested concentration values.

Obiettivo della Tesi

Il presente lavoro nasce con l'obiettivo di sviluppare un innovativo sistema microfluidico in grado di esporre una popolazione cellulare a diversi livelli di concentrazione di farmaco; l'applicazione considerata riguarda l'ottimizzazione terapeutica per il trattamento dell'osteoporosi in quanto consentirà di correlare differenti concentrazioni di stronzio ranelato, farmaco utilizzato per il trattamento di tale patologia, con gli effetti riscontrati sul metabolismo cellulare.

La progettazione si avvale di modelli analitici e computazionali mentre l'efficacia dei prototipi realizzati viene testata sperimentalmente avvalendosi di tecniche di microscopia a fluorescenza e della tecnologia *Micro Particle Image Velocimetry* con lo scopo di valutare il grado di miscelazione ed i livelli di concentrazione delle specie chimiche considerate. La realizzazione tecnica dei componenti viene effettuata mediante *soft lithography* attraverso l'utilizzo del polidimetilsilossano (PDMS), materiale caratterizzato da elevata biocompatibilità e stabilità. Il progetto è realizzato in collaborazione con il laboratorio di colture cellulari e biologia molecolare dell'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano e con il *Center for Materials and Microsystems* della Fondazione Bruno Kessler (FBK) di Trento grazie ai finanziamenti della Fondazione Cassa di Risparmio di Trento e Rovereto (Caritro).

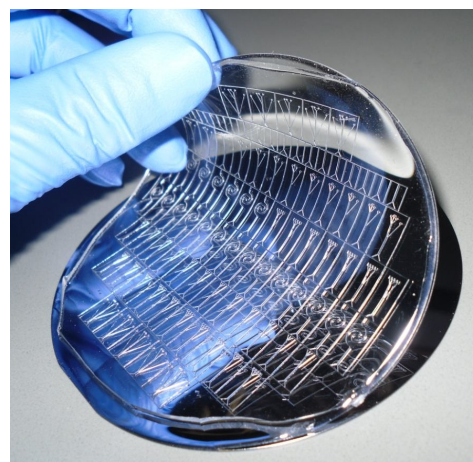
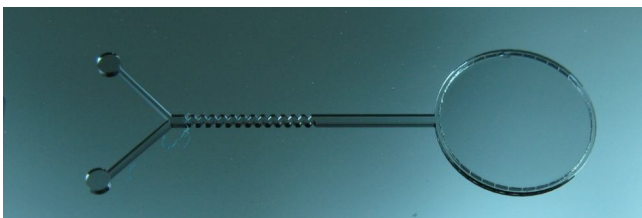


Figura I – Componenti del dispositivo microfluidico realizzati in PDMS.

Capitolo 1

Stato dell'arte

Nel presente capitolo verranno trattati il tessuto osseo, la patologia osteoporotica e le relative terapie farmacologiche; inoltre verranno presentati alcuni dispositivi microfluidici utilizzati per la generazione di gradienti di concentrazione corredati da materiali e tecnologie di microfabbricazione.

Introduzione

Nel presente capitolo vengono analizzate struttura e composizione del tessuto osseo: dopo una breve discussione sulle diverse tipologie di osso presenti nel corpo umano vengono analizzate nel dettaglio le cellule costituenti il tessuto responsabili dei continui fenomeni di rimodellamento e le caratteristiche principali del processo di ossificazione. In seguito vengono presentati i principali aspetti del metabolismo dell'osso ed una delle più diffuse patologie a carico di questo tessuto, l'osteoporosi, con riferimento a diverse terapie farmacologiche in uso per il suo trattamento. Successivamente vengono illustrati alcuni dispositivi microfluidici utilizzati per la generazione di gradienti di concentrazione nonché le tecnologie ed i materiali necessari per la loro fabbricazione.

1.1 Caratteristiche generali del tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo denso, mineralizzato, provvisto di dotti sanguigni, linfatici e nervosi in grado di garantire l'approvvigionamento di nutrienti ed ossigeno, lo smaltimento dei cataboliti e l'informatica delle cellule presenti al suo interno. Il tessuto osseo costituisce le ossa, che concorrono a costituire lo scheletro dei vertebrati, svolgendo una funzione di sostegno del corpo e di protezione degli organi vitali (come nel caso della cassa toracica) e permettendo, insieme ai muscoli, il movimento; il tessuto osseo costituisce inoltre un'indubbia riserva di calcio e gruppi fosfato da cui l'organismo attinge in particolari periodi di necessità per mezzo di una coordinazione ormonale. Nelle estremità delle ossa lunghe (le epifisi) è ospitato il midollo osseo rosso, tessuto emopoietico costituito da cellule staminali: per evitare che tale tessuto subisca variazioni di temperatura tali da influenzare il ciclo replicativo cellulare esso viene alloggiato nella porzione più interna delle epifisi dell'osso.

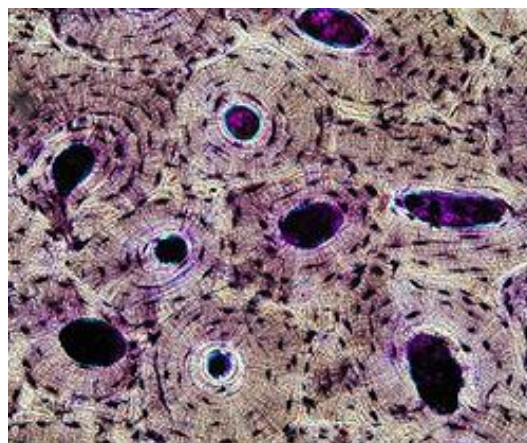


Figura 1.1 – Sezione di tessuto osseo compatto, colorata chimicamente, che mostra l'organizzazione lamellare concentrica degli osteoni. [Redaelli e Montevicchi, Biomeccanica. Analisi multiscale di tessuti biologici]

1.1.1 Struttura e composizione

Il tessuto osseo è costituito da una componente cellulare (osteoblasti, osteociti, osteoclasti) e da matrice extracellulare (ECM); quest'ultima è composta per il 30% da un'impalcatura di fibrille proteiche di collagene di tipo I (amminoacidi glicina, prolina, idrossiprolina, lisina, idrossilisina) che conferiscono elasticità e flessibilità e da una abbondante componente minerale (70%) costituita prevalentemente da cristalli aghiformi di idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con lunghezza compresa tra 20 e 40 nm (piccole percentuali di carbonato apatite e fluoro apatite), in grado di apportare durezza e rigidità. La componente non minerale dell'osso è costituita per il 90% in massa da collagene e per il restante 10% da proteoglicani, acido ialuronico, glicoproteine e acqua; la componente proteica è differenziata in osteonectina in grado di ancorare le fibre di collagene ai minerali dell'osso, fosfatasi alcalina (necessaria per la sintesi di ECM), fibronectina, osteopontina (fondamentali per i processi di adesione cellulare) ed osteocalcina (generazione di legami con il calcio).

Le ossa presenti nel corpo umano possono essere classificate in quattro gruppi distinti:

- Ossa lunghe (arti superiori ed inferiori), costituite da una diafisi centrale, composta da tessuto osseo compatto rivestita esternamente dal periostio (membrana di connettivo denso ed elastico) e contenente una cavità con midollo osseo giallo, e da due epifisi terminali composte da tessuto spongioso rivestito da due sottili strati di osso compatto e cartilagine articolare. La parete interna della cavità diafisaria è rivestita da uno strato di cellule pavimentose detto endostio
- Ossa brevi o corte (ossa carpali e tarsali) composte da una massa spugnosa avvolta da una corteccia compatta
- Ossa piatte (coste, sterno, volta cranica, scapole) costituite da uno strato spongioso compreso tra due tavolati compatti
- Ossa irregolari (vertebre, ossa del cranio, ossa facciali)

Il tessuto osseo può essere classificato in **lamellare** e **non lamellare**: il tessuto osseo lamellare è quello di gran lunga prevalente nella vita post-natale nello scheletro dei mammiferi e possiede elevate potenzialità meccaniche di resistenza a trazione, pressione e torsione con il minimo aggravio ponderale grazie alla tendenza della matrice intercellulare a disporsi in lamelle; in ogni lamella le fibre di collagene hanno decorso tendenzialmente parallelo e formano con quelle della lamella contigua un angolo di varia ampiezza; lamelle contigue sono separate da matrice mineralizzata

attraversata da fibre di collagene a disposizione irregolare. Il tessuto lamellare è suddivisibile in tessuto osseo compatto o corticale (figura 1.1) e tessuto osseo spongioso o trabecolare. Il tessuto non lamellare presente nei mammiferi è costituito da fibre di collagene intrecciate con disposizione casuale, costituisce le ossa fetali e viene progressivamente sostituito da tessuto lamellare durante lo sviluppo post-natale; può persistere nell'adulto a livello delle suture, in corrispondenza delle sedi in cui il periostio aderisce strettamente all'osso, a livello delle inserzioni legamentose o tendinee, in prossimità delle superfici articolari, temporaneamente dopo una frattura e in parte a livello del cemento del dente; possiede minore resistenza meccanica rispetto al tessuto lamellare ed è attraversato da cavità anastomizzate denominate spazi di *Havers* contenenti vasi, terminazioni nervose e midollo osseo.

Come descritto precedentemente il tessuto lamellare può essere di tipo compatto o spongioso: il tessuto compatto costituisce la porzione centrale delle ossa lunghe (diafisi) e lo strato superficiale delle epifisi (porzioni terminali) delle ossa lunghe e delle ossa brevi oltre ai due tavolati tipici delle ossa piatte; l'unità funzionale dell'osso compatto è rappresentata dall'osteone o sistema concentrico di *Havers* (figura 1.2); l'osteone è caratterizzato da forma cilindrica e da una altezza compresa tra 0.9 e 1.2 mm; è attraversato nel senso della lunghezza dal canale di *Havers* il cui diametro varia tra 20 e 110 μm ; le lamelle dell'osteone sono disposte concentricamente al canale di *Havers* e l'andamento delle fibre di collagene di una lamella è ortogonale o quasi a quello della lamella vicina; nell'ambito di ogni singola lamella le fibre di collagene risultano parallele e come visibile in figura 1.2 la lamella più profonda è quella di più recente deposizione.

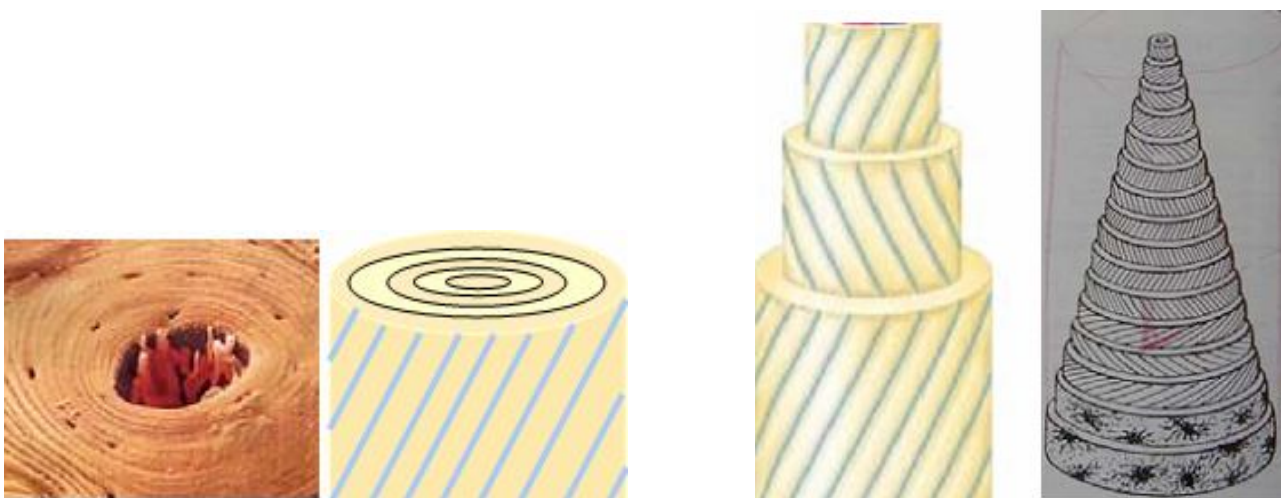


Figura 1.2 – Sistema concentrico di *Havers* o osteone (sinistra) e struttura dell'osso lamellare con disposizione delle fibre di collagene (destra). [Migliavacca, Dispense del corso di Biomeccanica, 2008]

Nella struttura ossea è possibile osservare la presenza di lacune contenenti osteociti da cui si dipartono canalicoli ramificati ed anastomizzati in cui sono presenti i prolungamenti citoplasmatici delle cellule in grado di garantire collegamento e comunicazione. I canalicoli che si dipartono dalle lamelle più profonde si aprono generalmente ad imbuto nel canale di *Havers*: il sistema delle lacune a canalicoli è ampiamente intercomunicante ed in stretto rapporto anche con i vasi sanguigni che decorrono nel canale di *Havers* assicurando un costante scambio metabolico per tutti gli osteociti.

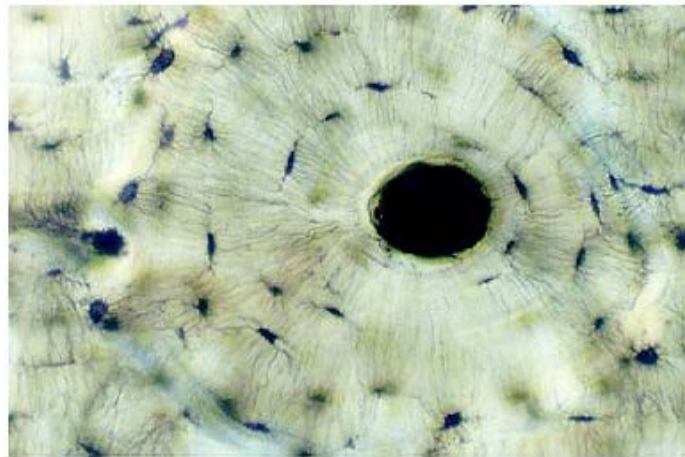


Figura 1.3 – Sezione istologica di osso corticale. [Redaelli e Montevicchi, Biomeccanica. Analisi multiscala di tessuti biologici]

Un aspetto particolarmente interessante dell'architettura dell'osso compatto (figura 1.3) è rappresentato dalla presenza di cavità con decorso trasversale od obliquo rispetto all'asse maggiore dell'osso dette canali di *Volkman* in grado di porre in comunicazione differenti sistemi haversiani (figura 1.4).



Figura 1.4 – Connessione tra sistemi haversiani garantita da un canale di *Volkman*. [Migliavacca, Dispense del corso di Biomeccanica, 2008]

Una sezione trasversale di osso compatto come quella mostrata in figura 1.5 evidenzia la presenza di tre differenti sistemi di lamelle: il sistema concentrico (osteone), il sistema delle lamelle interstiziali ed il sistema delle lamelle circonferenziali o limitanti interne ed esterne.

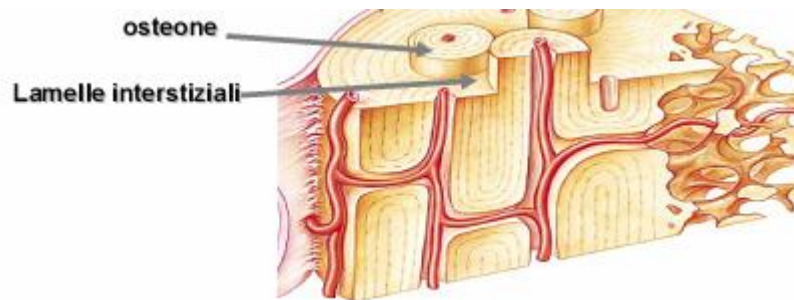


Figura 1.5 – Sezione trasversale di osso compatto e sistemi di lamelle in esso presenti. [Migliavacca, Dispense del corso di Biomeccanica, 2008]

Le lamelle interstiziali colmano gli spazi presenti tra gli osteoni mentre le lamelle circonferenziali sono localizzate sulla superficie interna ed esterna dello spessore della diafisi delle ossa lunghe con andamento concentrico rispetto all'asse maggiore della struttura ossea.

Il tessuto spugnoso (figura 1.6) costituisce la maggior parte delle ossa brevi, delle epifisi delle ossa lunghe e della parte interna delle ossa piatte; è costituito da trabecole diversamente orientate nei vari segmenti scheletrici in funzione delle sollecitazioni meccaniche a cui questi sono sottoposti; le trabecole sono costituite dall'associazione di strati lamellari e risultano variamente anastomizzate a delimitare spazi intercomunicanti, denominati cavità midollari, in quanto occupati da midollo osseo oltre che da vasi sanguigni e terminazioni nervose (figura 1.7).



Figura 1.6 – Tessuto osseo spongioso (sinistra) e schema relativo all'orientazione delle strutture trabecolari (destra). [Migliavacca, Dispense del corso di Biomeccanica, 2008]

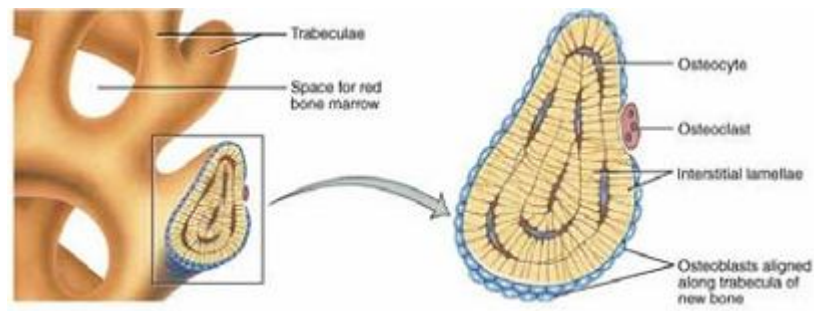


Figura 1.7 – Struttura di una trabecola e cavità midollari. [Migliavacca, Dispense del corso di Biomeccanica, 2008]

Come visibile in figura 1.7 lamelle contigue sono connesse da matrice mineralizzata attraversata da fibre di collagene a disposizione irregolare; una sezione istologica di tessuto spongioso evidenzia la mancanza di osteoni e la presenza di trabecole che circondano midollo osseo rosso (figura 1.8).

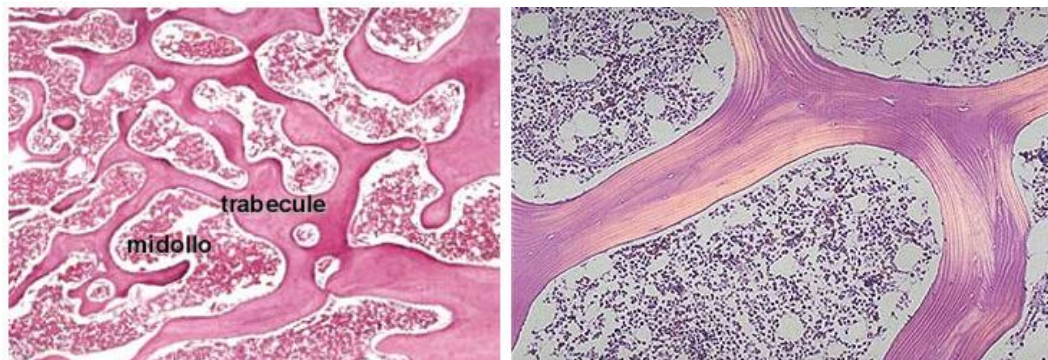
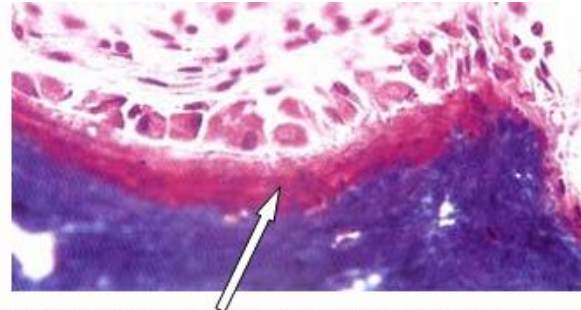
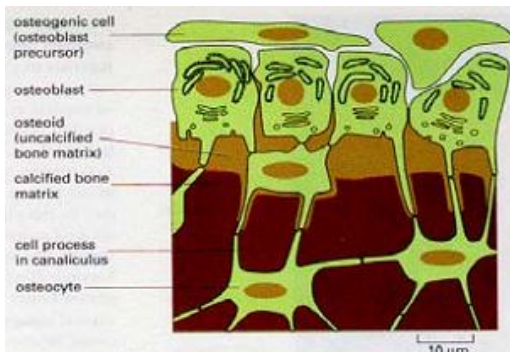


Figura 1.8 – Sezione istologica di tessuto trabecolare. [Migliavacca, Dispense del corso di Biomeccanica, 2008]

1.1.2 Cellule ossee

Le cellule fondamentali del tessuto osseo, responsabili della sintesi dei componenti della matrice non mineralizzata (osteoidi), sono gli osteoblasti: si tratta di cellule con morfologia approssimativamente cubica che derivano dalla differenziazione delle cellule osteoprogenitrici, ossia cellule staminali che rappresentano una prima differenziazione delle cellule mesenchimali. Gli osteoblasti, come la maggior parte delle cellule secernenti, sono caratterizzati dalla presenza di un reticolo endoplasmatico rugoso e di un apparato di Golgi molto esteso e responsabili da un punto di vista istologico della loro basofilia citoplasmatica. Similmente ai fibroblasti, le cellule fondamentali del tessuto connettivo propriamente detto, gli osteoblasti sono infatti costantemente impegnati, nelle fasi di formazione dell'osso, nella sintesi dei componenti molecolari che andranno a costituire sia le

fibre che le glicoproteine della matrice. Tali composti vengono successivamente espulsi dalle cellule per esocitosi e vengono quindi assemblati nella loro forma definitiva all'esterno della cellula.



Presenza di uno strato di matrice non mineralizzata (osteoide) tra la membrana cellulare e la matrice già mineralizzata

Figura 1.9 – Rappresentazione semplificata della morfologia di osteoblasti ed osteociti (sinistra) e sezione istologica di tessuto osseo con in evidenza uno strato di osteoide presente tra membrana cellulare e matrice già mineralizzata (destra). [Migliavacca, Dispense del corso di Biomeccanica, 2008]

La matrice ossea precoce prodotta dagli osteoblasti, non cristallizzata, è detta tessuto osteoide (figura 1.9). All'interno della matrice sono presenti numerose vescicole di secrezione ricche di un enzima caratteristico, la fosfatasi alcalina, e di ioni Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{2-}$: queste vescicole costituiscono i primi nuclei di mineralizzazione della matrice. L'osteoblasto contiene al suo interno delle granulazioni *PAS-positive* dette *Matrix Vesicles* o globuli calcificanti, provvisti di membrana e ritenuti l'agente che dà il via al processo di mineralizzazione. Tra le varie proteine secrete dall'osteoblasto troviamo anche la procollagenasi, enzima che deposto nella matrice verrà trasformato nella sua forma attiva, la collagenasi, che sarà impiegata dagli osteoclasti nella demolizione delle fibre di collagene. L'attivazione della procollagenasi è a carico degli stessi osteoclasti, che tramite una serie di proteine, arrivano a disporre della collagenasi matura.

Una volta completata la sintesi della matrice ed avvenuta la sua calcificazione, gli osteoblasti si sistemano in cavità ellissoidali non mineralizzate scavate nella matrice stessa definite lacune ossee. In questa fase prendono il nome di osteociti e, pur rimanendo cellule vitali, entrano in uno stato di quiescenza; pertanto gli osteociti rappresentano, analogamente ai fibrociti, un successivo stadio funzionale di una stessa cellula, caratterizzati da un apparato del Golgi e da un reticolo endoplasmatico granulare poco sviluppati. Tipici di queste cellule sono i lunghi prolungamenti citoplasmatici che decorrono all'interno di microgallerie definite canalicoli ossei con cui la cellula attinge alle sostanze nutritive: al microscopio elettronico si può osservare che tra la matrice calcificata e la membrana plasmatica è presente uno spazio occupato da glicoproteine e liquido interstiziale. I canalicoli possono anche intersecarsi cosicché non solo più osteociti sono in contatto tra loro ma anche il liquido interstiziale giunge a cellule poste lontano dalla sorgente nutritiva. Gli

osteociti non rappresentano solo un mero alter ego degli osteoblasti: questi ultimi possono essere controllati dai primi mediante opportuni segnali qualora vi sia bisogno di deporre matrice ossea. Inoltre gli osteociti, possedendo recettori di membrana per l'ormone paratiroideo (PTH), controllano anche l'azione degli osteoclasti; questi rappresentano una tipologia di cellule plurinucleata di grosse dimensioni (20-100 μm), derivante dalla fusione di diversi monociti e situata all'interno di fossette dette lacune di *Howship*, deputata a produrre e secernere enzimi che agiscono degradando la matrice calcificata, permettendo il riassorbimento dell'osso (figura 1.10). Questi enzimi entrano in gioco sia nei processi di crescita, durante i quali è necessaria la sostituzione del tessuto osseo immaturo (non lamellare) in tessuto osseo lamellare adulto, sia per permettere le successive rimodellazioni dell'osso.

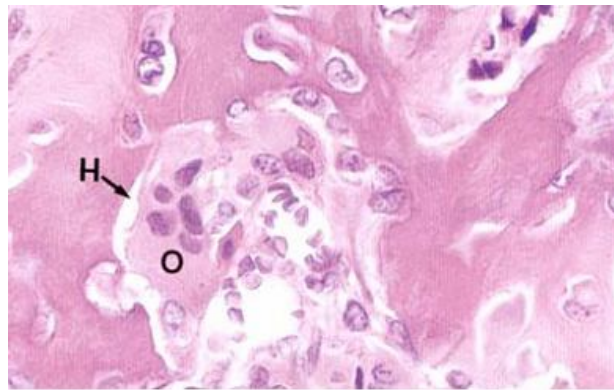


Figura 1.10 – Sezione istologica rappresentante osteoclasti all'interno di una lacuna di *Howship*. [Migliavacca, Dispense del corso di Biomeccanica, 2008]

1.1.3 Ossificazione

Con il termine ossificazione si intende la formazione del tessuto osseo, che è l'ultimo a comparire nell'embrione (secondo e terzo mese di gravidanza). L'osteogenesi segue due differenti processi che differiscono solo per le fasi iniziali detti ossificazione intermembranosa ed endocondrale.

1.1.3.1 Ossificazione intermembranosa

L'ossificazione intermembranosa detta anche "diretta" comincia in seno al mesenchima o a partire dal tessuto fibrillare denso e rappresenta l'ossificazione tipica del cranio e di alcune zone facciali. Nel mesenchima si ha una crescita vascolare che porta ad un aumento della fibrillogenesi (produzione di fibrille della matrice) e della proliferazione cellulare: progressivamente si assiste alla formazione del blastema mesenchimale al cui interno si differenziano i preosteoblasti, che successivamente divengono osteoblasti deputati alla produzione di una matrice primitiva. Il

processo prosegue con la formazione delle prime esili trabecole composte prevalentemente da collagene e glicoproteine ed al cui interno una parte del connettivo derivato dal mesenchima si differenzia in midollo; la matrice presente è priva di minerali e viene denominata tessuto preosseo. Gli osteoblasti iniziano la produzione di nuova osteoide nella quale rimangono progressivamente bloccati procedendo alla differenziazione in osteociti; il tessuto spugnoso originato risulta lamellare e presenta fibre di collagene intrecciate mentre il manicotto connettivale che si crea durante questa fase costituirà il periostio. La contemporanea azione di osteoblasti ed osteoclasti determina l'avvio del processo di rimaneggiamento che consente la comparsa del nuovo tessuto lamellare, spugnoso oppure compatto.

1.1.3.2 Ossificazione endocondrale

L'ossificazione endocondrale detta anche "indiretta" si origina a partire da un precedente abbozzo cartilagineo che viene riassorbito e sostituito dal tessuto osseo. Nelle ossa lunghe la prima ossificazione avviene nella diafisi: dopo una fase di proliferazione i condrociti riassorbono la matrice e aumentano di volume; nella matrice si diffondono sali di calcio, collagene X e *vascular endothelial growth factors* (VEGF), nonché osteoclasti che degradano i condrociti, rendendo la cartilagine invasa da osteoblasti e vasi del periostio; il tessuto spugnoso non viene riassorbito e la sua componente vascolare costituisce il midollo. Il manicotto osseo crea tessuto osseo compatto lamellare che progressivamente si estende a scapito della cartilagine; il processo prosegue con il graduale ritiro della cartilagine e con l'aumento di tessuto osseo compatto con allungamento di diafisi ed epifisi (nelle ossa lunghe) fino al raggiungimento di una condizione di equilibrio. Al termine dell'età di sviluppo la cartilagine permane unicamente a livello dei piatti di crescita dell'osso e a livello articolare.

1.1.4 Metabolismo osseo



Figura 1.11 – Schema semplificato dei processi di apposizione e riassorbimento di tessuto osseo. [Tratto da www.wikipedia.it]

La componente mineralizzata dell'osso è per lo più composta da calcio Ca e fosforo P, con un contenuto medio di calcio del 60%; la quantità di calcio presente all'interno del corpo umano corrisponde a circa l'1.5% del peso corporeo (1 Kg ogni 70 Kg); gli osteoclasti scompongono mediamente 0.5 grammi di calcio al giorno: ciò significa che lo scheletro, in un periodo di cinque-sei anni, viene completamente demolito e ricostruito (1000g / 0.5 g/giorno) richiedendo notevoli sforzi metabolici (figura 1.11).

Al fine di garantire il corretto funzionamento del sistema nervoso e dell'apparato muscolare, il corpo umano necessita dell'apporto quotidiano di calcio. La concentrazione di calcio nel sangue detta calcemia è regolata entro stretti limiti ed in genere varia tra 2.25 e 2.6 mmol/l. Il tessuto osseo oltre alle funzioni di protezione degli organi interni e locomozione funge da magazzino tampone per calcio e fosforo; nel caso in cui la calcemia si abbassi eccessivamente gli osteoclasti intensificano il processo di riassorbimento osseo; se viceversa la calcemia supera un limite critico gli osteoblasti producono un maggior quantitativo di fibrille di collagene sulle quali è possibile depositare cristalli di idrossiapatite così da ridurre il contenuto di calcio presente nel sangue (omeostasi del calcio). Oltre alle variazioni continue della calcemia esistono numerosi meccanismi ormonali che stimolano o inibiscono l'attività di osteoblasti ed osteoclasti: diverse condizioni, genetiche, patologiche e di

stile di vita influiscono notevolmente sulla loro regolazione. La figura 1.11 illustra in modo semplificato il flusso e la trasformazione di materiali maggiormente coinvolti nella continua rigenerazione ossea. Nell'infanzia e in gioventù gli osteoblasti lavorano in misura maggiore rispetto agli osteoclasti per cui il tessuto osseo cresce; intorno ai trent'anni la massima massa ossea è stata raggiunta e progressivamente prendono il sopravvento gli osteoclasti con la propria funzione di scomposizione; infine durante la senescenza la massa ossea diminuisce a causa della superiore attività degli osteoclasti.

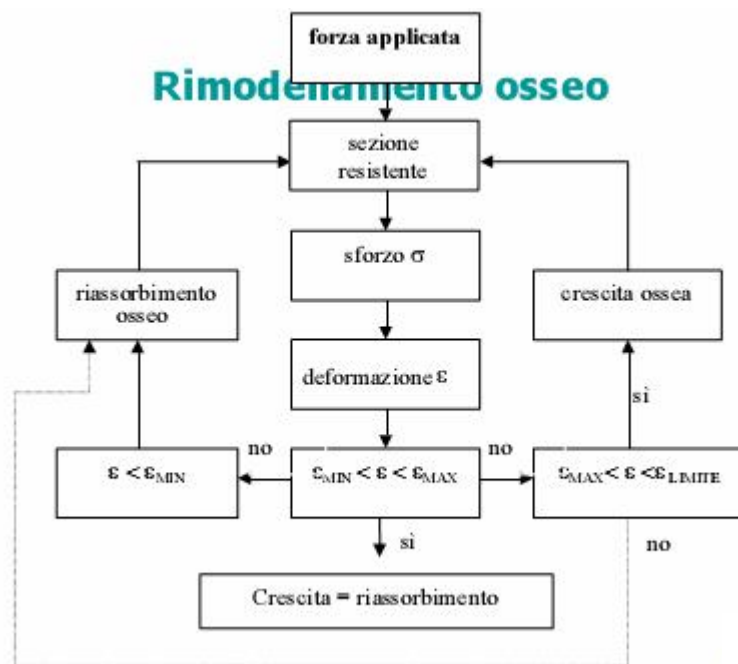


Figura 1.12 – Schema relativo all’omeostasi meccanica dell’osso. [Migliavacca, Dispense del corso di Biomeccanica, 2008]

Lo schema riportato in figura 1.12 mostra i punti salienti della cosiddetta omeostasi meccanica: crescita ossea con apposizione di nuova matrice e riassorbimento sono regolati sulla base dei carichi applicati sulla sezione resistente dell’osso e sui conseguenti valori di sforzo e deformazione; nel caso in cui quest’ultima si mantenga all’interno di un *range* compreso tra 200 e 2500 $\mu strain$ crescita e riassorbimento osseo si equivalgono dando origine ad una condizione di equilibrio dinamico.

Il processo di rimodellamento previene l’accumulo di danni da fatica ed è reso possibile da squadre composte da una decina di osteoclasti e da centinaia di osteoblasti denominate BMUs o *basic multicellular units*; il riassorbimento prevede la creazione di tunnel o gallerie di circa 200 μm di diametro con una velocità di lavoro di 40 μm al giorno; parallelamente le cellule osteogenetiche si differenziano in osteoblasti che riempiono progressivamente il tunnel con nuova osteoide ad una velocità di 0.5-1 μm al giorno (figura 1.13).

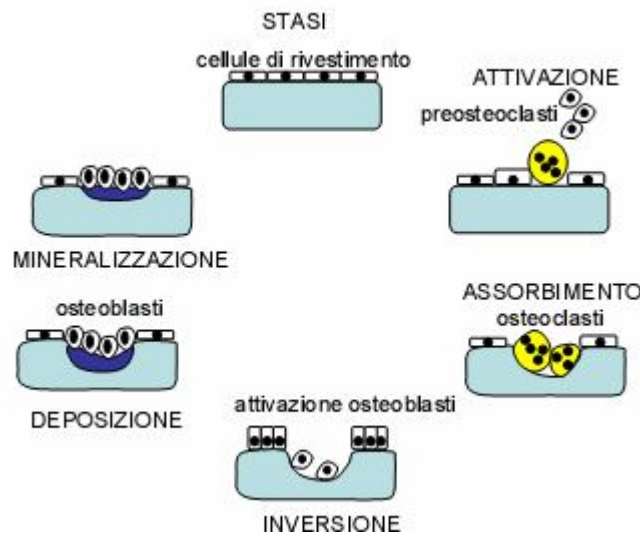


Figura 1.13 – Rappresentazione dei processi di riassorbimento osseo ad opera degli osteoclasti e di nuova apposizione di osteoide regolata dagli osteoblasti e successivamente mineralizzata. [Redaelli e Montevecchi, Biomeccanica. Analisi multiscala di tessuti biologici]

1.1.5 Malattie metaboliche ossee e tessuto osseo senescente

La diminuzione di massa ossea con l'avanzare dell'età rappresenta un fenomeno inevitabile; la condizione in cui la massa di tessuto osseo decrementa fino al raggiungimento di un livello critico al di sotto del quale il rischio di fratture è estremamente elevato è definita osteoporosi; essa è generata da uno squilibrio tra apposizione di nuova matrice ossea e riassorbimento di tessuto e secondo Floman può essere definita come “una patologia dell'età senescente caratterizzata da una progressiva diminuzione di massa e dall'alterazione dell'intera architettura ossea”[Bono et al.,2003]. L'osteoporosi primaria legata all'invecchiamento è stata classificata come osteoporosi di tipo II o osteoporosi senile; l'osteoporosi di tipo I è invece quella associata all'inizio della menopausa e viene quindi anche definita osteoporosi post-menopausa; altre cause di osteoporosi possono essere l'utilizzo prolungato di corticosteroidi o endocrinopatie [Bono et al., 2003].

Il picco di massa ossea è raggiunto nella maggior parte delle persone tra i sedici ed i venticinque anni di età; maggiore è la massa ossea raggiunta durante l'età dello sviluppo e inferiore sarà il rischio di essere soggetti ad osteoporosi durante il resto della vita; la perdita di massa ossea (figura 1.14) avviene con una rapidità pari allo 0.3% per anno negli uomini e allo 0.5% nelle donne con un incremento fino al 5-6% nei primi cinque anni dall'inizio della menopausa; dato che statisticamente la speranza di vita delle donne è superiore rispetto a quella degli uomini l'innalzamento della vita media pone i soggetti femminili a maggior rischio osteoporotico (considerando soltanto il fattore età).

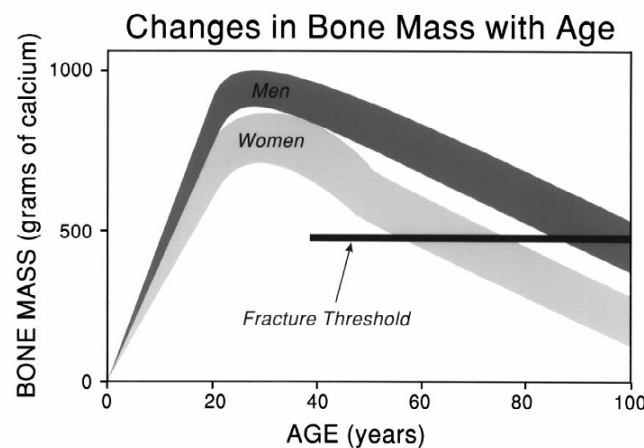


Figura 1.14 – Cambiamenti nella massa ossea in relazione all’età del soggetto; dopo un picco raggiunto all’inizio dell’età adulta si assiste ad un progressivo decadimento in particolare nei soggetti femminili dopo la menopausa; la soglia di frattura è teorica ma sottolinea come la diminuzione di massa ossea incrementi il rischio di fratture in modo significativo. [Mundy, 2000]

Fattori di carattere genetico rivestono un ruolo fondamentale nel livello di massa ossea raggiunta: numerosi studi condotti da diversi gruppi di ricerca [Morrison et al., 1994; Garnero et al., 1996] sono focalizzati sulla necessità di chiarire il funzionamento del gene del recettore cellulare della vitamina D, del collagene di tipo I, delle interleuchine 6 e dei *transforming growth factors* β con lo scopo di individuare l’importanza relativa di ciascuno di essi nel livello di massa ossea raggiunta da ogni individuo. [Mundy, 2000]

Le due principali tipologie di osteoporosi hanno effetti differenti sul tipo di perdita ossea: l’osteoporosi di tipo I sembra colpire maggiormente l’osso trabecolare mentre quella di tipo II ha effetti sia sull’osso corticale che su quello spongioso; entrambe le tipologie di osteoporosi incrementano il rischio di fratture all’osso trabecolare ma è quella di tipo II ad incrementare notevolmente la possibilità di incorrere in fratture al collo del femore oppure ad omero e tibia prossimali, caratterizzati da osso compatto. Il meccanismo cellulare alla base dell’osteoporosi di tipo II è multifattoriale: il principale parametro da considerare è la progressiva carenza di calcio e vitamina D assunti con la dieta quotidiana; la diminuzione di appetito che sopraggiunge con l’avanzare dell’età o ancora, come evidenziato da numerose ricerche volte a studiare le principali caratteristiche della società, le sempre maggiori difficoltà economiche della popolazione anziana conducono progressivamente ad una dieta sbilanciata e povera di calcio e vitamina D. Un secondo aspetto da tenere in considerazione è rappresentato dall’inattività fisica: la persistente inattività generata dal dolore causato da una microfrattura osteoporotica (ad esempio a livello vertebrale) può portare ad un circolo vizioso con ulteriore perdita ossea, incremento nel numero di fratture e nell’intensità del dolore percepito. Un ulteriore fattore da analizzare per comprendere in modo

ottimale il fenomeno dell'osteoporosi è rappresentato dai meccanismi di regolazione ormonale: una delle cause principali alla base della patologia è costituita dalla netta diminuzione nel livello di estrogeni che sopraggiunge con l'età, specialmente nelle donne dopo la menopausa. L'effetto cumulativo dei diversi fattori esposti nel presente paragrafo è la sovraregolazione (sovra stimolazione) del processo di riassorbimento osseo e la sottoregolazione della fase di apposizione di nuova matrice, sebbene la completa comprensione delle cause della malattia non sia ancora stata raggiunta.

1.1.5.1 Effetti dell'osteoporosi sull'osso trabecolare

La struttura fisiologica dell'osso spongioso è caratterizzata da trabecole verticali e orizzontali; le strutture trabecolari sono altamente interconnesse ed è proprio tale organizzazione a garantire la notevole resistenza alla compressione tipica ad esempio dei corpi vertebrali. L'osteoporosi è un disordine in cui la massa ossea totale è notevolmente ridotta sebbene la sua qualità sia normale; se una microsezione fosse analizzata dal punto di vista biochimico sarebbe possibile osservare un rapporto normale tra osteoide e mineralizzazione. La struttura patologica evidenzia una netta diminuzione del numero di trabecole orizzontali con decremento nelle interconnessioni e conseguente decadimento nelle prestazioni della struttura ossea che va incontro a cedimenti catastrofici anche in presenza di carichi normalmente tollerati (figura 1.15).

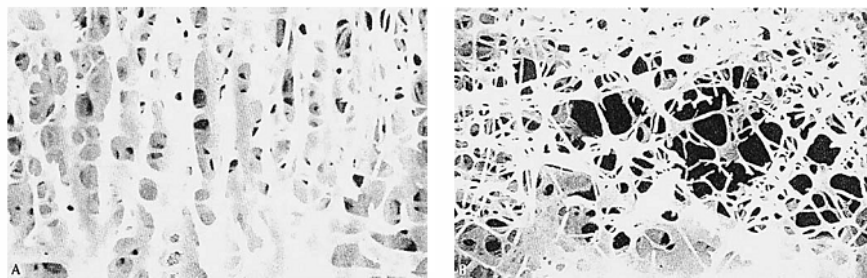


Figura 1.15 – Confronto tra osso fisiologico (sinistra) ed osteoporotico (destra); si osservi la notevole differenza in termini di interconnessioni e densità ossea. [Bono et al., 2003]

1.1.5.2 Effetti dell'osteoporosi sull'osso corticale

La struttura delle ossa lunghe è costituita principalmente da osso compatto o corticale; la diminuzione di massa determina una minor resistenza della struttura a carichi di flessione e torsione con diminuzione dello sforzo a rottura; fortunatamente le ossa lunghe presentano un meccanismo compensatorio per controbilanciare gli effetti meccanici della diminuzione di massa ossea; con

L'avanzare dell'età infatti si assiste ad un progressivo riassorbimento dell'endostio e ad una nuova apposizione di periostio con incremento nel diametro della struttura; la resistenza delle ossa lunghe a fenomeni di flessione e torsione è garantita proprio dai valori di momento di inerzia superficiale e momento di inerzia polare rispettivamente. Questo aspetto caratteristico delle ossa lunghe non si riscontra nelle vertebre in cui la percentuale di osso corticale è molto ridotta e rappresenta una delle principali motivazioni per cui fratture a livello vertebrale costituiscano la porzione più rilevante dei cedimenti ossei in pazienti senescenti.

1.1.5.3 Terapie farmacologiche per il trattamento dell'osteoporosi

Numerose terapie per il trattamento dell'osteoporosi sono basate sul tentativo di stimolare l'attività degli osteoblasti ed i relativi processi di proliferazione e differenziazione cellulare; diversi fattori di regolazione possono contribuire all'incremento nella capacità di apposizione di nuova matrice ossea tra cui *fibroblast growth factor I (FGF-I)*, *insulin-like growth factor I-II (IGF)*, *bone morphogenetic proteins (BMPs)*, *transforming growth factor β (TGF β)* e *platelet-derived growth factor (PDGF)*. Come sottolineato da Mundy (2000) fattori di crescita quali BMP hanno effetti diretti sulla capacità di differenziazione degli osteoblasti ma incrementano anche la capacità proliferativa di queste cellule grazie ad effetti secondari. TGF β ed FGF-I hanno effetti diretti sulla proliferazione degli osteoblasti ed incrementano la capacità di apposizione di nuova osteoide grazie alla produzione di altri fattori di crescita, tra cui BMP-2, che essi stimolano. I fattori di crescita esposti hanno dimostrato la capacità di accrescere la produzione di nuovo tessuto osseo in vivo; tuttavia il beneficio che tali molecole apportano sull'attività degli osteoblasti è bilanciato da potenziali effetti tossici che queste possono avere su altri tessuti oltre che da svariati effetti collaterali. L'incremento nella capacità proliferativa indotto nelle cellule di altri tessuti dell'individuo può condurre a forme di neoplasia; FGF-I causa un abbassamento medio nella pressione arteriosa del 20%, IGF-I determina fenomeni di ipoglicemia. Un ulteriore aspetto da considerare è quello per cui i benefici apportati dai fattori di crescita precedentemente analizzati sono ottenibili solo in presenza di concentrazioni adeguate nel microambiente osseo: il rilascio di tali molecole a livello sistemico non genera effetti significativi sul metabolismo osseo; per questo motivo sviluppi futuri di terapie basate su fattori di crescita richiederanno un efficace meccanismo di rilascio così da garantire il raggiungimento della concentrazione desiderata nel sito di interesse.

Altre strategie utilizzabili per il trattamento dell'osteoporosi includono la possibilità di combinare fattori di crescita e proteine specifiche in grado di limitare gli effetti potenzialmente tossici che

questi possono avere su alcuni tessuti; è inoltre possibile l'associazione con bifosfonati in grado di riconoscere la superficie ossea consentendo la veicolazione dei fattori di crescita in corrispondenza del sito di interesse.

Il trattamento dell'osteoporosi può inoltre essere effettuato mediante fluoruri in grado di incrementare la capacità degli osteoblasti di apposizione di nuova matrice ossea, sebbene numerosi studi siano ancora in corso per provarne l'efficacia; l'attività dei fluoruri sembra maggiore sull'osso trabecolare rispetto a quello corticale e non mancano effetti collaterali quali difetti nella mineralizzazione dell'osso.

L'utilizzo di bifosfonati (figura 1.16) tra cui etidronato, pamidronato, alendronato e risedronato sembra invece essere in grado di limitare l'azione degli osteoclasti senza effetti significativi sull'attività degli osteoblasti.

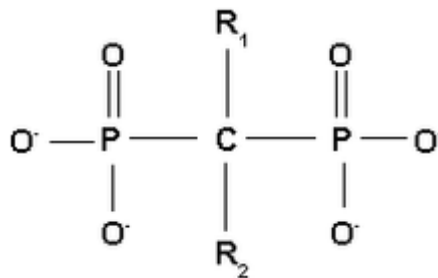


Figura 1.16 – Struttura chimica di un bifosfonato: è possibile osservare i due gruppi fosfato e le due catene laterali R₁ ed R₂. La catena laterale lunga (R₁) determina le proprietà chimiche, la modalità di azione e la potenza del farmaco mentre la catena corta (R₂) è responsabile delle proprietà chimiche e della farmacocinetica del composto.

In particolare i bifosfonati possono essere suddivisi in azotati e non azotati a seconda della presenza di un atomo di azoto nella formula di struttura; i bifosfonati non azotati vengono metabolizzati in un composto che è in grado di competere con l'adenosina trifosfato, responsabile del metabolismo energetico della cellula; a seguito di tale processo l'osteoclasto procede verso uno stato di esaurimento energetico e conseguente apoptosi. I bifosfonati contenenti azoto sono in grado di interferire con la trasmissione dei segnali cellulari richiesti per la proliferazione degli osteoclasti comportando alterazioni morfologiche nelle cellule ed infine apoptosi.

La calcitonina, polipeptide normalmente sintetizzato dalle cellule C parafollicolari della tiroide, blocca l'attività di riassorbimento osseo degli osteoclasti ed incrementa lievemente l'azione degli osteoblasti venendo quindi spesso utilizzata per il trattamento dell'osteoporosi.

Le terapie per pazienti osteoporotici possono includere la somministrazione di vitamina D, calcio e magnesio oppure l'assunzione di ormoni tra cui somatotropina (STH) per le donne e testosterone o nandrolone decanoato per i soggetti maschili.

In alcuni casi è possibile procedere con diuretici tiazidici in grado di aumentare il riassorbimento renale di calcio o attraverso somministrazione di farmaci osteoformativi tra cui ormone paratiroideo o teriparatide, forti stimolatori della formazione ossea nei casi di grave osteoporosi o di insuccesso delle altre terapie esistenti.

Le terapie farmacologiche presentate sono in grado di curare solo parzialmente la patologia osteoporotica in quanto l'azione di ciascuna di esse è limitata alla stimolazione della capacità proliferativa degli osteoblasti e della relativa attività di deposizione di matrice ossea oppure alla limitazione dell'azione degli osteoclasti. Una classe di molecole in grado di promuovere entrambi gli effetti dei farmaci precedentemente analizzati è rappresentata dai cosiddetti DABA (*dual action bone agents*) tra i quali è presente lo stronzio ranelato (figura 1.17). L'utilizzo di stronzio ranelato rappresenta un innovativo trattamento della patologia osteoporotica in quanto incrementa la produzione ossea di osteoprotegerina, proteina in grado di bloccare il reclutamento e la differenziazione degli osteoclasti inibendo l'erosione dell'osso osteoporotico, e contemporaneamente stimola la proliferazione e la capacità differenziativa degli osteoblasti.

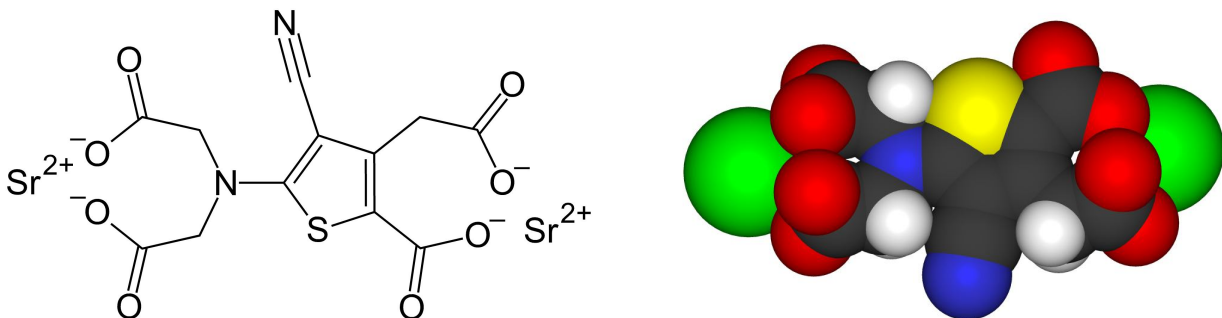


Figura 1.17 – Struttura chimica dello stronzio ranelato. [Tratto da www.wikipedia.it]

Uno studio condotto da Bonnelye e colleghi (2008) su osteoblasti ed osteoclasti murini primari ha evidenziato come un trattamento mediante stronzio ranelato per ventidue giorni sia in grado di incrementare l'azione degli osteoblasti (indicata da un incremento nella produzione di alcuni *marker* tra cui la fosfatasi alcalina) e parallelamente di ridurre il numero di osteoclasti e di distruggerne l'organizzazione dei filamenti di actina, uno dei componenti del citoscheletro.

Ricercatori dell'università di Melbourne hanno analizzato un gruppo di 1489 pazienti di sesso femminile di età superiore agli ottanta anni affetti da osteoporosi; la somministrazione di stronzio ranelato per cinque anni ha ridotto il rischio di fratture vertebrali del 31% e di fratture non vertebrali del 27% rispetto a soggetti non trattati dimostrando in tal modo come il farmaco sia in grado di contrastare efficacemente la patologia osteoporotica. [Seeman et al., Bone 2010]

1.1.6 Conclusioni

L'incremento della vita media pone la necessità di comprendere in modo sempre più accurato i meccanismi alla base delle patologie legate all'età avanzata; l'osteoporosi e le sue complicazioni determinano un sensibile peggioramento nella qualità della vita dei soggetti colpiti. Recenti avanzamenti nel campo farmacologico e chirurgico aprono nuove interessanti prospettive per il trattamento dei pazienti e l'utilizzo di dispositivi microfluidici che consentano di ottenere concentrazioni di farmaco altamente controllate potrà apportare significativi benefici nello studio degli effetti che nuove terapie avranno sulle cellule del tessuto osseo.

1.2 Le origini e il futuro della microfluidica

La microfluidica è la scienza e tecnologia di sistemi che processano e manipolano ridotte quantità di fluidi (da 10^{-9} a 10^{-18} litri) attraverso canali con dimensioni di centinaia di micrometri. Le prime applicazioni delle tecnologie microfluidiche si sono concentrate nel campo della microanalisi grazie alla possibilità di utilizzare ridottissime quantità di campioni e reagenti, di separare e individuare molecole con elevata risoluzione e sensibilità, di controllare nello spazio e nel tempo la concentrazione di determinate specie chimiche e di ottenere risultati significativi in tempi brevi con costi limitati [Whitesides, 2006]. Le origini della microfluidica risiedono in metodi microanalitici come cromatografia a fase gassosa, cromatografia liquida ad alta pressione ed elettroforesi capillare che rivoluzionarono il settore delle analisi chimiche. A seguito dell'enorme successo riscontrato da tali metodologie di analisi si cercò di sviluppare apparecchiature sempre più compatte e versatili e individuare nuove potenziali applicazioni nel campo della biochimica e della biologia. Un fondamentale incentivo alla nascita e sviluppo delle tecnologie microfluidiche giunse dopo la guerra fredda ed in particolare nei primi anni '90 dal settore militare statunitense che necessitava di piccoli dispositivi per il riconoscimento di potenziali minacce chimiche e batteriologiche. Altri importanti stimoli per lo sviluppo della microfluidica furono rappresentati dall'esplosione della genomica negli anni '80 che richiedeva elevata sensibilità, risoluzione e velocità di elaborazione per il sequenziamento del DNA e della microelettronica che grazie alle tecniche di microlitografia aveva consentito la nascita dei *chip* basati sul silicio e dei sistemi microelettromeccanici (MEMS).

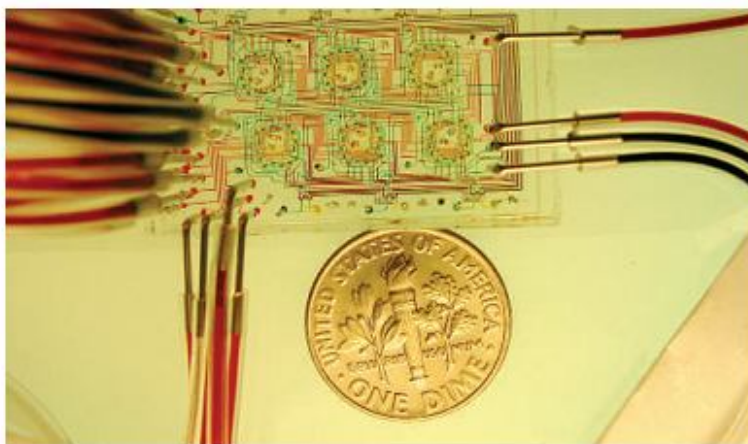


Figura 1.18 – Dispositivo microfluidico utilizzato per lo studio di cellule procariote. [Whitesides, 2006]

I primi dispositivi sperimentali creati in laboratorio furono realizzati in silicio o in vetro di silice pur non possedendo molti dei requisiti necessari per poter essere utilizzati con cellule e campioni

biologici, primo fra tutti la permeabilità ai gas [Whitesides et al., 2001]. La ricerca costante ha portato alla nascita di nuovi metodi di fabbricazione e di componenti specifici come valvole, *mixer* e pompe, fondamentali per la realizzazione dei cosiddetti *lab-on-chip*.

Un dispositivo microfluidico (figura 1.18) è generalmente composto da una serie di componenti specifici, tra cui: un sistema per l'introduzione di campioni e reagenti, un metodo per la movimentazione e per l'eventuale miscelamento dei fluidi all'interno dei microcanali presenti sul *chip*, sensori per analisi chimiche ed eventuali sistemi di purificazione nel caso in cui il sistema sia utilizzato per scopi di sintesi. Lo sviluppo delle tecniche di *soft-lithography* e l'utilizzo del polidimetilsilossano (PDMS) hanno consentito di realizzare numerosi prototipi e di testare nuove soluzioni progettuali e componenti; è stato inoltre possibile esplorare le fondamentali differenze nella fluidodinamica all'interno di canali macroscopici o di condotti di dimensioni micrometriche.

Detto **Re** il numero di *Reynolds*:

$$Re = \frac{v \cdot D \cdot \rho}{\mu} \quad [1.1]$$

in cui **v** rappresenta la velocità del fluido, **D** il diametro idraulico del condotto, **ρ** e **μ** rispettivamente densità e viscosità, è possibile effettuare un'osservazione significativa. A livello macroscopico i fluidi sono in grado di miscelarsi in modo convettivo grazie alla notevole influenza esercitata dall'inerzia rispetto alla viscosità; alla microscala, al contrario, nel momento in cui due fluidi sono inseriti all'interno di un microcanale (basso numero di *Reynolds* cioè ridotto rapporto tra forze inerziali e forze viscosi) si osserva un moto laminare con pacchetti fluidi che scorrono parallelamente, senza vortici e turbolenze, in cui il miscelamento è generato unicamente dalla diffusione in corrispondenza dell'interfaccia creatasi. [Squires et al., 2005]

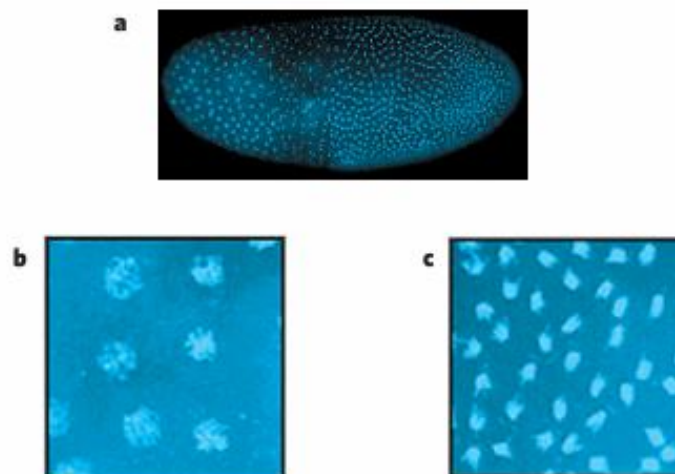


Figura 1.19 – Studio dell'effetto della temperatura sul comportamento cellulare all'interno di un microcanale (a); cellule sottoposte ad un fluido freddo (b) e ad uno caldo (c). [Whitesides, 2006]

Un interessante aspetto dei fluidi in moto all'interno di condotti microscopici è rappresentato dal flusso elettro-osmotico: quando un fluido contenente specie ioniche è posto in un microcanale con cariche fisse sulla propria superficie e un potenziale elettrico viene applicato il fluido si muove con un campo di velocità quasi piatto piuttosto che con il classico profilo di velocità parabolico; questa proprietà si dimostra particolarmente utile per la separazione di specie cariche tra cui quella di frammenti di DNA e per altre applicazioni nel campo della genomica e della proteomica. [Santiago, 2001]

Una delle più diffuse applicazioni delle tecnologie microfluidiche è rappresentata dall'analisi delle condizioni di cristallizzazione delle proteine: pH, forza ionica, composizione, concentrazione possono essere facilmente controllate e modulate per testare numerose condizioni in cui i diversi domini di specifiche proteine inizino a cristallizzare [Hansen et al., 2002]. Altre applicazioni di laboratorio ampiamente documentate riguardano la separazione di specie chimiche accoppiata alla spettroscopia di massa [Ramsey et al., 1997], lo sviluppo e la sintesi di nuovi farmaci [Dittrich et al., 2006], analisi biochimiche [Whitesides et al., 2003], la manipolazione di campioni costituiti da singole cellule o molecole [Wheeler et al., 2003], la generazione controllata di bolle [Ganan-Calvo et al., 2001] o gocce di liquidi [Thorsen et al., 2001] all'interno di un flusso continuo. La biologia cellulare rappresenta un campo di ricerca in cui la microfluidica può apportare significative innovazioni: le cellule eucariote presentano un diametro medio compreso tra 10 e 100 μm che ben si adatta alle dimensioni dei più innovativi dispositivi microfluidici (figure 1.19 e 1.20); il PDMS, grazie alla trasparenza ottica, all'elevata permeabilità ai gas e all'ottima risposta evidenziata nei test di citotossicità costituisce un materiale adatto per la creazione di microcamere in cui coltivare cellule ed osservarne il comportamento, calcolare le forze esercitate sul substrato al quale sono adese, studiarne il citoscheletro. [Hung et al., 2005]

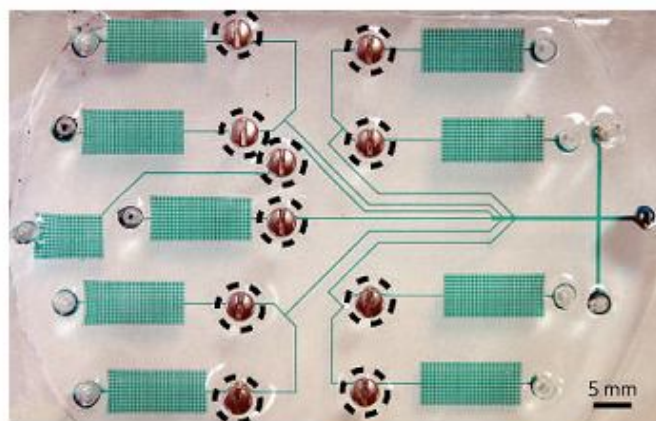


Figura 1.20 – Semplice ed economico dispositivo microfluidico utilizzato in immunocitochimica; nel dettaglio sono mostrate valvole controllabili manualmente dall'operatore. [Whitesides, 2006]

La microfluidica è ancora agli albori ed il suo impatto sulla scienza non è ancora stato rivoluzionario; le principali problematiche risiedono nella capacità di perfezionare i diversi componenti e integrarne le funzionalità in sistemi completi ed efficienti che possano essere utilizzati anche da operatori non esperti. E' una combinazione di promesse illimitate, aspettative e audaci scommesse; è un campo in continuo mutamento ma ancora non è noto come si evolverà nel proprio naturale processo di crescita; molteplici sono i requisiti che dovrà soddisfare per imporsi come tecnologia di ampio utilizzo; dovrà riscuotere un elevato successo commerciale piuttosto che rimanere confinata nei laboratori accademici e allo stesso tempo essere disponibile a prezzi contenuti. Numerose sono le applicazioni di elevato valore in cui la microfluidica può interpretare un ruolo di primo piano, sebbene il loro sviluppo richieda importanti innovazioni sia sotto il profilo tecnologico sia dal punto di vista medico: lo sviluppo di nuovi saggi in grado di monitorare la risposta di farmaci e terapie e la pianificazione di test innovativi nel campo della medicina preventiva rappresentano solo alcune delle vie verso cui si indirizzerà la microfluidica. L'industria farmaceutica richiede nuovi strumenti che consentano di guidare lo sviluppo di nuovi farmaci: applicazioni microfluidiche consentiranno di monitorare ed ottimizzare il processo di sintesi di nuove molecole e mediante l'utilizzo di cellule di linea umana di verificarne in tempi molto rapidi le prestazioni in vitro.

Svariate applicazioni tecnologiche nel mondo richiedono la manipolazione dei fluidi e l'estensione di tali manipolazioni a piccoli volumi con un preciso controllo dinamico delle concentrazioni unito alla possibilità di esplorare nuovi fenomeni che avvengono alla microscala consentirà probabilmente l'affermazione della microfluidica nel panorama scientifico [Whitesides, 2006].

1.2.1 Generazione di gradienti di concentrazione molecolari

I gradienti di concentrazione biomolecolari rappresentano un importante meccanismo di segnale per guidare i processi di crescita, migrazione e differenziamento cellulare all'interno di un ambiente tridimensionale e dinamico come quello dei tessuti biologici. Nel corso dello sviluppo embrionale gruppi selezionati di cellule producono molecole segnale proteiche che diffondono nell'ambiente extracellulare; la matrice extracellulare rappresenta dunque un ambiente dinamico in costante mutamento in cui si generano gradienti multipli di specifiche molecole in grado di evolversi nello spazio-tempo.

I gradienti di concentrazione rivestono un importante ruolo nella risposta infiammatoria, nei processi di guarigione delle ferite e nello sviluppo di masse tumorali; durante i processi di reazione

immunitaria i gradienti biomolecolari giocano un ruolo essenziale fornendo alle cellule della linea linfocitaria, ai macrofagi ed ai granulociti importanti indicazioni per promuovere una rapida migrazione verso il sito di infezione; numerose molecole proteiche risultano coinvolte nella formazione di gradienti in grado di incrementare la motilità e le capacità chemotattiche di cellule tumorali e di amplificare i processi di angiogenesi.

La necessità di comprendere tali fenomeni ha portato alla progettazione di dispositivi che siano in grado di esporre le cellule a gradienti chimici in vitro; metodi tradizionali in grado di generare gradienti di concentrazione sono stati fondamentali per acquisire conoscenze di base da parte degli scienziati ma non sono in grado di indagarne la natura quantitativa o combinatoria a causa dell'incapacità di generare profili di concentrazione precisi e controllabili nello spazio e nel tempo. Gradienti di concentrazione generati con metodi tradizionali spesso evolvono in modo imprevedibile ed incontrollabile nello spazio e nel tempo e sono difficilmente caratterizzabili quantitativamente; i gradienti si creano e si dissipano in tempi brevi limitando fortemente le tipologie cellulari utilizzabili e gli aspetti scientifici analizzabili. La tecnologia microfluidica, dotata di un elevato livello di controllo e di automazione su una scala microscopica, rappresenta un'importante strategia per controllare il flusso necessario per la generazione di gradienti quantificabili e riproducibili in grado di influenzare il comportamento cellulare. [Keenan et al., 2008]

1.2.1.1 Metodi tradizionali per la generazione di gradienti di concentrazione

Sistemi a base di idrogeli di collagene, fibrina o agarosio sono comunemente utilizzati per la generazione di gradienti di concentrazione molecolari [Heit et al., 2002]; le cellule vengono seminate all'interno di comuni pozzetti di coltura in polistirene per poi essere rivestite mediante il gel oppure vengono inserite nella miscela prima della gelificazione; la molecola di interesse viene depositata sulla superficie dell'idrogelo ed è in grado di diffondere gradualmente all'interno della matrice polimerica portando alla generazione di un gradiente che evolve nello spazio e nel tempo (figura 1.21). Tali sistemi sono molto semplici da realizzare, consentono un discreto controllo sulla posizione della sorgente e determinano un ambiente tridimensionale molto simile a quello biologico; l'assenza di riproducibilità e di controllo sull'evoluzione spazio-temporale del gradiente di concentrazione e la difficoltà di monitorare il comportamento cellulare a causa delle proprietà ottiche del gel e dell'ambiente tridimensionale rappresentano importanti limiti di tale metodologia.

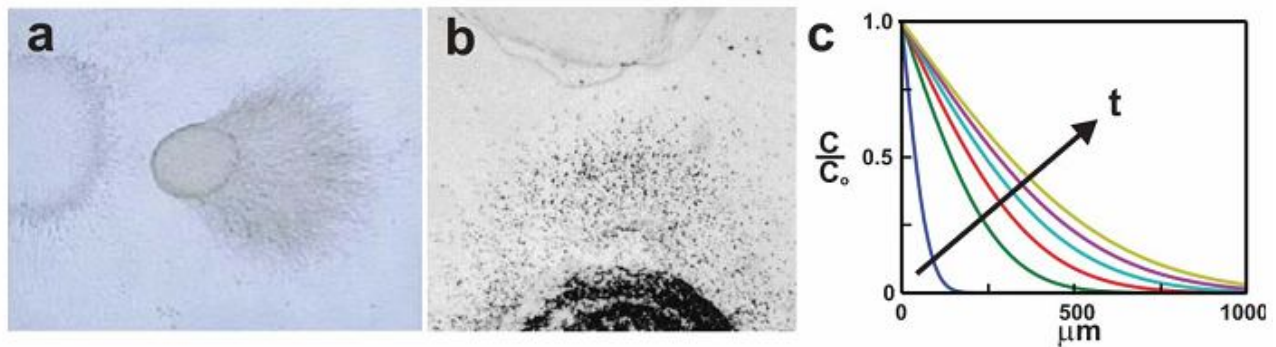


Figura 1.21 – Tessuto neurale coltivato in un gel di collagene (a); neutrofilii esposti ad un gradiente di concentrazione in un gel di agarosio (b); variazione del gradiente di concentrazione generato in un idrogel nello spazio e nel tempo (c). [Keenan et al., 2008]

Un altro metodo tradizionale per la generazione di gradienti di concentrazione è rappresentato dall'utilizzo di micropipette: queste ultime vengono riempite con una soluzione della molecola di interesse e posizionate ad una certa distanza dalle cellule mediante un manipolatore meccanico ed un microscopio; la soluzione viene espulsa in modo pneumatico oppure per semplice diffusione passiva determinando un gradiente di concentrazione radiale (figura 1.22).



Figura 1.22 – Sistema di micropipette contenenti molecole segnale montate su micromanipolatori intorno ad una piastra di Petri. [Keenan et al., 2008]

Uno storico dispositivo in grado di portare alla generazione di gradienti di concentrazione è rappresentato dalla *Boyden Chamber* (1962): un chemoattrattore viene posizionato nella parte inferiore di un pozzetto di coltura; un secondo pozzetto dotato di membrana porosa viene seminato con cellule e posizionato nel primo in modo da promuovere la diffusione della biomolecola di interesse nel compartimento superiore; il gradiente creato induce le cellule seminate sulla parte superiore della membrana porosa a migrare nella camera inferiore (figura 1.23). Il metodo consente una valutazione quantitativa della migrazione cellulare indotta anche se in pratica le possibilità di controllo del gradiente sono limitate date la sua variabilità nello spazio e nel tempo.

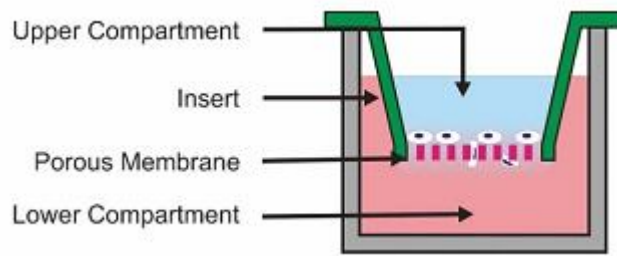


Figura 1.23 – Saggio basato sulla *Boyden Chamber*: le cellule, seminate su una membrana porosa posizionata in un pozzetto contenente un chemoattrattore, reagiscono migrando attraverso la membrana. [Keenan et al., 2008]

Significativi limiti della *Boyden Chamber* sono costituiti dall'impossibilità di correlare specifiche risposte cellulari con particolari caratteristiche del gradiente quali pendenza, sviluppo temporale e livelli di concentrazione della molecola in esame e dalla mancanza di una visione diretta delle cellule (le cellule migrate devono essere fissate e colorate a posteriori).

Nel 1977 venne sviluppato il primo metodo in grado di fornire una visualizzazione diretta del comportamento cellulare in presenza di un gradiente di concentrazione; il dispositivo, noto come *Zigmond Chamber* (figura 1.24), consiste di due canali paralleli incisi in una lastra di vetro separati da uno spaziatore (*glass ridge*); le cellule sono seminate su un vetrino che viene capovolto e posizionato sui canali lasciando un sottile *gap* di 3-10 μm rispetto allo spaziatore in vetro.

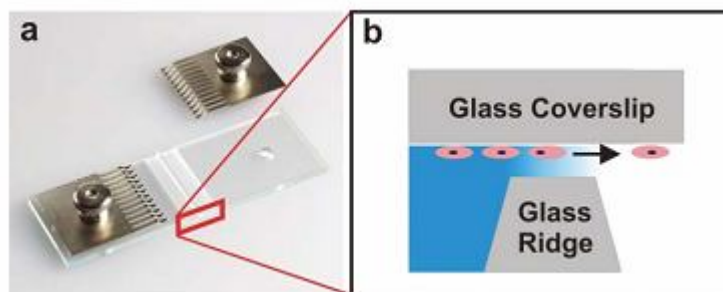


Figura 1.24 – Struttura di una *Zigmond Chamber* (a) e sezione trasversale del dispositivo (b). [Keenan et al., 2008]

L'aggiunta di 100 μl di mezzo di coltura nel *sink channel* e di 100 μl di soluzione contenente la biomolecola nel *source channel* determina la formazione di un gradiente in corrispondenza del *gap*; cambiamenti nei processi di crescita e differenziamento cellulare ed eventuali migrazioni possono essere facilmente visualizzate mediante un microscopio. Il gradiente di concentrazione è riproducibile e matematicamente prevedibile anche se il tempo di vita è limitato ad 1h, le proprietà del gradiente sono determinate esclusivamente dalle caratteristiche geometriche del dispositivo e dal coefficiente di diffusione della specie considerata e l'evaporazione influenza sensibilmente le prove sperimentali.

Un dispositivo molto simile ma affetto in misura minore dai problemi di evaporazione è la *Dunn Chamber* (figura 1.25); le camere di *sink* e *source* sono realizzate con anelli concentrici che possono essere riempiti con le appropriate soluzioni prima del posizionamento della lastra di vetro superiore seminata con le cellule, senza l'interfaccia aria-liquido che determina i problemi di evaporazione del precedente metodo; vantaggi e svantaggi sono quasi identici a quelli offerti dalla *Zigmond Chamber*.

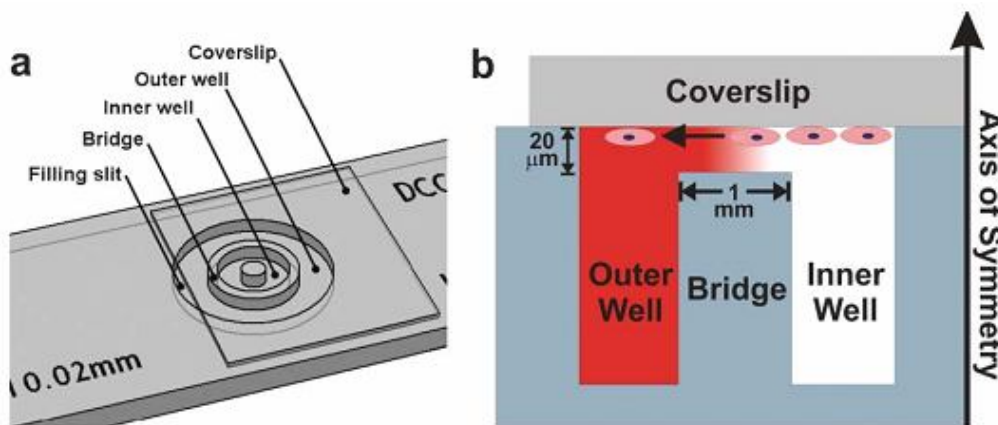


Figura 1.25 - Struttura di una *Dunn Chamber* (a) e sezione trasversale del dispositivo (b). [Keenan et al., 2008]

Esperimenti in vitro mediante i metodi tradizionali precedentemente illustrati hanno permesso di determinare le biomolecole capaci di indurre l'attivazione di meccanismi chemotattici in alcuni tipi cellulari. La necessità di comprendere l'influenza che i gradienti di concentrazione possono avere sulla risposta cellulare e le modalità con cui un gradiente chimico sia in grado di modificare la sensibilità cellulare ad un secondo gradiente hanno portato allo sviluppo di dispositivi avanzati in grado di produrre uno o più gradienti contemporaneamente con un andamento spazio-temporale controllabile dall'operatore. [Keenan et al., 2008].

1.2.1.2 Tecnologie microfluidiche per la generazione di gradienti di concentrazione

I dispositivi microfluidici presentano vantaggi pratici se confrontati con i dispositivi tradizionali: è possibile incrementare la velocità degli esperimenti riducendone al contempo i costi; l'utilizzo di volumi ridotti limita gli sprechi di costosi reagenti mentre la natura parallela dei processi di microfabbricazione consente di creare dispositivi dotati delle medesime caratteristiche. Dispositivi microfluidici sono stati utilizzati per infettare cellule con concentrazioni note di virus [Walker et al., 2004], per generare gradienti di sforzi meccanici [Zaari et al., 2004], di biomolecole proteiche

adesive in grado di mediare i processi di adesione cellulare ad un substrato [Burdick et al., 2004] e di specie chimiche in grado di indurre la migrazione chemotattica di batteri [Mao et al., 2003] e cellule eucariote [Jeon et al., 2002].

Una delle strategie più semplici per creare gradienti di concentrazione è l'adsorbimento selettivo di biomolecole di interesse sul substrato di coltura delle cellule (figure 1.26 e 1.27); la stabilità del gradiente dipende dalla reazione di attacco al substrato della specie chimica e dai componenti del mezzo di coltura che possono degradare o sostituire le molecole adsorbite. Il metodo proposto da Delamarche et al. (1998) utilizza un microcanale dotato di un *reservoir* ad una delle estremità; la soluzione contenente le biomolecole viene inserita nel *reservoir* per poi essere attirata nel canale vuoto per capillarità o diffondere nel condotto precaricato adsorbendosi alle pareti. A causa dell'elevato rapporto superficie volume presente il livello di biomolecole adsorbite impoverisce sensibilmente la soluzione iniettata; si origina un gradiente di molecole adsorbite con il livello più alto di concentrazione in corrispondenza del *reservoir*; le caratteristiche del gradiente di concentrazione dipendono unicamente dal coefficiente di diffusione, dal materiale con cui il canale è realizzato e dall'intervallo di tempo destinato alla formazione del profilo di concentrazione. Il gradiente creato è relativamente stabile anche se risulta estremamente complicato raggiungere i livelli di concentrazione desiderati dall'utente e si dimostra molto elevato il rischio di denaturazione delle biomolecole utilizzate.

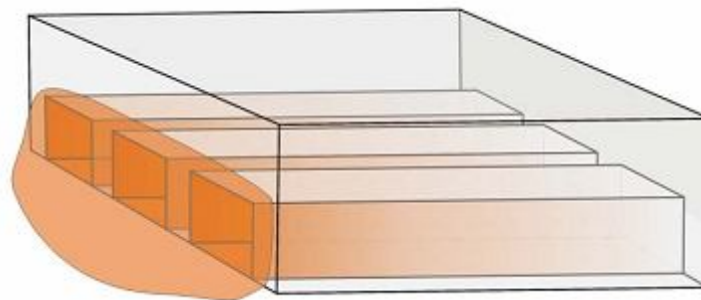


Figura 1.26 – Generazione di un gradiente di concentrazione mediante adsorbimento selettivo di biomolecole sulla superficie di un microcanale. [Keenan et al., 2008]

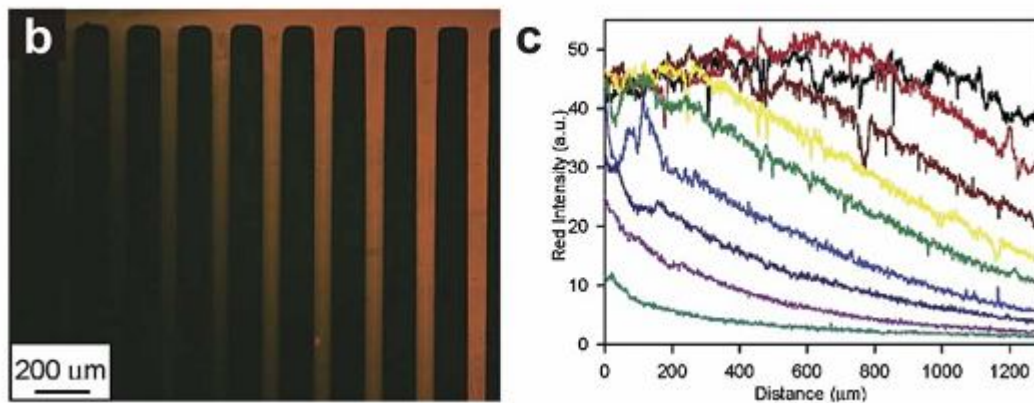


Figura 1.27 – Gradienti di concentrazione generati per adsorbimento selettivo di biomolecole all’interno di canali microfluidici (b) e relativi profili di concentrazione (c). [Keenan et al., 2008]

Semplici gradienti di concentrazione molecolari possono essere ottenuti anche attraverso l’impiego di stampi elastomerici che consentono di trasferire proteine su un substrato per colture cellulari (figura 1.28); il profilo di concentrazione viene determinato dalle dimensioni e dalla periodicità del *pattern* e non risulta in alcun modo influenzato dalla cinetica di adsorbimento.

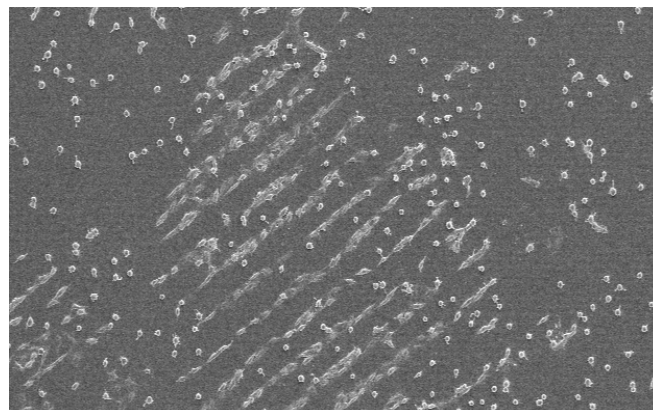


Figura 1.28 – Fibroblasti murini di linea L929 adesi su un *pattern* di fibronectina. [Immagine tratta dalla relazione d’esame del corso “Laboratorio di biocompatibilità, colture cellulari e micro-nano strutture”, 2009].

La seconda classe di generatori di gradiente di concentrazione microfluidici è rappresentata da dispositivi in grado di promuovere per sola diffusione la generazione di profili di concentrazione in continua evoluzione nello spazio e nel tempo, caratterizzati da un tempo di vita alquanto limitato. Il dispositivo sviluppato da Abhyankar et al. (2006) noto come *Nanopore Gradient Generator* utilizza membrane dotate di pori nanometrici; come mostrato in figura 1.29 è possibile osservare tre strati; l’ingresso per la sorgente di biomolecole è separato dalla camera di generazione del gradiente posizionata nello strato inferiore mediante una membrana porosa in poliestere con pori di 200 nm di diametro; il punto di inserimento delle cellule localizzato in prossimità del *gradient sink* risulta separato dalla camera inferiore da una membrana con pori di 10 μm di diametro; è stato dimostrato

come granulociti neutrofili fossero in grado di migrare in presenza di un gradiente del peptide batterico formil-metionina-leucina-fenilalanina. Il dispositivo si rileva dunque semplice ed efficace, adatto allo studio dei meccanismi chemotattici anche se la mancanza di perfusione rende impraticabili esperimenti di colture cellulari, data la progressiva diminuzione di nutrienti e l'accumulo di prodotti di scarto, e l'evoluzione del profilo di concentrazione non può essere controllata una volta caricati i fluidi necessari nei relativi pozzetti.

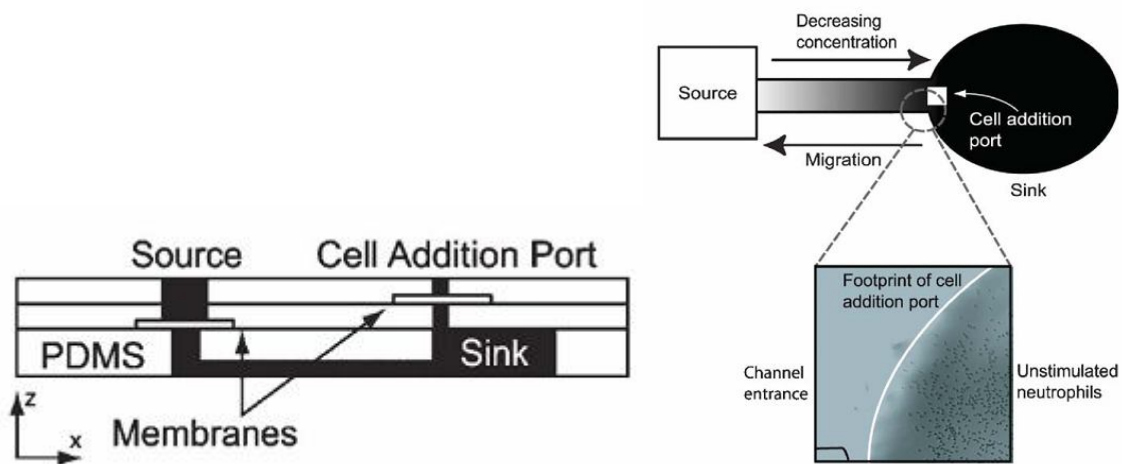


Figura 1.29 – Sezione trasversale del Nanopore Gradient Generator (sinistra) e schema di migrazione delle cellule all'interno del dispositivo (destra). [Keenan et al., 2008]

Un altro dispositivo in grado di generare gradienti di concentrazione tempo-varianti è rappresentato dal *Microvalve Chemotaxis Device* [Frevert et al., 2006]; come illustrato in figura 1.30 il gradiente si origina nello strato fluidico presente nella parte superiore mentre una sottile membrana elastomerica consente la separazione da microcanali pneumatici di controllo; quando viene generato il vuoto nello strato di controllo la membrana si flette portando in tal modo a contatto i liquidi presenti nello strato fluidico superiore.

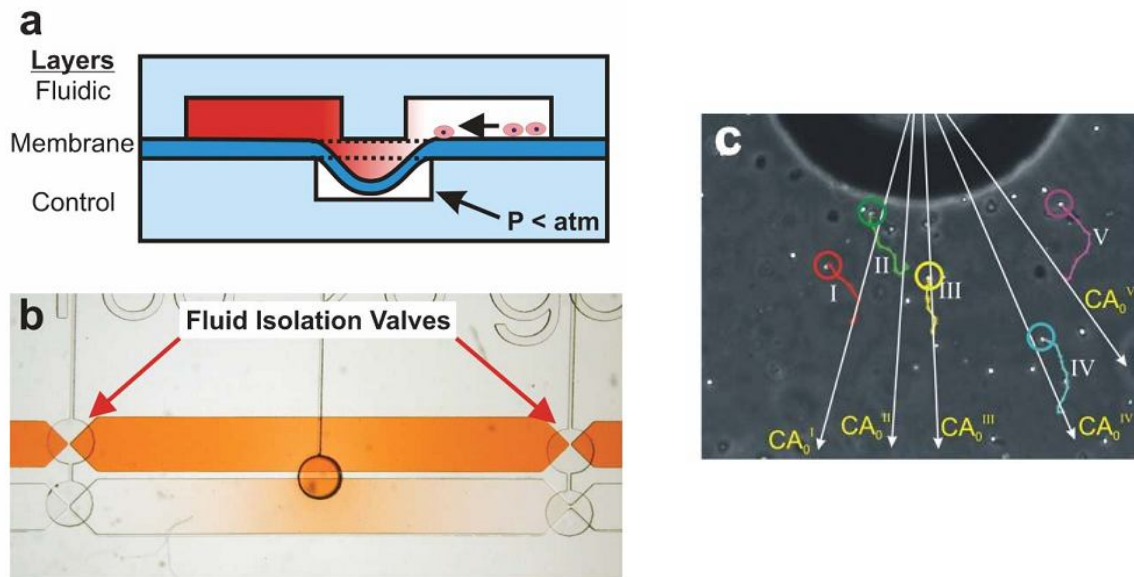


Figura 1.30 – Microvalve Chemotaxis Device: sezione trasversale del dispositivo (a), vista superiore in cui è possibile osservare la generazione di un gradiente di concentrazione di colorante rosso (b), microscopia a contrasto di fase di neutrofili umani sottoposti ad un gradiente di concentrazione di CXCL-8 con relative traiettorie colorate (c). [Keenan et al., 2008]

La terza classe di dispositivi microfluidici è caratterizzata dalla possibilità di generare gradienti di concentrazione tempo-invarianti su un'area adibita a colture cellulari, fornendo informazioni dettagliate e quantitative su come la distribuzione di biomolecole segnale possa influenzare il comportamento delle cellule in vitro. Il primo sottogruppo di dispositivi denominato *Parallel-Flow Gradient Generator* sfrutta la mancanza di miscelamento convettivo tra pacchetti fluidi adiacenti in condizioni di moto laminare; il mescolamento avviene per sola diffusione in direzione perpendicolare a quella del flusso per cui i gradienti chimici generati dipendono esclusivamente dalla composizione e dalla portata dei rispettivi flussi oltre che dal relativo tempo di contatto: si sottolinea come i gradienti di concentrazione risultino costanti fino al momento in cui portate e composizioni si mantengono fissate. Pendenza e caratteristiche del profilo di concentrazione possono essere modulate garantendo inoltre un controllo dinamico durante le prove sperimentali; principali svantaggi sono costituiti dalla necessità di mantenere un flusso costante (costi e sprechi elevati), dagli sforzi meccanici a cui le cellule sono sottoposte e dalla necessità di limitare l'analisi alla ridotta porzione iniziale dei canali dato il progressivo appiattimento del profilo di concentrazione. I più diffusi dispositivi appartenenti a questa classe sono certamente *T-Sensor*, *Premixer Gradient Generator* e *Universal Gradient Generator*. [Keenan et al., 2008]

I *T-Sensor* (figura 1.31) consistono in due o più microcanali uniti in una configurazione a T utilizzati per creare profili di concentrazione di varie specie chimiche, realizzare saggi biologici, studiare la chemotassi batterica ed infettare cellule con differenti tipologie di virus.

La perfusione costante applicata consente di evitare la diminuzione di nutrienti nonché l'accumulo di prodotti di scarto permettendo lunghi periodi di coltura cellulare.

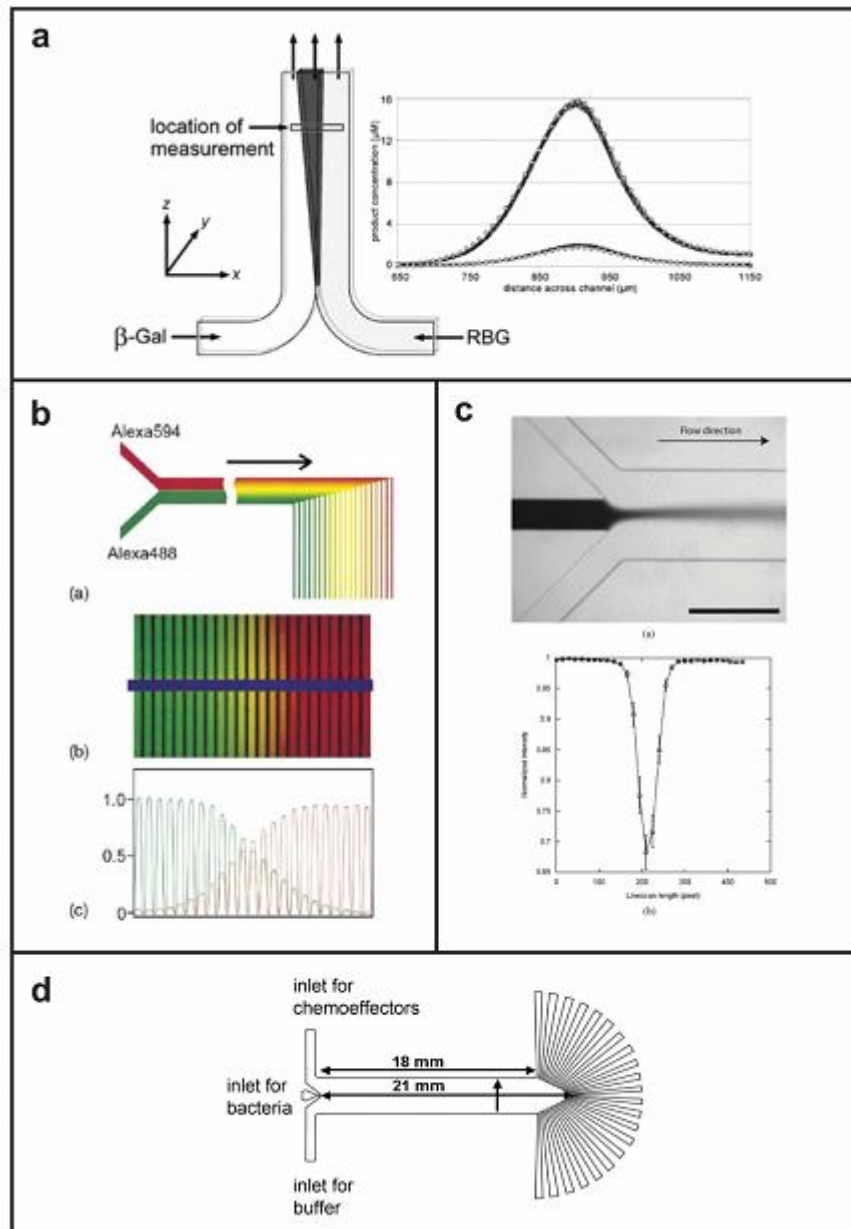


Figura 1.31 – Schema di un dispositivo *T-Sensor* con profilo di fluorescenza generato dalla interdiffusione di β -galattosidasi e relativo substrato RBG (a), miscelatore sviluppato da Holden et al. (2003) (b), dispositivo utilizzato per infettare una popolazione cellulare con un gradiente di concentrazione di baculovirus da Walker et al. (2004) (c) e sistema utilizzato per lo studio della chemotassi batterica (d). [Keenan et al., 2008]

Il *Premixer Gradient Generator* [Jeon et al., 2000] si basa sulla possibilità di suddividere e ricombinare in modo ottimale i flussi in ingresso attraverso un *mixer* posto a monte del microcanale consentendo in tal modo di generare profili di concentrazione più complessi rispetto al modello precedentemente descritto; tuttavia la presenza della rete piramidale di miscelamento comporta un sensibile incremento del volume di *priming* del dispositivo oltre che del tempo necessario per qualsiasi modifica dinamica del gradiente (figura 1.32).

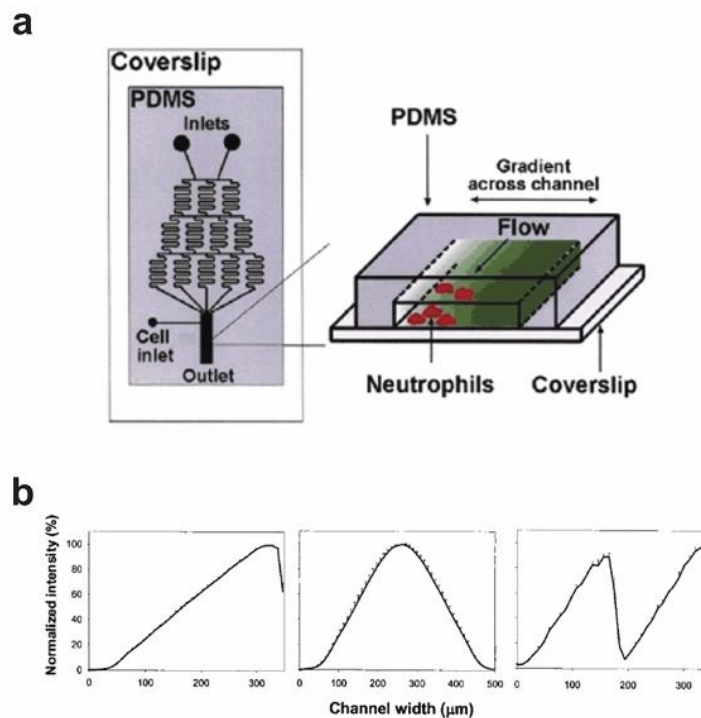


Figura 1.32 – Schema del dispositivo (a) e profili di concentrazione ottenibili mediante modifiche della rete di miscelazione (b). [Keenan et al., 2008]

Il modello “*Universal Gradient Generator*” (figura 1.33) sviluppato da Irimia et al. (2006) utilizza una serie di barriere fisiche per controllare la diffusione di specie chimiche tra pacchetti fluidi adiacenti; modificando la posizione dei separatori inseriti è possibile generare profili di concentrazione esponenziali, polinomiali del quinto ordine, radici cubiche e probabilmente di molteplici altre forme ampliando le tipologie di prove sperimentali realizzabili sulle cellule.

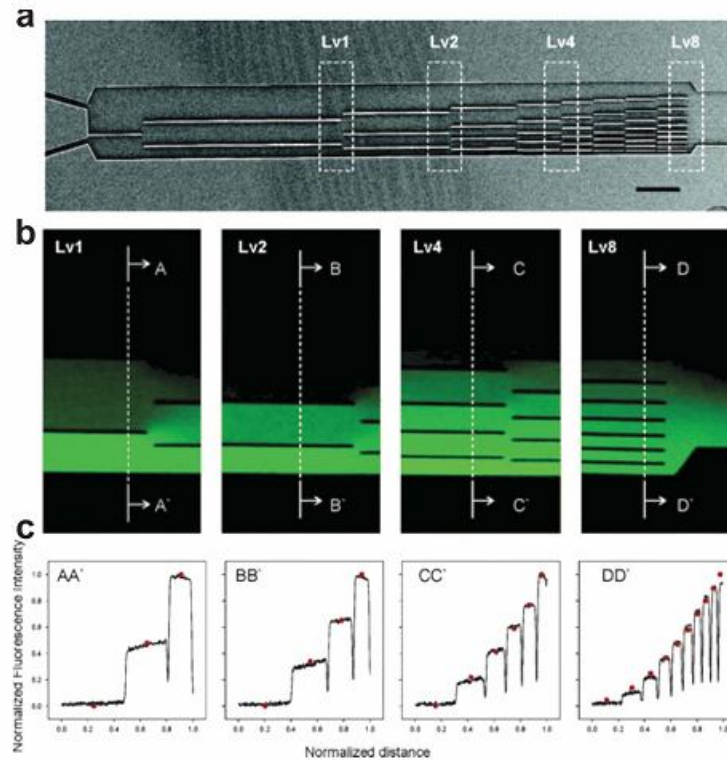


Figura 1.33 – Microscopia a scansione elettronica del dispositivo (a), immagini in fluorescenza della distribuzione di FITC (b) e relativi profili di concentrazione rilevati in corrispondenza delle linee tratteggiate (c). [Keenan et al., 2008]

La seconda sottoclasse di dispositivi denominata *Flow-Resistive Gradient Generator* utilizza elementi resistivi posti tra la sorgente di biomolecole e i fluidi per minimizzare o eliminare la convezione che potrebbe alterare o danneggiare il gradiente di concentrazione: il trasporto diffusivo è dominante risultando in un profilo di concentrazione stabile tra *source* e *sink reservoirs*.

Le due principali strategie in grado di minimizzare gli effetti convettivi sono rappresentate dalla connessione tra *source* e *sink* mediante una camera riempita con idrogeli o dalla possibilità di utilizzare sottili fessure e microcanali.

Il numero di *Péclet* (**Pe**) identifica il rapporto tra un termine di trasporto convettivo ed uno di tipo diffusivo e viene espresso dalla seguente equazione:

$$Pe = \frac{A \cdot v}{D} \quad [1.2]$$

in cui **v** rappresenta la velocità di scorrimento del fluido, **D** il coefficiente di diffusione della specie chimica ed **A** la dimensione caratteristica del condotto; un numero di *Péclet* elevato indica un trasporto prevalentemente convettivo, al contrario un valore inferiore all'unità denota un trasporto prevalentemente diffusivo. E' possibile osservare come gli idrogeli eliminino totalmente qualsiasi

flusso a causa del lungo e tortuoso percorso attraverso la densa matrice polimerica mentre la presenza di fessure pur non essendo in grado di eliminare completamente la convezione garantisce numeri di *Péclet* sotto l'unità. I generatori che implementano tali soluzioni non richiedono complesse apparecchiature (es. pompe a siringa computer-controllate), sono facili da progettare e costruire, possono creare stabili gradienti su camere per colture cellulari di lunghezza arbitraria, consumano meno reagenti rispetto ai dispositivi *Parallel-Flow* e possono essere utilizzati per generare gradienti sovrapposti di diverse biomolecole; il principale svantaggio risiede nella difficoltà di produrre complessi profili di concentrazione e nel fatto che necessitano di quantità di reagenti superiori rispetto a quelle dei dispositivi "tradizionali". [Keenan et al., 2008]

Un modello di dispositivo che utilizza idrogeli stabilizzanti è mostrato in figura 1.34.

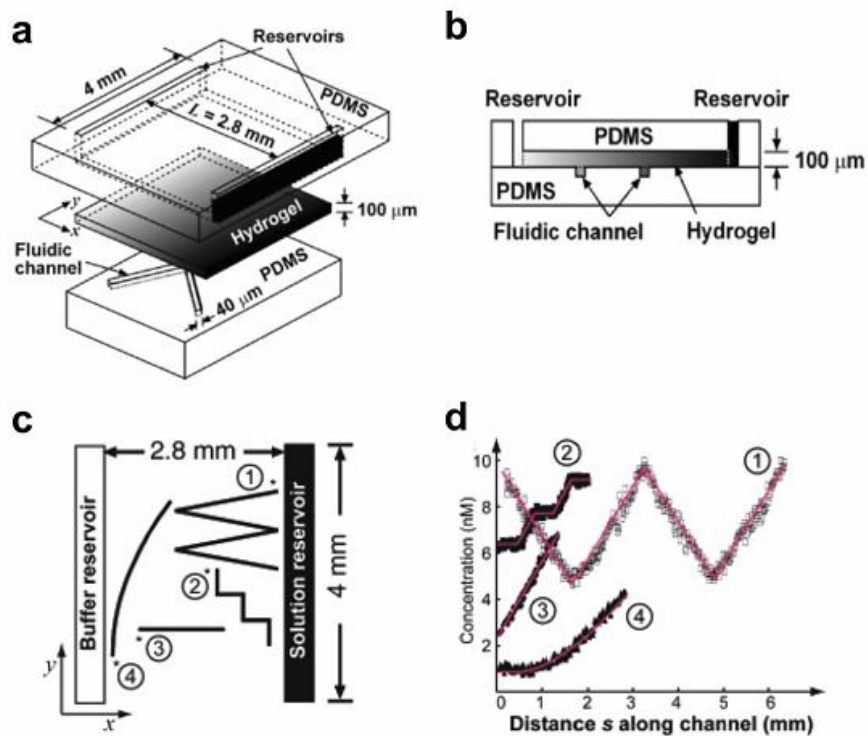


Figura 1.34 – Schema tridimensionale del dispositivo (a), sezione trasversale (b), vista superiore (c) e profili di concentrazione ottenibili (d). [Keenan et al., 2008]

La cavità presente nel secondo strato viene riempita mediante una soluzione di agarosio in grado di gelificare; i *reservoirs* vengono successivamente caricati con i fluidi necessari causando la formazione del gradiente di concentrazione all'interno del gel; le biomolecole diffondono gradualmente nei microcanali in cui sono presenti le cellule creando un profilo di concentrazione che dipende semplicemente dal percorso che i condotti assumono sotto lo strato di agarosio.

Il *Cross Channel Gradient Generator* (figura 1.35) sviluppato da Paliwal et al. (2007) utilizza sottili canali incrociati o *test chambers* (5 μm profondità, 200 μm lunghezza) per collegare fra loro micro canali paralleli (25 μm profondità) continuamente perfusi con fluidi di *source* e *sink*; bilanciando la pressione nei canali di *source* e *sink* è possibile generare gradienti di concentrazione all'interno delle *test chambers* utilizzabili per studiare la risposta chemotattica di cellule eucariote o batteri.

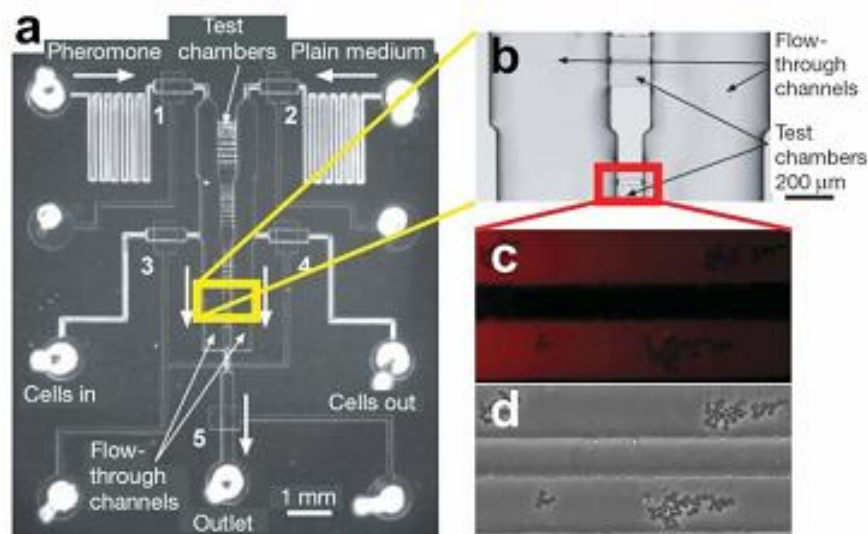


Figura 1.35 – Vista superiore del dispositivo (a), particolare relativo alle *test chambers* in grado di connettere i microcanali di *source* e di *sink* (b), e migrazione di *S. Cerevisiae* in risposta ad un gradiente di feromone (c,d). [Keenan et al., 2008]

Una interessante modifica è quella proposta da Li e colleghi (2007): adiacente al canale di *sink* è presente un *array* di cavità che si portano in una condizione di equilibrio chimico con il fluido contenuto nel canale; alterando la lunghezza dei canali trasversali è possibile creare gradienti di concentrazione lineari, esponenziali e logaritmici (figura 1.36).

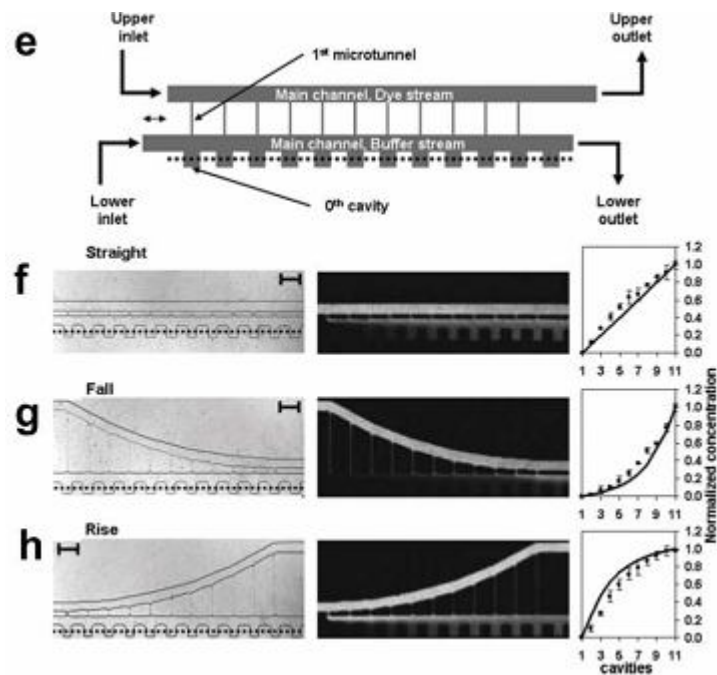


Figura 1.36 – Vista superiore del dispositivo sviluppato da Li e colleghi nel 2007 (e) in grado di generare gradienti di concentrazione lineari (f), esponenziali (g) e logaritmici (h). [Keenan et al., 2008]

L'utilizzo di dispositivi microfluidici per la generazione di gradienti non si è ancora affermato su vasta scala nella comunità dei biologi: le principali cause spaziano dalla difficoltà di progettazione e microfabbricazione allo specifico equipaggiamento richiesto per un funzionamento ottimale; il disegno di nuovi dispositivi risponde necessariamente alle esigenze che determinati gruppi di biologi evidenziano discutendo con team di ingegneri limitando in tal modo l'impiego di queste tecnologie. La sempre più elevata presenza di personale specifico nei laboratori di ricerca e la decentralizzazione degli strumenti di fabbricazione potranno contribuire nell'immediato futuro a ridurre la soglia di diffusione rendendo tali dispositivi di uso comune. [Keenan et al., 2008]

1.2.2 Applicazioni microfluidiche

Nel campo della biologia le colture cellulari rappresentano un importante metodo sperimentale per la scoperta di nuovi farmaci e terapie; questi saggi sono generalmente condotti mediante piastre multi pozzetto richiedendo un notevole dispendio di tempo da parte dei tecnici di laboratorio e portando molto spesso alla generazione di errori a causa dell'uso di micropipette e altri dosatori manuali.

I dispositivi microfluidici sono potenzialmente in grado di risolvere questi problemi generando svariate tipologie di profili di concentrazione di diverse specie chimiche in modo semiautomatico. I requisiti che una rete microfluidica deve rispettare sono: la possibilità di mantenere un gradiente di concentrazione per tempi significativi; una elevata compattezza; stabilità in presenza di differenti portate e la possibilità di generare i profili di concentrazione richiesti.

Una delle principali tipologie di dispositivi è rappresentata dalle reti piramidali in cui i fluidi vengono ripetutamente suddivisi e miscelati fino all'ottenimento delle concentrazioni desiderate. Alcuni problemi che affliggono le reti piramidali sono la mancanza di compattezza con la superficie occupata che aumenta con il quadrato del numero di uscite presenti e l'elevata influenza che la portata può avere sulla generazione del gradiente: elevate portate implicano insufficiente miscelamento mentre portate eccessivamente ridotte possono innescare indesiderati fenomeni diffusivi tra pacchetti fluidi adiacenti.

Una alternativa a questa tipologia di dispositivi è rappresentata dai metodi di diluizione seriale: la superficie occupata incrementa in modo proporzionale con il numero di uscite portando teoricamente ad una maggiore compattezza rispetto alle reti piramidali; l'impiego di *micromixer* per un miscelamento ottimale porta tuttavia ad un incremento nelle dimensioni effettive limitando le possibilità di miniaturizzazione [Hattori et al., 2009].

Il dispositivo realizzato da Hattori et al. (figura 1.37) si inserisce nell'ambito delle diluizioni seriali attraverso l'utilizzo di microcanali dotati di opportune resistenze in grado di portare alla generazione di profili di concentrazione lineari o logaritmici su tre ordini di grandezza all'interno di otto pozzetti di coltura.

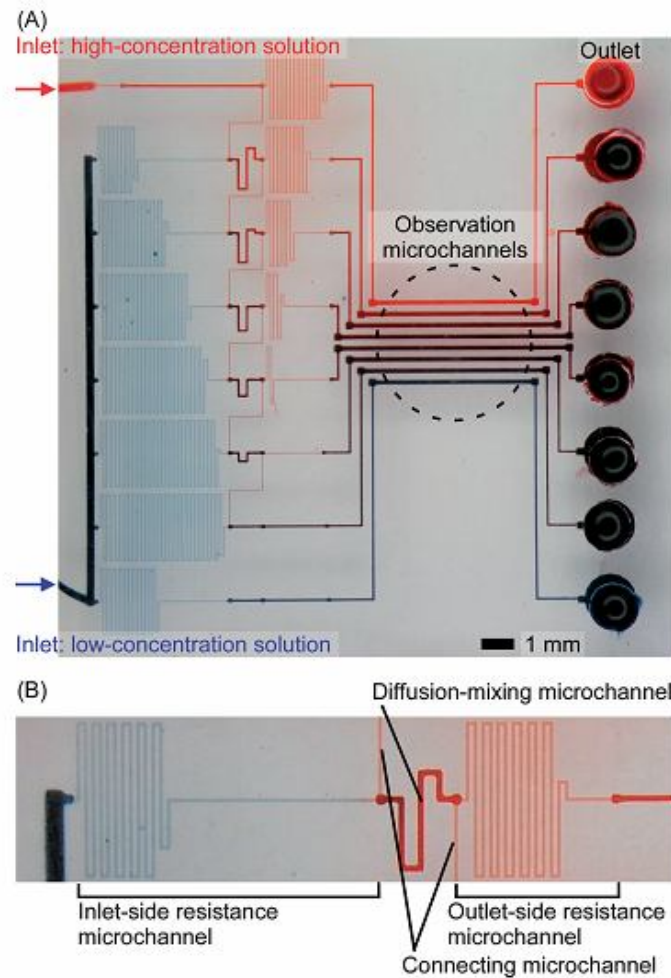


Figura 1.37 – Immagini in microscopia ottica del sistema microfluidico; rappresentazione dell’intera rete di microcanali (a) e particolare relativo al processo di miscelamento (b). [Hattori et al., 2009]

La rete microfluidica è costituita da sottili condotti dotati di alta resistenza fluidodinamica per ingressi, uscite e connessioni con sezioni comprese tra 160 e $720 \mu\text{m}^2$ e da canali diffusivi con sezioni comprese tra 3600 e $17000 \mu\text{m}^2$ realizzati in polidimetilsilossano mediante fotolitografia multistrato e *replica molding*. I profili di concentrazione desiderati possono essere ottenuti progettando in modo ottimale le dimensioni e la geometria dei microcanali resistivi: il gradiente di concentrazione lineare (ottenuto con un sistema a perfusione continua) di una piccola molecola come la calceina si è rivelato stabile nel *range* di portate 0.009 - $0.23 \mu\text{l}/\text{min}$.

La microfabbricazione e le tecnologie microfluidiche rappresentano la nuova frontiera nei campi della biosensoristica e della ricerca di nuovi farmaci; l’elevato controllo dei fluidi, la possibilità di progettare geometrie con dimensioni paragonabili a quelle delle cellule, la capacità di creare un ambiente tridimensionale simile a quello biologico rappresentano solo alcuni dei vantaggi offerti dai

nuovi dispositivi [Hung et al., 2005]. Partendo da tali presupposti Hung e colleghi si sono concentrati sulla realizzazione di *array* per colture cellulari a lungo termine in grado di mantenere un microambiente stabile e di consentire un monitoraggio costante delle cellule (figure 1.38 e 1.39).

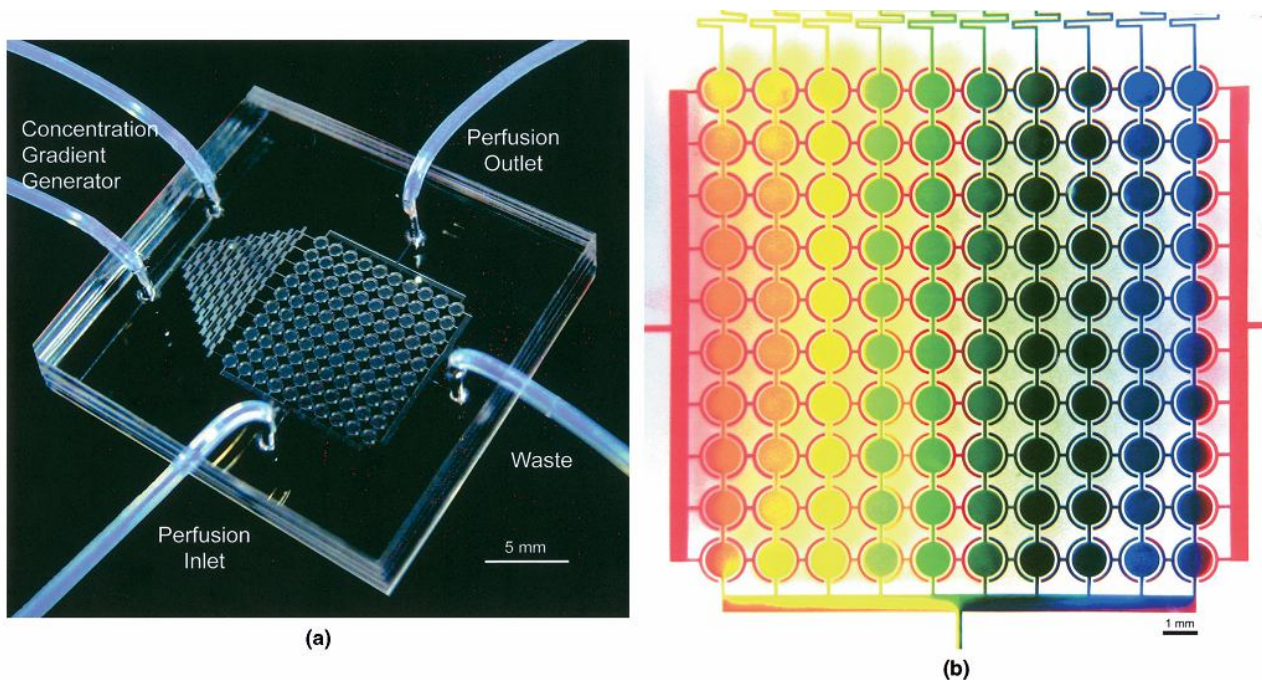


Figura 1.38 – Array per colture cellulari dotato di sistema di diluizione piramidale e di sistema di perfusione (a). Gradiente di concentrazione generato dall’inserimento di colorante giallo e blu nei due ingressi del sistema di diluizione piramidale; colorante rosso utilizzato per il preliminare riempimento dei pozzetti (b). [Hung et al., 2005]

L'*array* realizzato può ospitare fino a 100 diversi esperimenti sulle cellule in parallelo; il gradiente di concentrazione viene realizzato mediante un sistema di miscelamento piramidale mentre opportuni canali larghi 50 μm e profondi 40 μm garantiscono l’apporto costante di sostanze nutritive e l’eliminazione dei prodotti di scarto. La singola unità funzionale mostrata nella figura sottostante è costituita da una microcamera circolare di 1 mm di diametro e 40 μm di profondità dotata di quattro ingressi con un sistema di distribuzione radiale mediante canali di perfusione del mezzo di coltura profondi 2 μm e larghi 5 μm . L'*array* microfluidico può essere utilizzato per l’analisi dell’influenza che diversi componenti del mezzo di coltura, valori di pH, indice di perfusione possono avere sull’espressione genica delle cellule e di quanto la variazione di portata possa modulare i processi di duplicazione (alte portate implicano elevati sforzi di taglio, basse portate possono condurre ad un trasferimento di massa troppo esiguo). La possibilità di inserire biosensori enzimatici per monitorare il metabolismo cellulare e la presenza di valvole in grado di regolare in modo ottimale i flussi potrebbero incrementare sensibilmente le potenzialità del dispositivo.

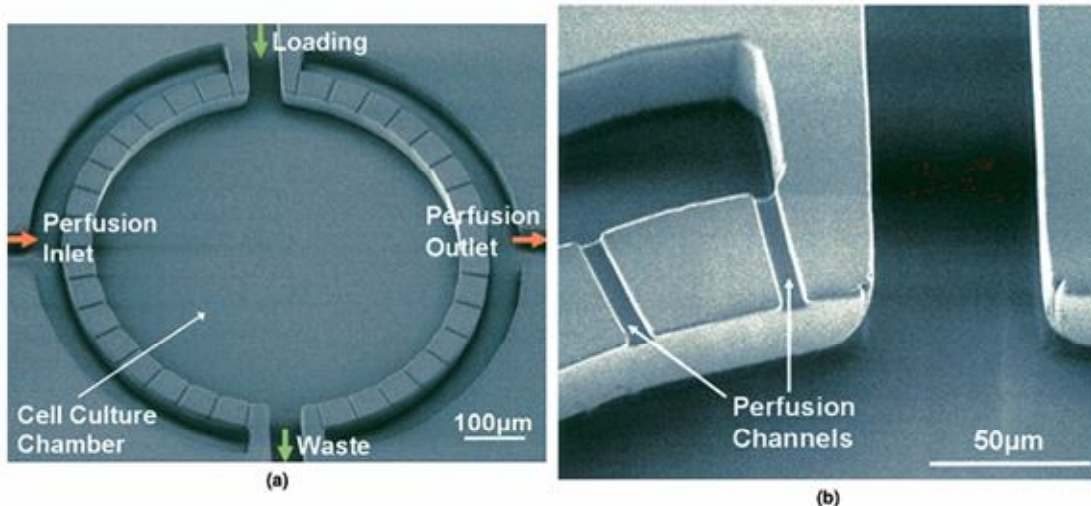


Figura 1.39 – Microscopie elettroniche relative alla singola camera di coltura (a) e ai canali di perfusione radiale presenti sulla circonferenza della stessa (b). [Hung et al., 2005]

Un ulteriore esempio di dispositivo presente in letteratura dotato di un sistema di miscelamento piramidale è quello proposto da Chudy et al. (2009) con il quale è possibile generare profili di concentrazione lineari (figura 1.40); la rete è dotata di 25 pozzetti di coltura e di un sistema attraverso il quale è possibile inserire le cellule. Da sottolineare come le ultime due tecnologie presentate siano dotate di pozzetti di coltura disposti in cascata sollevando quindi numerosi interrogativi sull'eventuale accumulo di prodotti di scarto nelle microcamere a valle, in particolare in condizioni di perfusione continua.

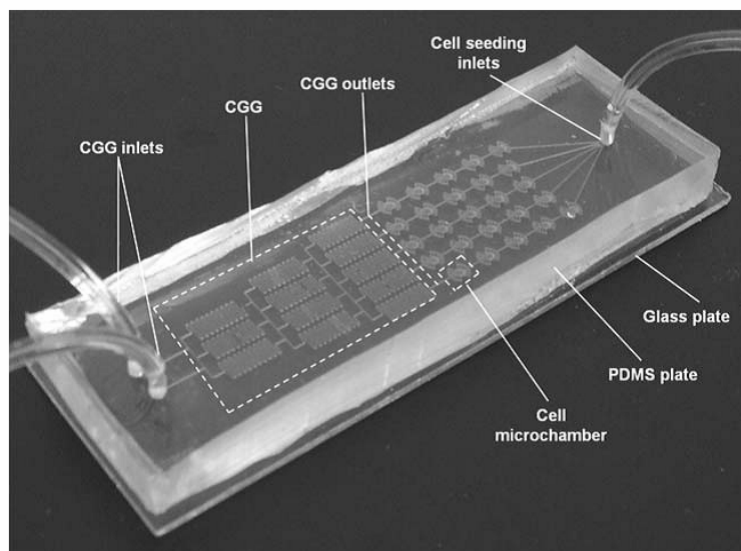


Figura 1.40 – Sistema per colture cellulari integrato con generatore di gradiente di concentrazione. [Chudy et al., 2009]

L'utilizzo di dispositivi microfluidici si sta progressivamente affermando nel campo della ricerca di nuovi farmaci ed in particolare nella selezione delle molecole che verranno utilizzate per la sintesi di nuovi composti chimici con potenziale applicabilità in svariate patologie [Ye et al., 2007]; Ye e colleghi hanno sviluppato uno strumento in grado di realizzare analisi multiparametriche sulla risposta cellulare: il dispositivo è costituito da otto generatori di gradiente piramidali ciascuno con otto diversi livelli di farmaco e da colonne di tre camere di coltura poste in cascata (figura 1.41). I processi di diffusione e diluizione del farmaco, coltura cellulare alla microscala, stimolazione cellulare e marcatura/analisi risultano perfettamente integrati fornendo ai biologi la possibilità di automatizzare e ingegnerizzare le prove di coltura e di ricavare in modo semplice importanti parametri di interesse tra cui permeabilità della membrana citoplasmatica, dimensioni del nucleo cellulare, potenziale transmembrana mitocondriale e stato di ossidoriduzione intracellulare a seguito del trattamento mediante farmaci anti cancro in grado di indurre l'apoptosi delle cellule tumorali. La piattaforma è in grado di consentire la rapida estrazione di molteplici informazioni sul metabolismo cellulare in risposta a diversi farmaci e differenti concentrazioni e allo stesso tempo limitare gli sprechi di campioni e mezzo di coltura.

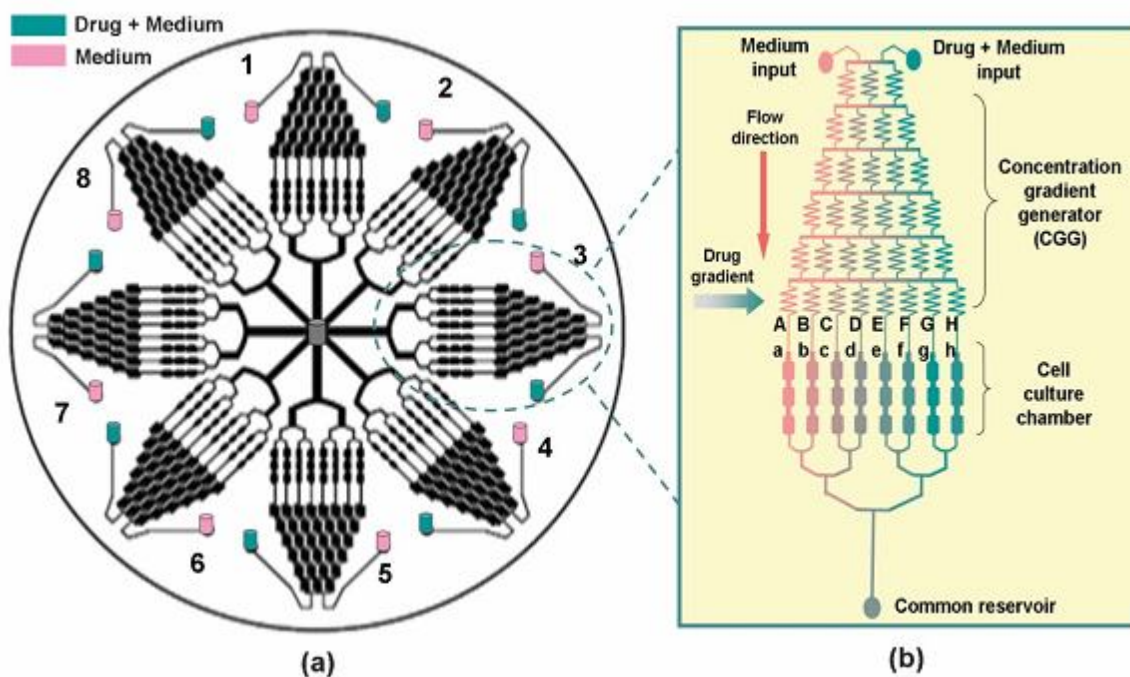


Figura 1.41 – Schema generale del dispositivo (a) e dettaglio relativo ad una singola unità strutturale (b). [Ye et al., 2007]

Come mostrato in figura 1.41b il sistema di generazione di gradiente piramidale è collegato alle camere di coltura, con dimensioni caratteristiche $1000\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$, da canali lunghi $2000\ \mu\text{m}$ e larghi $75\ \mu\text{m}$ in modo da evitare che durante la fase di caricamento da un *reservoir* le cellule possano entrare all'interno della rete microfluidica; i processi diffusivi all'interno dei microcanali consentono di generare un profilo di concentrazione lineare. La diluizione piramidale viene ritenuta un valido strumento per la generazione di profili lineari sebbene comporti numerosi *step* di miscelamento; da sottolineare come le camere di coltura siano di dimensioni ridotte limitando quindi il numero di cellule coltivabili e analizzabili in ciascun pozzetto ma allo stesso tempo evitando inutili sprechi.

Un'ulteriore interessante applicazione è rappresentata dal microbioreattore realizzato da Lee et al. (2006) utilizzato per condurre test su cellule di linea HeLa; un sistema di generazione di gradiente basato su due ingressi e su mescolamenti successivi analogo a quelli sviluppati da numerosi altri gruppi di ricerca consente l'alimentazione di un sistema di 64 pozzetti di coltura con un volume di 3 nL (figura 1.42).

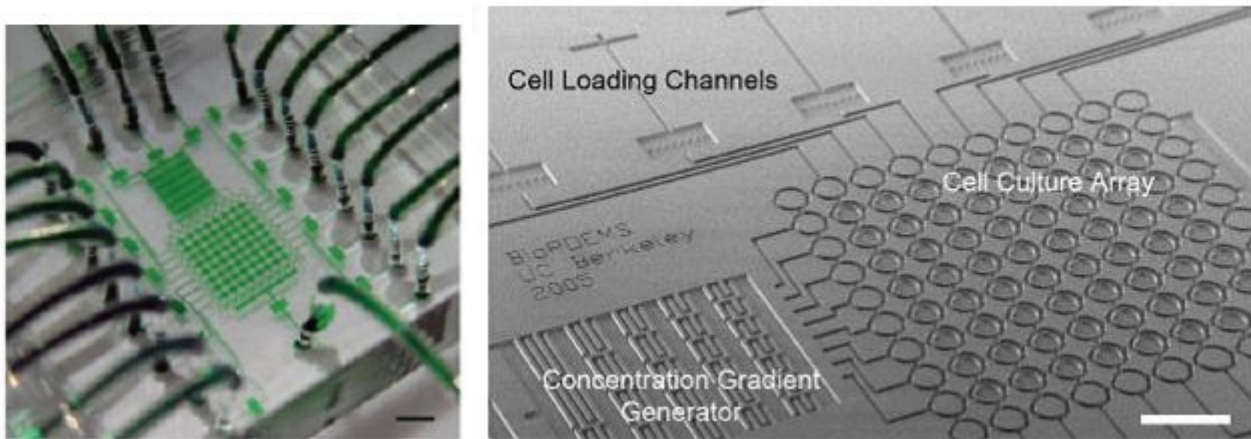


Figura 1.42 – Dispositivo microfluidico per biologia cellulare dotato di 64 camere di coltura e di un sistema di generazione di gradiente di concentrazione; la barra presente nel margine inferiore indica 2 mm (sinistra). Microscopia a scansione elettronica del sistema in PDMS; la barra nel margine inferiore indica 1 mm (destra). [Lee et al., 2006]

L'aspetto innovativo è costituito dalla strutturazione delle singole camere di coltura, caratterizzate da una forma ad anello aperto (forma a C) che disaccoppia la zona di coltura centrale dai canali di alimentazione esterni; il *layout* della camera è pensato, secondo gli sviluppatori, per imitare la condizione fisiologica dei tessuti in cui il nutrimento delle cellule avviene per diffusione attraverso

gli spazi interstiziali in condizioni di ridotto *shear stress* (a livello teorico tale processo è descritto in modo dettagliato dal modello di *Krogh*).

Come mostrato nell'immagine in figura 1.43 l'anello a C è costituito da un microcanale largo 20 μm e profondo 2 μm con un'apertura di 50 μm per consentire il caricamento delle cellule; il canale esterno è caratterizzato da una larghezza di 50 μm e da un analogo valore di profondità.

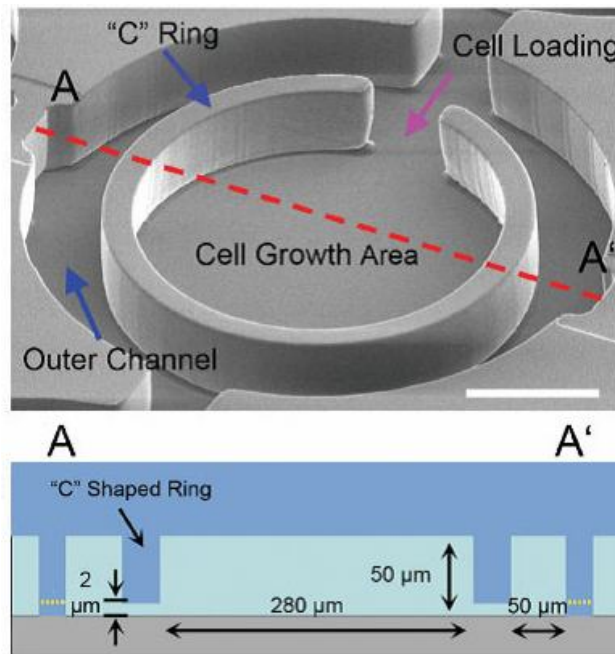


Figura 1.43 – Microscopia a scansione elettronica della singola camera di coltura; la barra presente nel margine inferiore indica 100 μm (sopra); sezione trasversale della camera di coltura (sotto). [Lee et al., 2006]

Il sistema è stato modellizzato mediante una rete resistiva utilizzando la relazione di *Poiseuille*:

$$\Delta P = Q \cdot R \quad R = \frac{12 \cdot \mu \cdot \ell}{w \cdot h^3} \quad [1.3]$$

in cui ΔP rappresenta la caduta di pressione ai capi del condotto, Q la portata volumetrica, R la resistenza fluidodinamica, μ la viscosità del fluido, ℓ la lunghezza del microcanale, w la larghezza ed h la profondità.

Lee e colleghi hanno dimostrato come la velocità media fosse nella zona di coltura circa 250 volte inferiore rispetto al valore rilevato nel microcanale esterno di alimentazione (figura 1.44).

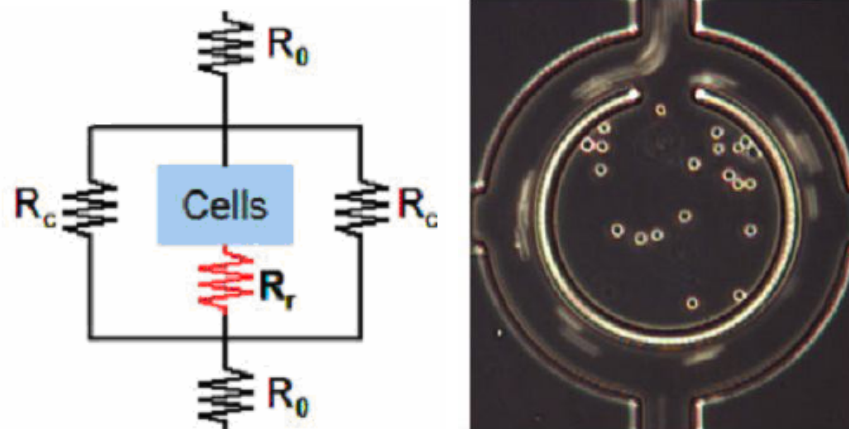


Figura 1.44 – Equivalente elettrico della camera di coltura in cui R_0 rappresenta la resistenza dei canali di ingresso e uscita, R_C la resistenza dei due condotti semicircolari ed R_R la resistenza della struttura ad anello (sinistra). Microscopia ottica del pozzetto di coltura (destra). [Lee et al., 2006]

L'apertura di soli $2\ \mu\text{m}$ al di sotto dell'anello evita la fuoriuscita delle cellule presenti nella camera in quanto di dimensioni notevolmente inferiori rispetto al diametro medio di una comune cellula eucariote; il sistema di resistenze (il rapporto tra R_C ed R_R è indipendente dalla portata come dimostrato sperimentalmente) può essere modificato alterando la geometria della camera: il rapporto tra le resistenze consente dunque la modulazione di importanti parametri quali velocità, sforzi di taglio, numero di *Péclet*, *turnover* del mezzo di coltura. La novità proposta da Lee risiede dunque nella possibilità di simulare i fenomeni di trasporto presenti in vivo: la camera di coltura centrale rappresenta le unità tessutali mentre la diffusione attraverso gli spazi interstiziali è rappresentata dal moto delle molecole di soluto attraverso il sottile canale presente sotto l'anello. Il dispositivo è realizzato in PDMS, materiale molto utilizzato per la costruzione di dispositivi microfluidici che includono uno spazio di coltura data l'elevata biocompatibilità, la permeabilità ai gas e la trasparenza ottica.

Un altro interessante dispositivo sviluppato a scopo di ricerca è quello proposto da Chung et al. (2005) pensato per l'ottimizzazione del processo di proliferazione e differenziazione di cellule staminali neuronali; la piattaforma sviluppata espone le cellule ad un gradiente di concentrazione di fattori di crescita in flusso continuo minimizzando in tal modo il *signaling* autocrino e paracrino cioè i meccanismi di comunicazione intercellulare garantiti da molecole segnale prodotte dalle cellule. La proliferazione ed il differenziamento delle cellule staminali in astrociti sono stati monitorati durante l'intero periodo di coltura osservando una diretta dipendenza dal profilo di concentrazione di fattori di crescita (GF) cui le cellule erano sottoposte; il legame tra grado di differenziamento cellulare e gradiente di concentrazione è stato confermato da analoghi risultati

ottenuti sia con prove di coltura all'interno di camere di controllo nel dispositivo che in tradizionali piastre multipozzetto. Come visibile in figura 1.45 la camera di generazione del gradiente è alimentata da tre diversi ingressi: la modulazione dei livelli di concentrazione consente di alterare la morfologia del profilo generato a valle. Nell'esperimento condotto da Chung è stato generato un gradiente polinomiale (ax^2+b) caricando i primi due ingressi con mezzo di coltura ed il terzo con fattori di crescita. I risultati raccolti dimostrano come le cellule staminali presentino un ritmo proliferativo direttamente proporzionale alla concentrazione di fattori di crescita e al contrario una capacità di differenziazione in astrociti superiore in presenza di ridotte quantità di GF.

La principale differenza con i dispositivi presentati nelle pagine precedenti risiede nella presenza di una singola camera di coltura, larga 2.4 mm e profonda 100 μm , in cui le cellule sono sottoposte gradualmente ad una variazione di concentrazione del soluto; la portata considerata, ottimizzata per consentire la diffusione ed il corretto miscelamento delle specie presenti, è stata di 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ mentre il valore di *shear stress* cui le cellule sono state sottoposte è stato mantenuto inferiore rispetto al valore critico sperimentato dalle cellule endoteliali durante condizioni di flusso fisiologiche.

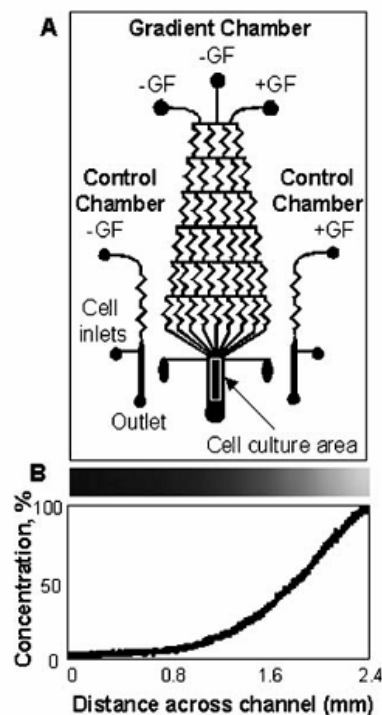


Figura 1.45 – (a) Disegno schematico del dispositivo microfluidico; (b) profilo di concentrazione generato nella camera di coltura. [Chung et al., 2005]

Yamada e colleghi (2006) si discostano dai modelli presentati nelle pagine precedenti del capitolo realizzando un dispositivo compatto, efficace e innovativo: due fluidi miscibili vengono introdotti attraverso due ingressi separati e speculari e suddivisi attraverso una rete di microcanali; la rete di

distribuzione dei due fluidi si combina in corrispondenza di specifici punti di confluenza in cui inizia il processo di mescolamento; la lunghezza dei canali di distribuzione e la posizione del punto di confluenza determinano il rapporto di miscelamento indipendentemente dalle condizioni di flusso.

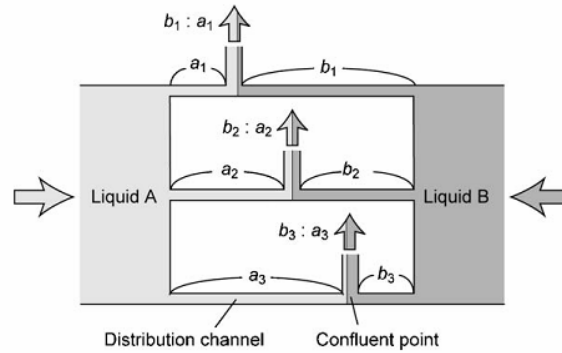


Figura 1.46 – Principio di generazione del gradiente di concentrazione: dette a e b le lunghezze dei canali di distribuzione il rapporto di miscelazione è b/a . [Yamada et al., 2006]

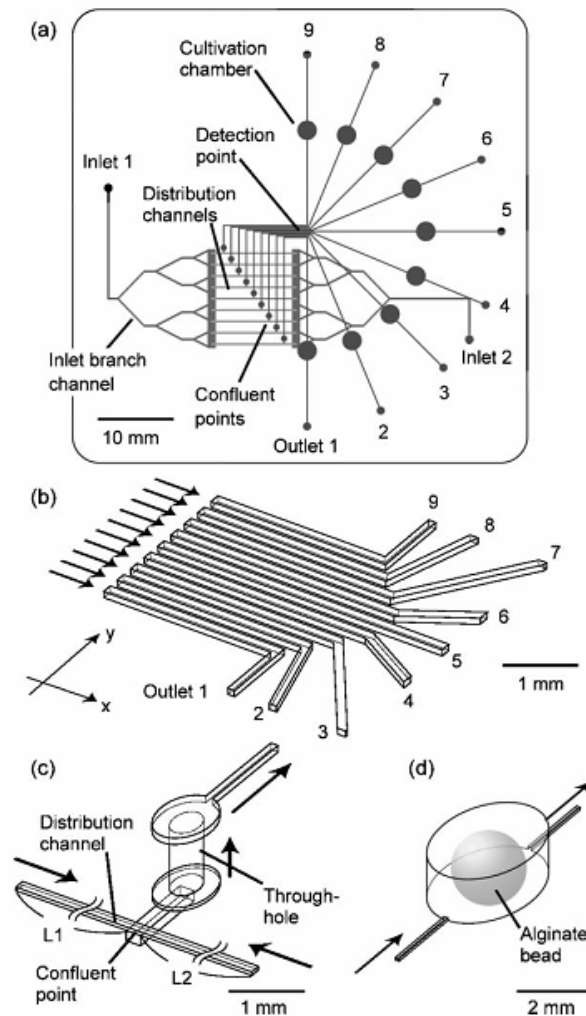


Figura 1.47 – (a) Schema generale del dispositivo, (b) ingrandimento del *detection point*, (c) ingrandimento del punto di confluenza, (d) ingrandimento della camera di coltura. [Yamada et al., 2006]

Utilizzando un equivalente elettrico, tenendo conto del fatto che la viscosità dei due fluidi è identica, che le portate erogate dalle due pompe a siringa sono equivalenti ed infine che la larghezza e la profondità dei canali sono uguali nei due sistemi distributivi è possibile concludere che la resistenza di ogni microcanale sia dipendente unicamente dalla lunghezza; il rapporto di miscelamento dei due liquidi in corrispondenza del punto di confluenza è quindi inversamente proporzionale al rapporto tra le lunghezze dei canali di miscelamento (figura 1.46).

Come visibile dall'immagine in figura 1.47 sono stati inseriti nove micropozzetti di coltura a valle dei punti di confluenza; la validazione del dispositivo è stata effettuata mediante test colorimetrici. La realizzazione tecnica prevede la presenza dei canali di distribuzione sulla superficie inferiore del piano intermedio e della rete di distribuzione sulla superficie superiore del piano di base; i canali di *detection* e le microcamere di coltivazione sono disposti sul livello superiore del dispositivo. I canali di distribuzione presentano una lunghezza compresa tra 1 e 9 mm mentre la profondità risulta di $21 \pm 0.5 \mu\text{m}$; il mantenimento di una profondità uniforme risulta di importanza fondamentale per la generazione del corretto profilo di concentrazione; la profondità dei canali di *detection* è compresa tra 160 e 170 μm mentre i canali di ingresso presentano una profondità di 60 μm ; le microcamere di coltura sono caratterizzate da un diametro di 2.5 mm. I test colorimetrici sono stati effettuati con una soluzione acquosa di blu metilene con concentrazione 1 mM; come evidente dalla figura 1.48 che si riferisce al punto di controllo è possibile osservare la dipendenza del processo diffusivo dalla portata impostata sulla pompa a siringa: in presenza di basse portate il segnale risulta uniforme lungo tutta la larghezza del canale; al contrario con portate elevate è riscontrabile un segnale non omogeneo a causa dell'alterazione della cinetica di diffusione.

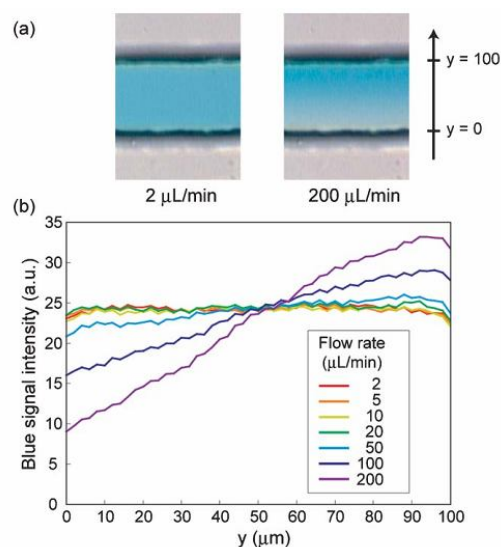


Figura 1.48 – Intensità del segnale registrato nel canale 5 al variare della portata (a) e relativi grafici (b).
[Yamada et al., 2006]

Il principio teorico presentato da Yamada et al. è riproposto con alcune significative variazioni da Walker e colleghi (2007): a partire da due ingressi vengono realizzate nove linee di diluizione che consentono di generare un profilo di concentrazione lineare nel *range* di portate 0.5-16 $\mu\text{l}/\text{min}$; come nel dispositivo precedentemente illustrato la resistenza dei microcanali viene controllata variando il parametro lunghezza consentendo in tal modo una modulazione delle portate volumetriche.

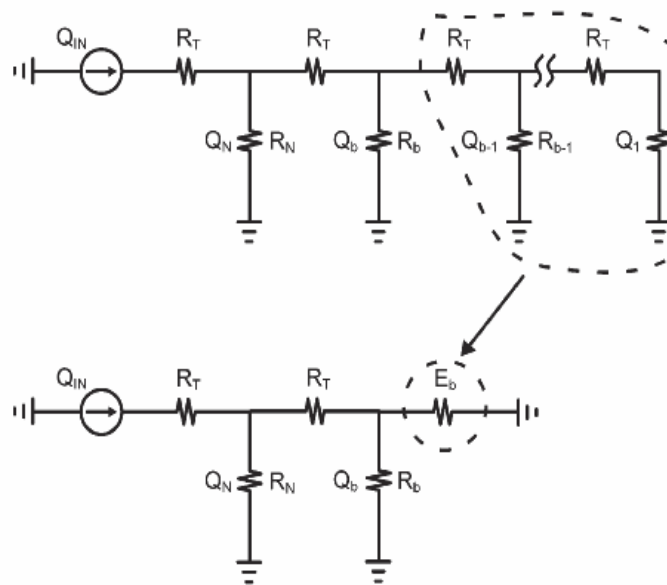


Figura 1.49 – Schema elettrico del circuito: le resistenze del sistema sono calcolate a partire da R_1 fino ad R_N ; ad ogni iterazione la rete resistiva a valle viene collassata in una resistenza equivalente E_B . [Walker et al., 2007]

In figura 1.49 è mostrato l'equivalente elettrico del circuito in cui a partire dalla resistenza R_1 è possibile risalire progressivamente alla resistenza R_N ; ad ogni iterazione la rete progettata a valle viene collassata in una resistenza equivalente E_B . Note le resistenze R_B è possibile procedere con il calcolo delle lunghezze secondo la relazione di *Poiseuille* ottimizzata per condotti a sezione rettangolare (si noti come le resistenze R_T poste tra i canali di distribuzione siano mantenute costanti). Terminata la progettazione di una rete è sufficiente creare un sistema speculare da posizionare su un livello superiore connesso al precedente mediante punti di confluenza come mostrato in figura 1.50.

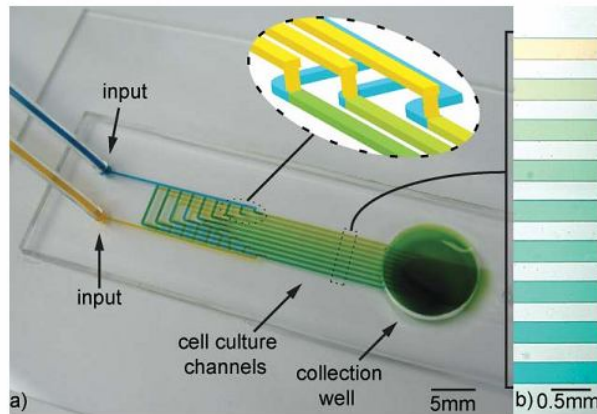


Figura 1.50 – Dispositivo assemblato caricato con coloranti blu e giallo (a); gradiente di concentrazione ottenuto (b). [Walker et al., 2007]

Le resistenze dei microcanali di distribuzione risultano ottimizzate affinché la portata complessiva sia sempre unitaria; da sottolineare infine come a valle dei punti di confluenza le resistenze fluidodinamiche siano progettate per evitare alterazioni nelle portate impostate. Tutti i canali presentano profondità di $100\ \mu\text{m}$ e larghezza di $300\ \mu\text{m}$ e terminano in un'unica camera di coltura; ogni linea di diluizione ha a disposizione una superficie di circa $4.5\ \text{mm}^2$.

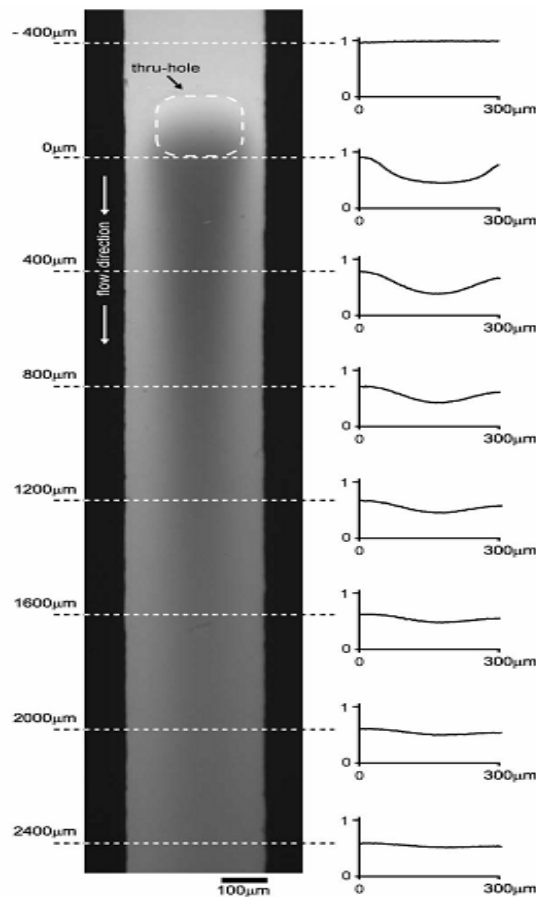


Figura 1.51 – Immagine in fluorescenza del canale di diluizione 0.5 e relativi grafici. [Walker et al., 2007]

La validazione del dispositivo è stata effettuata inserendo fluoresceina ed acqua distillata alla portata di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ nei due ingressi; in figura 1.51 è mostrata un'immagine in fluorescenza relativa alla diluizione 0.5 che evidenzia il progressivo processo diffusivo; da notare come la piattaforma sia in grado di generare profili di concentrazione lineari anche se i dati sperimentali si discostano dai modelli teorici in corrispondenza dei più ridotti valori di concentrazione probabilmente a causa di imperfezioni costruttive che alterano le resistenze e di conseguenza le portate.

La variazione delle portate impostate non influenza la generazione dei profili di concentrazione lineari anche se va sottolineato come un completo processo diffusivo richieda segmenti di spazio sempre maggiori in presenza di flussi molto elevati.

Mahto et al. (2008) e Tirella et al. (2008) hanno sviluppato due sistemi per la valutazione della citotossicità di diverse molecole rispettivamente su fibroblasti BALB 3T3 e mioblasti C2C12 di linea; il progetto di Mahto e colleghi (figura 1.52) prevede la generazione di un profilo sigmoidale di ioni cadmio (il sale utilizzato è cloruro di cadmio) all'interno di un unico condotto caratterizzato da due ingressi disposti in configurazione Y, con lunghezza 5 mm, larghezza 1 mm e profondità 100 μm .

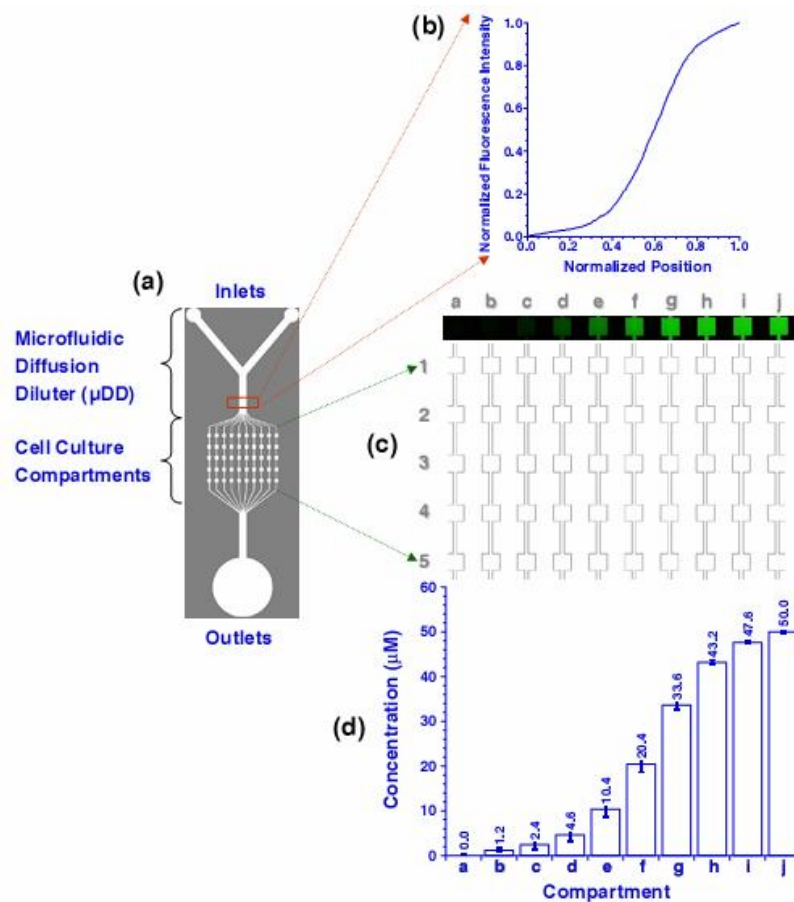


Figura 1.52 – Schema della rete di distribuzione (a), intensità di fluorescenza rilevata nel condotto principale con inserimento nei due ingressi di fluoresceina con concentrazioni 0 e 10 μM (b), camere di cultura (c) e concentrazione di ioni cadmio nei diversi compartimenti (d). [Mahto et al., 2008]

Una rete di dieci microcanali di distribuzione trasferisce il mezzo di coltura arricchito dagli ioni metallici a 50 camere di coltura con dimensioni $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ e profondità $100 \mu\text{m}$; i pozzetti sono disposti in serie a gruppi di cinque ed al loro interno le cellule sperimentano uno sforzo di taglio di soli 0.1 dyn/cm^2 , significativamente inferiore rispetto al valore critico in grado di inibire il processo di adesione.

Il gruppo di Tirella ha progettato una piattaforma in grado di generare un profilo di concentrazione sigmoidale utilizzando un sistema di diluizione piramidale basato sul modello realizzato originariamente da Whitesides e colleghi (Takayama et al., 1999); la piattaforma, mostrata in figura 1.53, prevede una serie di mescolamenti successivi fino alla generazione di sei canali entranti in un'unica camera di coltura con dimensioni caratteristiche 14.6 mm e 20 mm ; i canali di distribuzione presentano una larghezza di 1.6 mm ed una profondità di $250 \mu\text{m}$. Tirella e colleghi osservano come la possibilità di realizzare profili di concentrazione con notevole pendenza sia legata all'impostazione di portate elevate che possono tuttavia generare sforzi di taglio eccessivi sulle cellule con compromissione dell'adesione o della funzionalità delle stesse.

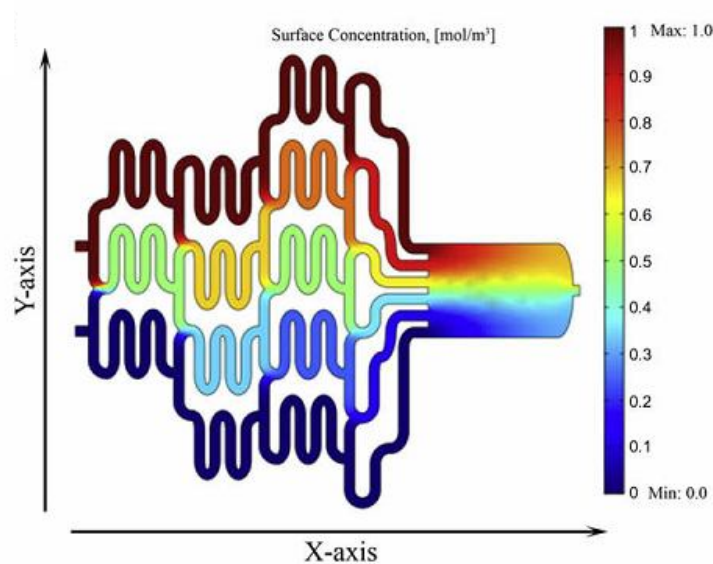


Figura 1.53 – Schema del dispositivo e modello di miscelazione realizzato mediante *COMSOL* (*COMSOL AB, Stockholm, Sweden*). [Tirella et al., 2008]

Un recente dispositivo proposto su *Lab on a chip* (Kim et al., 2008) riprende in modo molto evidente il principio della generazione di gradienti di concentrazione, lineari o logaritmici, mediante ottimizzazione delle portate di due fluidi convergenti in precisi punti di controllo; i rapporti di diluizione risultano quasi indipendenti dai flussi impostati sulla pompa a siringa e dal coefficiente di

diffusione delle molecole considerate. Questa tipologia di piattaforme microfluidiche si dimostra compatta e versatile grazie alla possibilità di modificare in modo semplice ed intuitivo i livelli di concentrazione di un farmaco attraverso la sola manipolazione delle resistenze fluidodinamiche del circuito, rappresentato mediante una rete resistiva; l'elevata scalabilità del sistema (figura 1.54) rende dunque tale approccio molto interessante per ulteriori sviluppi futuri nel campo della microfluidica e della biologia cellulare/molecolare.

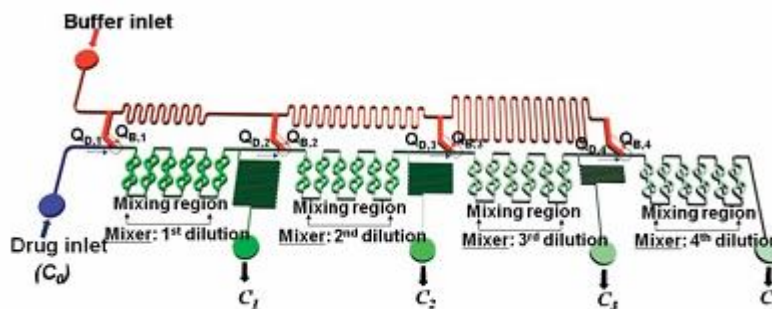


Figura 1.54 – Schema del sistema microfluidico [Kim et al., 2008]

La concentrazione ad ogni *step* è determinata dalla portata di due fluidi, un *buffer* ed una generica *drug*, in corrispondenza di punti di giunzione specifici: dopo che la specie chimica da diluire (Q_D) è entrata in contatto con il *buffer* (Q_B) la soluzione procede all'interno di una regione di miscelazione; una parte della soluzione viene raccolta in corrispondenza dell'uscita mentre il resto prosegue verso il successivo punto di intersezione come mostrato nella figura sopra riportata.

La rete resistiva schematizzata in fase progettuale è visibile in figura 1.55.

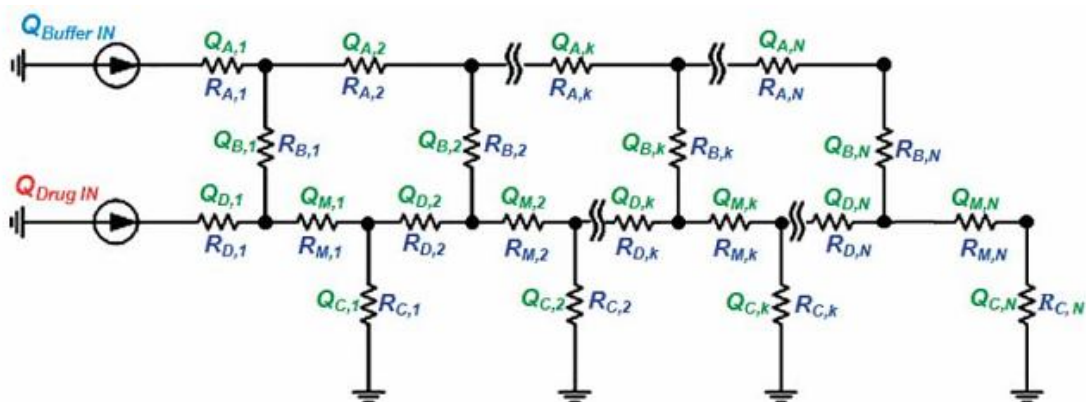


Figura 1.55 – Equivalente elettrico del dispositivo [Kim et al., 2008]

Dopo che le portate sono state determinate è necessario individuare le resistenze fluidodinamiche per poter definire le dimensioni dei microcanali da realizzare.

In figura 1.56 viene riportata un'immagine del dispositivo completo in cui sono visibili le connessioni al sistema di alimentazione del farmaco e del *buffer*.

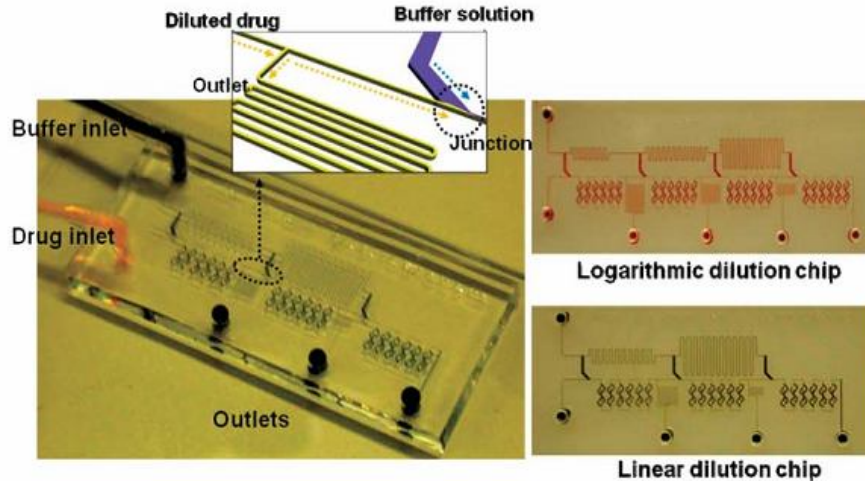


Figura 1.56 – Dispositivo microfluidico caricato con colorante giallo e blu; la rete di microcanali viene modificata in funzione della diluizione desiderata. [Kim et al., 2008]

Una nota particolare merita l'innovativo sistema di miscelazione denominato “serpentina di Tesla” (figura 1.57): nel caso in cui i due fluidi non siano perfettamente miscelati prima della successiva intersezione i rapporti di diluizione risulterebbero pesantemente influenzati dalle portate e dal coefficiente di diffusione della specie chimica considerata; la regione di miscelazione prevede sei coppie di *mixer* con una lunghezza totale di 43 mm; due flussi laminari sono inseriti in corrispondenza del punto A; i tre flussi generati si incontrano nuovamente in B; ad ogni punto di controllo si generano moti convettivi trasversali alla direzione di avanzamento che consentono il perfetto mescolamento di farmaco e *buffer*. Da sottolineare infine un limite della piattaforma microfluidica: un'imperfetta miscelazione dei due fluidi in corrispondenza di ogni intersezione può portare ad un accumulo di errori secondo la seguente equazione:

$$e_k = \sum_{j=1}^{k-1} \left(e_j \prod_{i=j+1}^k \eta_i \right) \quad [1.4]$$

in cui η indica il rapporto di diluizione mentre e_k l'errore di concentrazione all'uscita k-esima.

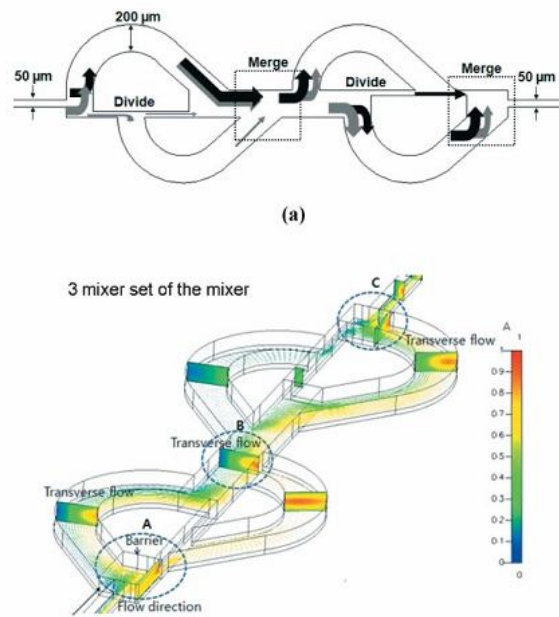


Figura 1.57 – (a) Rappresentazione schematica del principio di funzionamento del *mixer*; (b) risultati delle simulazioni numeriche effettuate per la valutazione dei flussi trasversali. [Kim et al., 2008]

1.2.3 Conclusioni

Dispositivi tecnologici come quelli proposti nelle pagine precedenti sono sempre più diffusi nei laboratori di biologia molecolare e cellulare; si tratta di progetti realizzati all'interno di gruppi di ricerca universitari che propongono soluzioni sempre più innovative e miniaturizzate per effettuare test sperimentali e valutare gli effetti di nuovi farmaci su determinate popolazioni cellulari, approfondire le conoscenze sul metabolismo di cellule cancerose, caratterizzare il comportamento delle cellule a gradienti di concentrazione di fattori chemotattici, realizzare tessuti ingegnerizzati; tali dispositivi non sono ancora presenti a livello commerciale ma il loro impiego risulta sempre più diffuso portando progressivamente all'abbattimento della cosiddetta "soglia di diffusione". L'universo delle tecnologie microfluidiche è in fase di grandiosa espansione e come sottolineato da Yager et al. su *Nature* (2006) è ragionevole immaginare che entro i prossimi dieci anni esso entrerà ufficialmente nell'ambito delle tecnologie utilizzate quotidianamente a scopo diagnostico e terapeutico nei centri di ricerca e di cura.

1.3 Microfabbricazione e materiali

Nei seguenti paragrafi vengono trattate le principali caratteristiche del processo di litografia utilizzato per la realizzazione di numerosi dispositivi microfluidici; in particolare vengono discusse la tecnica di *replica molding*, che consente la realizzazione di superfici polimeriche microstrutturate, e le principali proprietà del materiale più diffuso per la fabbricazione di microcanali, il polidimetilsilossano (PDMS).

1.3.1 La microlitografia

Le tecnologie di microfabbricazione costituiscono uno strumento fondamentale nei settori della microelettronica, della sensoristica, dei sistemi microelettromeccanici e microanalitici; la fotolitografia rappresenta una delle tecnologie più potenti nell'ambito della microfabbricazione e la maggior parte dei circuiti integrati sono realizzati attraverso questo strumento.

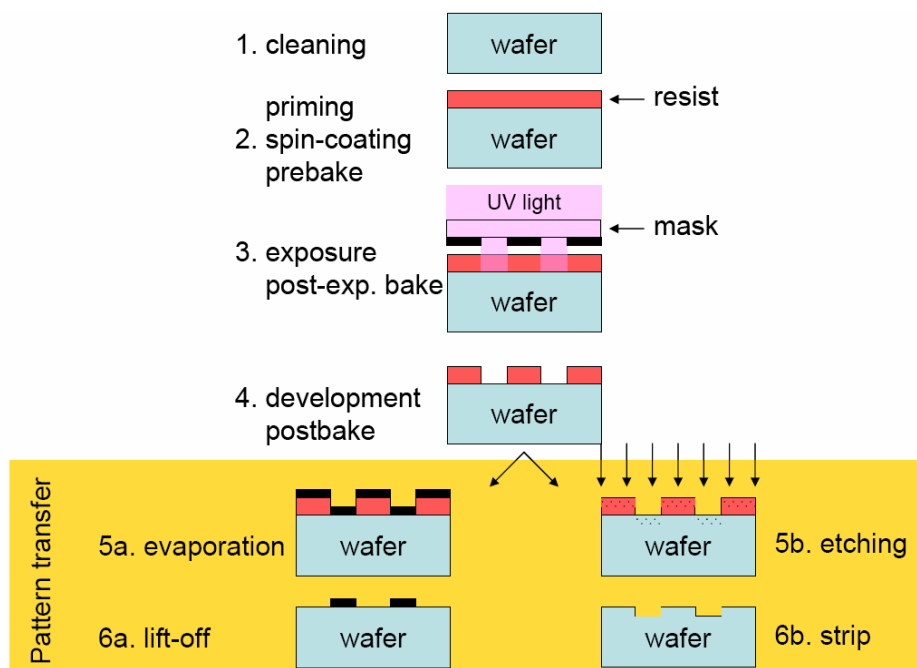


Figura 1.58 – Principio generale delle tecniche litografiche basate su un approccio “parallelo”. [Sordan, Dispense del corso di Micro-Nano Fabbricazione, 2009]

Le tecnologie litografiche appartengono alla famiglia delle tecniche di fabbricazione “*top-down*” in cui a partire da un materiale massivo si procede alla realizzazione del dispositivo attraverso la progressiva rimozione di materia; alcune tipologie di litografia, quali litografia ottica, fotolitografia, litografia a raggi X utilizzano un approccio “parallelo” in cui attraverso la progettazione di

opportune “maschere” è possibile ottenere, almeno a livello teorico, infinite copie del prodotto desiderato (figura 1.58); litografie a fascio elettronico sono basate su un approccio seriale, senza interposizione di maschere tra la sorgente di energia ed il substrato da modificare.

Sistemi per litografia ottica convenzionale e fotolitografia (litografia UV) si basano su una sorgente luminosa (in genere laser ArF 193 nm), un collimatore, una fotomaschera, un sistema ottico ed un *fotoresist* depositato su un *wafer* di silicio; il processo litografico si basa in estrema sintesi sulla capacità del *fotoresist* di conservare una replica della fotomaschera che potrà essere utilizzata per successivi passaggi tra cui *wet/dry etching* oppure evaporazione. Esistono due diverse tipologie di *fotoresist*, positivo e negativo: il *resist* positivo viene esposto alla sorgente luminosa, raggi ultravioletti nel caso della fotolitografia, in corrispondenza dei punti in cui il materiale sottostante deve essere rimosso; in tali *resist* l’esposizione alla luce ultravioletta determina una modifica della struttura chimica del materiale che diviene maggiormente solubile nell’agente di sviluppo che verrà utilizzato; il *resist* esposto viene successivamente “lavato” attraverso la soluzione di sviluppo, quindi la maschera contiene una copia esatta del *pattern* che dovrà essere trasferito sul substrato. *Resist* negativi sono caratterizzati da un comportamento opposto in cui l’esposizione alla sorgente luminosa determina la formazione di legami chimici che rendono tali materiali difficoltosi da sciogliere attraverso l’agente di sviluppo; le maschere utilizzate con *resist* negativi contengono l’inverso o negativo del modello che dovrà essere trasferito sul *wafer*. Il metodo di deposizione dei *fotoresist* più utilizzato è rappresentato dal processo di *spin-coating* (figura 1.59) in cui il substrato da rivestire viene posto in rotazione con velocità 5000 rotazioni/min per 60 secondi e la soluzione polimerica che costituirà il rivestimento viene distribuita in modo omogeneo, rapido e semplice; lo spessore del *resist* è determinato dalla viscosità del materiale e dalla velocità dello *spinner* come espresso dalla seguente equazione:

$$t = \frac{k \cdot p^2}{w^{0.5}} \quad [1.5]$$

con **k** costante dello *spinner*, in genere variabile tra 80 e 100, **p** percentuale di *resist* solido, **w** velocità di rotazione dello *spinner* espressa in rpm/1000.

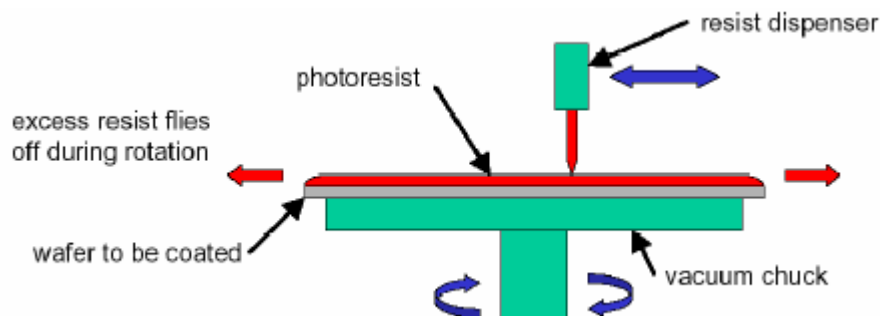


Figura 1.59–Sistema di deposizione del *resist* sul substrato.[Del Zoppo, Dispense del corso di Nanomateriali 2008]

Il processo di trasferimento del *pattern* sul substrato è riassunto in figura 1.58: le tappe fondamentali in cui può essere suddiviso il processo sono la pulitura del *wafer*, l'applicazione del *fotoresist*, una fase di *soft baking* per il fissaggio di quest'ultimo al substrato, l'allineamento della maschera, l'esposizione alla sorgente luminosa, la fase di sviluppo (*wet/dry etching*) ed un processo conclusivo di *hard baking*.

Il processo fotolitografico è caratterizzato da tre possibili configurazioni del sistema (figura 1.60):

- Configurazione *contact* in cui la maschera aderisce perfettamente al substrato rivestito mediante il *resist*; la principale problematica è rappresentata dal progressivo danneggiamento della maschera e dalla deposizione sulla sua superficie di prodotti di scarto provenienti dal *resist* con conseguenti difficoltà di trasferimento del *pattern* desiderato sul substrato.
- Configurazione *proximity*: i problemi relativi alla maschera sono eliminati anche se iniziano a presentarsi fenomeni di diffrazione in campo vicino o diffrazione di *Fresnel*.
- Configurazione *projection*: un sistema di lenti viene interposto tra maschera e substrato; la capacità di trasferire in modo ottimale il substrato dipende dalla qualità del sistema ottico; fenomeni di diffrazione in campo lontano o diffrazione di *Fraunhofer* limitano la risoluzione del sistema.

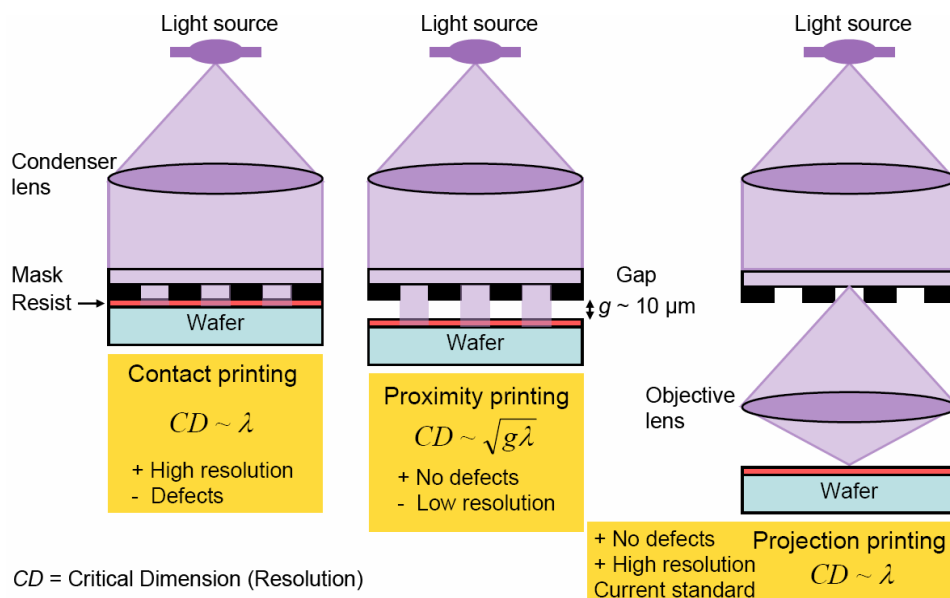


Figura 1.60 – Configurazioni del sistema nella fotolitografia. [Sordan, Dispense del corso di Micro-Nano Fabbricazione, 2009]

Il limite di risoluzione W delle tecniche litografiche di tipo *contact* e *proximity* è dipendente dalla lunghezza d'onda della radiazione utilizzata (lunghezza d'onda generalmente compresa tra 193 nm e 245 nm) e dalla distanza g tra maschera e *fotore Resist* come evidente dalla seguente espressione:

$$W_{MIN} = (\lambda \cdot g)^{0.5} \quad [1.6]$$

Il limite di risoluzione delle tecniche basate su un approccio *projection* è espresso dal criterio di *Rayleigh*:

$$R = \frac{K_1 \cdot \lambda}{NA} \quad [1.7]$$

in cui λ rappresenta la lunghezza d'onda della radiazione utilizzata, NA l'apertura numerica della lente (dipendente a sua volta dall'indice di rifrazione del mezzo interposto e dal semiangolo α del cono di luce che entra nella lente) e K_1 una costante generalmente compresa tra 0.6 e 0.8; come evidente il limite di risoluzione risulta tanto più piccolo quanto più è ridotta la lunghezza d'onda utilizzata ed elevato il valore di apertura numerica della lente. Un ulteriore parametro da considerare è costituito dal “*depth of field*” o profondità di campo (figura 1.61):

$$DOF = \frac{K_2 \cdot \lambda}{NA^2} \quad [1.8]$$

La riduzione eccessiva del limite di risoluzione determina un significativo decremento del parametro DOF con incapacità di penetrazione della radiazione UV nel film di *fotore Resist* depositato; è quindi necessario un corretto bilanciamento tra i due indici al fine di ottimizzare il processo litografico. Le costanti K_1 e K_2 dipendono da molteplici aspetti del processo tra cui tipologia di *resist*, caratteristiche della maschera e *pattern* che deve essere trasferito.

DOF = Depth of field
 DOF is the range of distance within which the image is in focus.

$$DOF = k_2 \frac{\lambda}{NA^2}$$

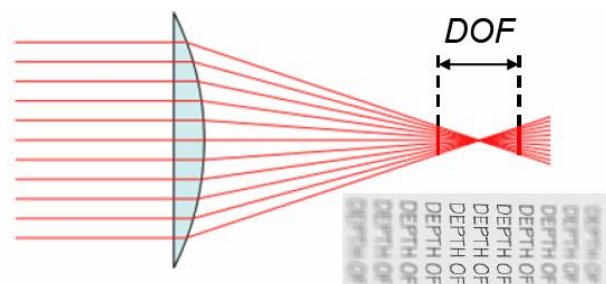


Figura 1.61 – Formulazione matematica e rappresentazione schematica del concetto di profondità di campo. [Sordan, Dispense del corso di Micro-Nano Fabbricazione, 2009]

Il limite di risoluzione attualmente raggiunto da tecniche di fotolitografia *projection* (configurazione più utilizzata) è prossimo ai 100 nm; l'utilizzo di tecniche seriali basate su fascio elettronico consente una sensibile riduzione nel valore di limite di risoluzione raggiungibile (circa 10 nm) a discapito della ripetibilità del processo di fabbricazione e di elevati costi di sviluppo.

Extreme UV lithography e tecniche basate su raggi X richiedono la realizzazione di nuovi sistemi ottici e/o nuove tipologie di maschere mentre *array* di fasci energetici piuttosto che un singolo fascio sono richiesti per lo sviluppo delle litografie elettroniche e ioniche.

1.3.2 Soft lithography

Con il termine *soft lithography* viene indicata una famiglia di tecniche utilizzate per la realizzazione di superfici micro-nano strutturate attraverso l'impiego di materiali elastomerici; tali tecniche comprendono *Micro Contact Printing* (μ CP), *Micro Molding in Capillaries* (MIMIC) e *Replica Molding*. I materiali più comunemente utilizzati sono gli elastomeri siliconici come il polidimetil silossano oltre ai poliuretani lineari a segmenti, alle poli-immidi e a diverse tipologie di gomme sottoposte a processo di vulcanizzazione [Xia et al., 1998]. In figura 1.62 è mostrato uno schema riassuntivo dell'intero processo di *Replica Molding* eseguito utilizzando polidimetilsilossano: il prepolimero elastomerico viene disposto su un substrato microstrutturato, reticolato mediante l'agente di *cross-link* ed infine separato dal *master* al termine del processo di polimerizzazione (la durata del processo di reticolazione a temperatura ambiente è di circa 24 ore mentre in stufa l'intera reazione si completa in poche ore). La microstrutturazione superficiale del *master* può essere ottenuta con diverse tecniche tra cui fotolitografia, litografia a fascio elettronico o fasci laser; è interessante osservare come ogni *master* possa essere utilizzato per la fabbricazione di oltre 50 campioni elastomerici.

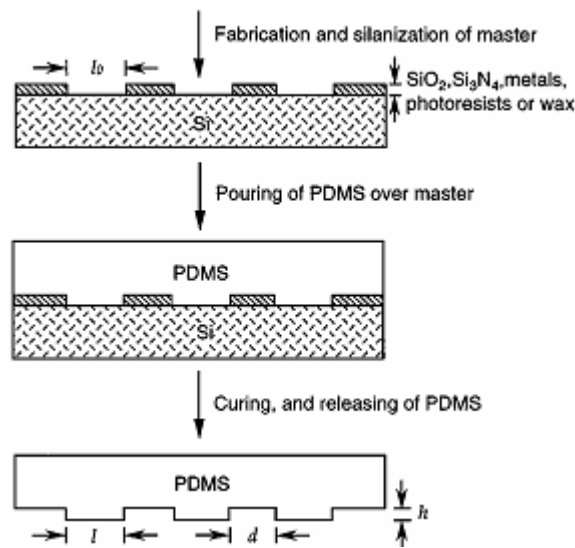


Figura 1.62 – Rappresentazione schematica del processo di *Replica Molding*. [Xia et al., 1998]

Il PDMS costituisce il materiale in assoluto più utilizzato nell'ambito della *soft lithography* data la capacità di aderire in modo ottimale al substrato e di replicarne fedelmente le caratteristiche superficiali oltre alla possibilità di essere facilmente rilasciato senza danneggiamenti della strutturazione creata.

1.3.3 Il Polidimetilsilossano - PDMS

Il Polidimetilsilossano anche noto come PDMS ha assunto nel corso degli anni un'importanza crescente in vari settori; numerose applicazioni biomediche e di microingegneria comprendono componenti realizzati con questo materiale il cui mercato è in continua espansione. Uno dei primi campi di applicazione del PDMS in cui le potenzialità del materiale sono state pienamente sfruttate è stato quello della "*soft lithography*" come strumento di stampa per il trasferimento di *micro pattern*; il recente sviluppo dei sistemi BioMEMS (biosistemi microelettromeccanici) ha comportato un notevole incremento nell'utilizzo del PDMS per la fabbricazione di dispositivi per PCR (*polymerase chain reaction*), *microarray technology* per la valutazione dell'espressione genica di popolazioni cellulari e per l'analisi di mutazioni genetiche, *capillary electrophoresis* e per la realizzazione di molteplici altre piattaforme tecnologiche. Il settore della microfluidica è caratterizzato dalla costante presenza del polidimetilsilossano: nei sistemi analitici microfluidici il PDMS rappresenta il materiale con cui sono realizzati i microcanali; il fluido di interesse viene pompato all'interno dei condotti in modo elettrocinetico o attraverso differenze di pressione e analizzato all'uscita del circuito. I dispositivi microfluidici utilizzano volumi estremamente ridotti di campioni e si basano in genere su processi diffusivi per garantire il miscelamento dei reagenti di

interesse; di conseguenza i canali sono estremamente lunghi e sottili ed il rapporto superficie volume significativamente elevato; nel momento in cui il microcanale vuoto viene riempito con il fluido di interesse i siti idrofobici presenti sulla superficie del PDMS interagiscono con il campione modificando potenzialmente il contenuto del fluido stesso; per evitare tale problema è necessario conoscere quali molecole presenti nel campione possano interagire con le pareti del microcanale adsorbendosi al PDMS ed attuare strategie di modifica superficiale per contrastare tale problematica. Importanti proprietà del PDMS sono inoltre rappresentate dall'elevata permeabilità ai gas (applicazioni nel campo degli ossigenatori), dal comportamento elastomerico e dalle specifiche caratteristiche superficiali.

1.3.3.1 Nomenclatura e struttura

Il PDMS appartiene al gruppo dei silossani; la nuova famiglia di materiali fu inizialmente definita silicochetoni ma data la mancanza del legame covalente doppio $\text{Si}=\text{O}$ si optò successivamente per il nome silossani e polisilossani; la struttura del PDMS è costituita dalla ripetizione di unità monomeriche fondamentali caratterizzate dalla presenza del gruppo silossano inorganico e di gruppi metile organici come mostrato in figura 1.63.

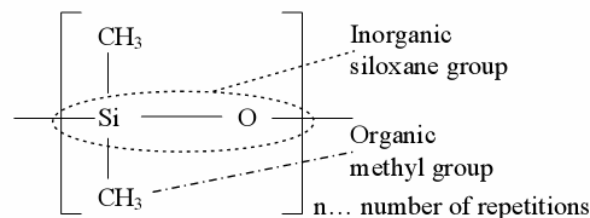


Figura 1.63 – Unità monomerica di polidimetilsilossano.

1.3.3.2 Lavorazione del PDMS per applicazioni microfluidiche

Il polidimetilsilossano è costituito da una componente più viscosa, il pre-polimero, contenente il platino come catalizzatore, e da un agente cross-linkante con il quale viene miscelato generalmente in rapporto stechiometrico 10:1 al fine di ottenere la reticolazione delle macromolecole e le proprietà meccaniche desiderate. Terminata la fase di miscelamento il materiale viene posto su uno stampo realizzato in genere in silicio oppure in SU-8 e sottoposto a processo di degassamento cui segue una fase di riscaldamento della durata di diverse ore. Il PDMS viene successivamente fissato ad un substrato attraverso un legame reversibile (interazioni di *Van der Waals* PDMS-PDMS o PDMS-vetro di silice) o irreversibile mediante un trattamento al plasma; il fissaggio attraverso

legame reversibile è estremamente rapido, avviene a temperatura ambiente ma non sopporta pressioni particolarmente elevate (>30 kPa); il legame irreversibile può essere realizzato con molteplici materiali tra cui vetro di silice, quarzo, polistirene, polietilene ma non con poli-immidi, polimetilmetacrilato o policarbonato; il fissaggio attraverso legami irreversibili è in grado di tollerare carichi superiori ai 200 kPa.

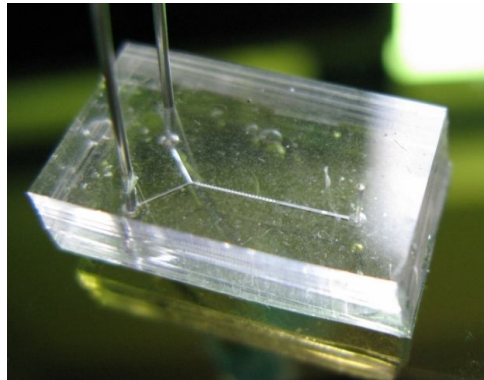


Figura 1.64 – *Micromixer* realizzato in PDMS.

1.3.3.3 Proprietà del PDMS

Il polidimetilsilossano è un elastomero caratterizzato da buona stabilità termica, bassa tensione superficiale e trasparenza (sotto i 280 nm); l'indice di rifrazione vale 1.43 mentre la temperatura di transizione vetrosa è pari a -125°C ; la conduttività termica è di $0.18 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$; sebbene stabile alle alte temperature nel mondo naturale il polimero degrada completamente ed abbastanza velocemente senza causare problemi di carattere ambientale. Dal punto di vista biomedico il PDMS è apprezzato per la propria inerzia, stabilità, flessibilità e proprietà di non fluorescenza; le principali caratteristiche che rendono questo materiale indicato per la realizzazione di dispositivi microfluidici o di singoli componenti (figure 1.64 e 1.65) sono il comportamento elastomerico, la permeabilità ai gas e le proprietà di superficie.

Permeabilità

La permeabilità è rappresentata dal prodotto tra coefficiente di diffusione e coefficiente di solubilità di un determinato soluto ad una precisa temperatura; la permeabilità dei silossani è significativamente più elevata di quella di altri materiali elastomerici; l'innalzamento della temperatura determina un incremento del coefficiente di diffusione ma una diminuzione del

coefficiente di solubilità con risultante decremento del valore di permeabilità. Sebbene la permeabilità sia vantaggiosa in alcune applicazioni come nella realizzazione di membrane per separazione di gas, *graft* sintetici per il trattamento di grandi ustionati, lenti a contatto morbide, ossigenatori, nei dispositivi microfluidici essa potrebbe influenzare i risultati sperimentali a causa di fenomeni di evaporazione o di cambio di pH a causa della diffusione di CO₂; l'evaporazione rappresenta una significativa minaccia per le applicazioni in cui sono coinvolti ridotti volumi di campione; questa può essere sensibilmente ridotta presaturando il PDMS con un liquido o incrementando la quantità di agente reticolante utilizzato in fase di polimerizzazione (viene tuttavia modificata la rigidità del materiale). Da sottolineare infine come numerosi solventi organici siano solubili nel polimero portando ad un effetto di rigonfiamento.

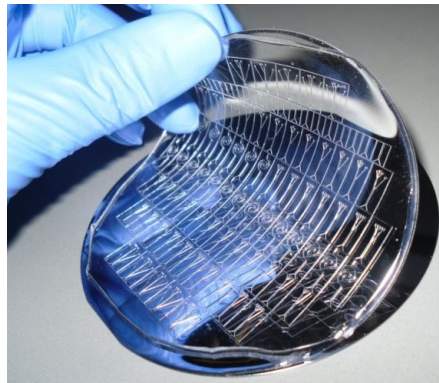


Figura 1.65 – Dispositivi microfluidici realizzati in PDMS.

Elasticità

Il PDMS è caratterizzato da proprietà elastomeriche simili a quelle della gomma naturale vulcanizzata; sottoposto ad uno sforzo di trazione monoassiale esso è in grado di deformarsi notevolmente per poi recuperare velocemente dopo la rimozione del carico. L'elasticità del PDMS è di natura entropica: durante l'applicazione dello sforzo le macromolecole polimeriche si orientano nella direzione della deformazione determinando uno sbilanciamento energetico (vedi energia libera di *Gibbs*) di natura entropica (ΔS negativo, minor disordine entropico); solo in presenza di elevate deformazioni cui il provino è sottoposto si assiste ad un fenomeno di elasticità entalpica dovuto alla rottura di legami chimici e allo spostamento degli atomi dalle relative posizioni di equilibrio; in genere tale effetto non è riscontrabile a causa della preventiva rottura del materiale per la presenza di difetti. Maggiore è il contenuto di agente reticolante e minore sarà l'elasticità del polimero; la proprietà di elasticità è particolarmente importante in applicazioni in cui il materiale dovrebbe essere sottoposto a flessioni o torsioni; nelle applicazioni microfluidiche le pareti dei

microcanali subiscono delle deformazioni a causa delle pressioni generate per il moto del fluido; il grado di deformazione è determinato dalla pressione sulle pareti, dal grado di reticolazione del polimero ma anche dallo spessore del microcanale. Le proprietà elastomeriche del PDMS dovrebbero essere tenute in considerazione in applicazioni in cui un flusso costante è essenziale o in presenza di elevati rapporti tra larghezza e profondità dei microcanali in quanto la struttura potrebbe essere soggetta a rischio di collassamento. Il PDMS è infine particolarmente indicato per la realizzazione di valvole pneumatiche e pompe con possibilità di aumentare notevolmente la compattezza dei dispositivi creati.

1.3.3.4 Proprietà di superficie del PDMS

Angolo di contatto

Una delle principali proprietà di superficie è rappresentata dall'angolo di contatto che definisce il grado di idrofilicità/idrofobicità e che di conseguenza influenza le capacità di adsorbimento del materiale rivelandosi cruciale nei dispositivi che si basano su fenomeni elettrofluidodinamici; molteplici trattamenti di modifica superficiale consentono di alterare il valore dell'angolo di contatto: l'esposizione a plasma di ossigeno determina una diminuzione dell'angolo di contatto dell'acqua (da 108° a 30°), sebbene tale decremento sia instabile e di breve durata all'aria aperta.

Rugosità superficiale

La rugosità superficiale è strettamente collegata al processo di fabbricazione del substrato su cui viene successivamente depositato il PDMS che ne riproduce i più piccoli dettagli con precisione micrometrica; l'incremento di rugosità superficiale determina un aumento della superficie e di conseguenza un incremento dell'area in grado di adsorbire molecole o intrappolare bolle gassose; la rugosità superficiale può determinare alterazioni locali del flusso laminare con insorgenza di fenomeni di microconvezione e generazione di piccoli vortici.

Adsorbimento

Il polidimetilsilossano non trattato è altamente idrofobico; è in grado di interagire con analiti contenenti gruppi metilici o alchilici attraverso forze di *Van der Waals*, proporzionali al numero di gruppi metile o alla lunghezza delle catene alchiliche presenti; da sottolineare infine come il gruppo silossano possa generare legami idrogeno o interazioni dipolo-dipolo. L'utilizzo di canali lunghi e sottili in numerosi dispositivi microfluidici per consentire il completamento di processi di diffusione e miscelamento comporta la presenza di estese superfici di contatto con il campione che

può dunque interagire con le pareti dei condotti; alcune molecole presenti nel fluido possono legarsi in modo preferenziale con la struttura in PDMS portando ad un effetto di filtraggio indesiderato e ad analizzare un campione in uscita differente rispetto a quello introdotto. L'adsorbimento può condurre inoltre a fenomeni di ostruzione del microcanale con modifica delle proprietà del flusso; numerose molecole fluorescenti utilizzate in diversi esperimenti e molteplici proteine risultano facilmente adsorbibili sulla superficie in polidimetilsilossano dei canali in cui sono inserite. Modifiche di superficie sono in grado di ridurre l'adsorbimento di molecole sulle pareti dei condotti pur essendo spesso costose e difficili da applicare.

Modifiche di superficie

Diversi trattamenti consentono di rivestire le pareti interne dei microcanali in PDMS dei dispositivi microfluidici con lo scopo di prevenire legami indesiderati: tra questi ricordiamo l'esposizione a sorgenti di energia come plasma di ossigeno o luce ultravioletta, l'utilizzo di surfattanti carichi, film sottili di polielettroliti, modifiche covalenti come silanizzazioni, deposizione chimica da fase vapore, *bilayer* fosfolipidici; i trattamenti applicati al PDMS non si rivelano stabili nel tempo, di conseguenza l'utilizzo di dispositivi modificati dovrebbe essere limitato a pochi cicli.

1.3.3.5 Conclusioni

Il PDMS è ormai ampiamente utilizzato per la fabbricazione di piattaforme microfluidiche (figura 1.67) grazie alla sua elevata lavorabilità e ai suoi costi moderati; la sfida del futuro consisterà nel generare superfici modificate stabili nel tempo in grado di garantire prestazioni ottimali ai singoli dispositivi senza l'insorgenza di fenomeni di adsorbimento che potrebbero inficiare i risultati ottenuti.

Il PDMS presenta tuttavia una serie di problematiche tecniche la cui risoluzione sarà fondamentale per poter ottimizzare i processi di microfabbricazione basati sulla *soft lithography*:

- riduzione in volume prossima all'1% a seguito del processo di reticolazione
- possibilità di rigonfiamento in presenza di solventi organici apolari fra cui esano e toluene
- l'elasticità e l'espansione termica limitano la possibilità di ottenere accuratezza estremamente elevata su superfici particolarmente estese; i processi di nanofabbricazione risultano quindi problematici
- limitazioni nel parametro "*aspect ratio*" (rapporto tra altezza e larghezza delle strutture create): in presenza di *aspect ratio* eccessivamente elevati o particolarmente ridotti le

microstrutture in PDMS possono deformarsi o distorcersi come evidenziato in figura 1.66; Delamarche et al. (1997) hanno sottolineato come il parametro *aspect ratio* debba essere compreso tra 0.2 e 2 per ridurre al minimo la probabilità di generazione di difetti.

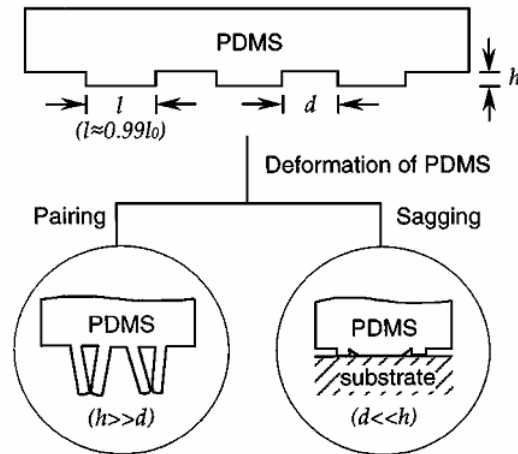


Figura 1.66 – Principali problematiche legate al parametro *aspect ratio* nel PDMS. [Xia et al., 1998]

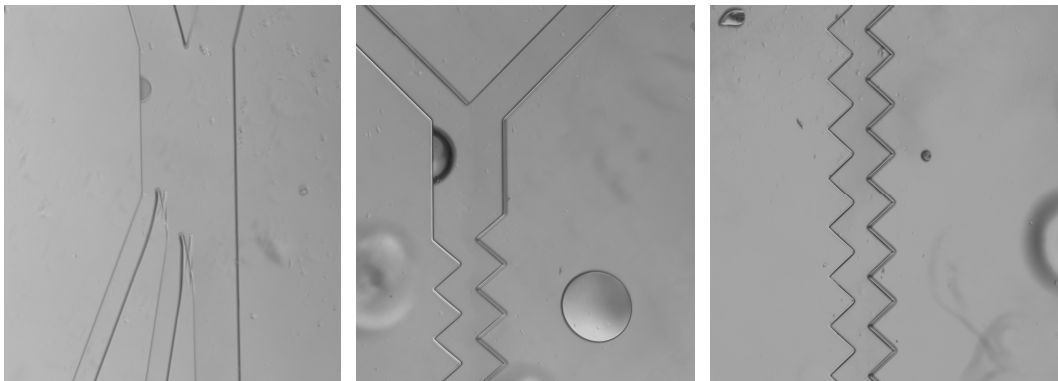


Figura 1.67 – Esempi di dispositivi microfluidici realizzati interamente in PDMS: microscopie ottiche ottenute con ingrandimento 40x.

Attualmente sono in fase di studio diverse tecniche per ridurre le problematiche individuate: il fenomeno di “*pairing*” mostrato in figura 1.66 può essere annullato attraverso il lavaggio della superficie in una soluzione acquosa all’1% di sodiododecilsolfato (SDS) seguito da un risciacquo in eptano (Delamarche et al., 1997).

1.3.4 Microfabbricazione di un dispositivo microfluidico

Viene ora riportato a titolo esemplificativo l'intero processo di fabbricazione di un semplice dispositivo microfluidico; le tappe principali (figura 1.68) sono analoghe a quelle seguite per la realizzazione di numerosi sistemi riportati nel paragrafo 1.2.2.

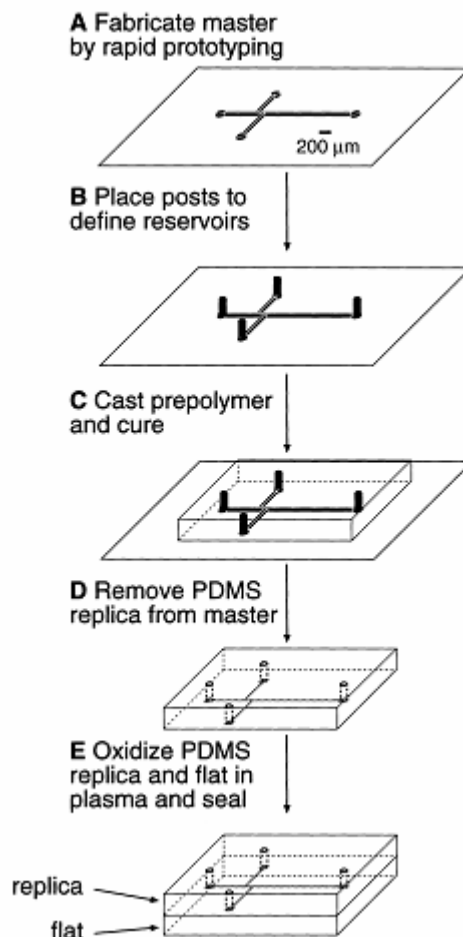


Figura 1.68 – Schema relativo alla microfabbricazione di un dispositivo microfluidico. [Duffy et al., 1998]

1.3.4.1 Rapid prototyping del master

Il disegno del dispositivo e della rete di microcanali viene realizzato mediante *software* CAD cui segue la fabbricazione della maschera che verrà utilizzata nel processo di fotolitografia; come riportato da Duffy e colleghi (1998) è utilizzato un substrato in silicio rivestito con uno strato di *positive resist* (deposizione mediante *spin-coating* 5000 rpm per 20 s) dello spessore di 55 µm (definizione della profondità dei condotti) su cui è possibile definire particolari con limite di risoluzione 20 µm. L'utilizzo di tecniche di *rapid prototyping* consente di ottenere una serie di vantaggi rispetto alle tecniche di fabbricazione tradizionali: le maschere (stampate da una stampante

ad alta risoluzione) sono prodotte in tempi inferiori (ore invece di giorni o settimane) e risultano sensibilmente meno costose rispetto alle classiche maschere in cromo (20 \$ contro 500-1500 \$); la lavorazione del *fotore Resist* sulla superficie del *master* per la generazione della microstrutturazione risulta più semplice e flessibile rispetto ai processi standard di lavorazione che implicano l'ablazione o *etching* del silicio; in particolare il trattamento convenzionale dei *master* in silicio rende difficoltosa la creazione di canali di orientazione arbitraria o ancora di *reservoir* circolari a causa dei diversi piani cristallografici presenti.

1.3.4.2 Replica molding del master

Sulla superficie del *master* strutturato sono posizionate quattro colonne in vetro di silice per la definizione dei *reservoir* (figura 1.68B); in seguito il PDMS preparato miscelando prepolimero ed agente di reticolazione è colato sulla superficie del substrato allo scopo di replicare la rete di microcanali realizzata; l'angolo tra *fotore Resist* e silicio prossimo a 90° consente la generazione di condotti con sezione rettangolare le cui pareti, come mostrato nell'immagine ottenuta mediante microscopia a scansione elettronica, presentano una microrugosità superficiale (figura 1.69).

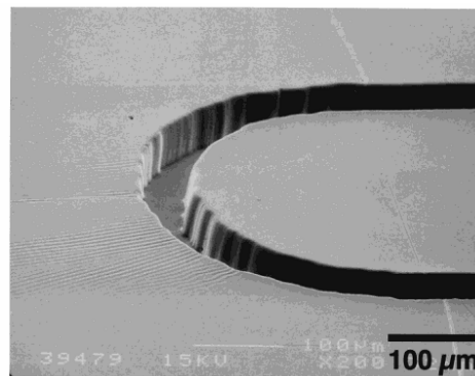


Figura 1.69 – Microscopia a scansione elettronica del microcanale creato. [Duffy et al., 1998]

1.3.4.3 Ossidazione e fissaggio

La rete di microcanali è ottenuta mediante fissaggio della replica polimerica con una sottile lastra in PDMS; ossidando entrambe le superfici in un reattore al plasma di ossigeno per 1 minuto e portandole a contatto è possibile ottenere un perfetto fissaggio senza applicazione di pressioni aggiuntive. Per poter comprendere la natura dell'intenso legame stabilitosi tra le due superfici ossidate si rendono necessarie alcune considerazioni: l'angolo di contatto dinamico dell'acqua su PDMS trattato al plasma è di 30° mentre quello su polimero non trattato è di ben 108°; il PDMS

ossidato è quindi caratterizzato da una superficie idrofilica. Tecniche di spettroscopia ionica (SSIMS) evidenziano come il sito di attacco del plasma sia rappresentato dagli atomi di silicio e come si originino sulla superficie del campione gruppi chimici Si-OH; l'utilizzo della spettroscopia a raggi X (XPS) rivela inoltre un sensibile incremento in silicio e ossigeno sulla superficie con diminuzione rispetto a campioni non trattati della presenza di carbonio. Tecniche di spettroscopia a raggi infrarossi denotano un significativo contributo relativo ai fenomeni di stretching di gruppi chimici -OH ed Si-OH a conferma dei risultati ottenuti mediante le tecniche precedentemente citate. Evidenze sperimentali dimostrano dunque come l'ossidazione del polidimetilsilossano comporti una conversione dei gruppi $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$ in $-\text{O}_n\text{Si}(\text{OH})_{4-n}$ sulla superficie. La spiegazione più probabile del fissaggio irreversibile ottenuto tra i due campioni in PDMS prevede quindi la formazione di ponti silossano Si-O-Si.

Il PDMS è in grado di legarsi in modo irreversibile a numerose tipologie di materiali tra cui vetro, silicio, quarzo, polietilene, polistirene dopo esposizione di entrambi i campioni a plasma di ossigeno per 1 minuto; nel caso dei polimeri il trattamento al plasma introduce sulla superficie gruppi carbossilici, alcolici o chetonici in grado di interagire con i gruppi Si-OH presenti sul PDMS. La metodologia di fissaggio esposta è ampiamente utilizzata per la realizzazione di dispositivi microfluidici e si caratterizza per una elevata semplicità se confrontata con altre tecniche che richiedono l'applicazione di combinazioni di alte pressioni, temperature e differenze di potenziale per periodi prolungati di tempo che possono danneggiare le strutture create.

1.3.4.4 Natura dei canali in PDMS ossidato

Il trattamento al plasma determina la formazione di gruppi chimici Si-OH sulle pareti dei micro canali; in presenza di soluzioni acquose neutre o basiche si assiste alla creazione di gruppi SiO^- a causa del processo di deprotonazione. La presenza di pareti cariche determina un significativo beneficio ai dispositivi microfluidici rispetto alla condizione di superfici idrofobiche:

l'elevata energia superficiale del PDMS ossidato comporta una superiore capacità di interagire con liquidi polari rispetto al materiale non trattato e di conseguenza una maggior facilità di riempimento con acqua o soluzioni acquose (come un *medium* per colture cellulari). La formazione di bolle d'acqua è infine limitata rispetto alla condizione di pareti idrofobiche in cui si assiste al frequente distacco di filetti fluidi dalla superficie con generazione di microbolle.

Come osservato da Morra et al. (1990) la creazione di una superficie idrofilica non è permanente: l'angolo di contatto relativo all'acqua subisce una alterazione da 30° a 79° in un intervallo temporale di 15 minuti se il campione è lasciato in atmosfera libera mentre dopo 45 minuti esso

ritorna pressoché identico al valore caratteristico del PDMS non trattato; l'angolo di contatto risulta stabile nel caso in cui il PDMS ossidato venga posto all'interno di una soluzione acquosa immediatamente dopo il trattamento.

Capitolo 2

*Progettazione di un dispositivo
microfluidico per la generazione
di diverse concentrazioni di farmaco*

2.1 Introduzione

Oggetto del presente lavoro è la progettazione di un innovativo dispositivo microfluidico di mescolamento e distribuzione di specie chimiche tale da garantire l'esposizione di una coltura cellulare a differenti valori di concentrazione. Questo sistema risulta essere un valido strumento per individuare il *range* di concentrazione capace di garantire l'efficacia terapeutica di farmaci. In particolare, l'applicazione considerata riguarda l'ottimizzazione terapeutica per il trattamento dell'osteoporosi con stronzio ranelato. Il progetto è realizzato in collaborazione con il laboratorio di colture cellulari e biologia molecolare dell'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano e con il *Center for Materials and Microsystems* della Fondazione Bruno Kessler (FBK) di Trento grazie ai finanziamenti della Fondazione Cassa di Risparmio di Trento e Rovereto (Caritro).

La progettazione del dispositivo è stata condotta presso il Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche (LaBS) del Politecnico di Milano attraverso l'utilizzo di modelli analitici e simulazioni numeriche. In fase iniziale è stata adottata la trattazione a parametri concentrati per modellizzare i rami del circuito. Simulazioni computazionali eseguite mediante il codice commerciale *Fluent* (*Ansys Inc., Canonsburg, PA, USA*) hanno consentito di ottimizzare le resistenze fluidodinamiche delle differenti porzioni di circuito. I ricercatori dell'Istituto Ortopedico Galeazzi hanno condotto una campagna di prove di biocompatibilità per la scelta ottimale dei substrati adatti al dispositivo di interesse. In particolare è stata eseguita la valutazione della proliferazione, della vitalità e della morfologia di campioni cellulari di osteosarcoma seminati su differenti tipi di supporto. La fabbricazione dei prototipi è stata condotta mediante tecniche fotolitografiche dal gruppo di ricerca BioMEMS presso i laboratori FBK; i prototipi realizzati sono stati quindi testati sperimentalmente presso il LaBS con l'utilizzo di tecniche di microscopia a fluorescenza e di un sistema *Micro Particle Image Velocimetry* (μ PIV).

2.2 Specifiche generali del dispositivo

Le specifiche generali del dispositivo, concordate con i biologi dell'Istituto Ortopedico Galeazzi, hanno previsto la definizione di cinque livelli di concentrazione di stronzio ranelato: assumendo le concentrazioni di farmaco presenti nei due ingressi del sistema pari a 0 ed 1 (0 e 10 mM rispettivamente) le concentrazioni richieste sono state pari a 0, 0.01, 0.1, 0.5 ed 1. Per ogni valore di concentrazione sono stati previsti nove pozzetti di coltura, per un totale di 45 pozzetti, così da poter effettuare test di vitalità cellulare in sestuplicato e di proliferazione cellulare in triplicato sulle colture di osteoblasti. I ricercatori dell'Istituto Ortopedico Galeazzi hanno sottolineato l'importanza di creare un sottile velo di *medium* per il nutrimento delle cellule, poste all'interno di pozzetti

caratterizzati da un diametro di 6.4 mm e da un volume di 200 μ l, in un arco temporale di pochi minuti. Inoltre, la disposizione dei pozzetti deve essere funzionale così da poter assicurare un immediato riconoscimento delle popolazioni cellulari sottoposte alle differenti condizioni sperimentali. Forma e dimensioni del dispositivo sono state stabilite dal gruppo di ricerca di Trento tenendo conto della tecnica di fabbricazione adottata. Le due alternative proposte sono state una struttura circolare con diametro 9 cm ed una quadrata con lato 7.18 cm.

2.3 Il progetto iniziale: dispositivo per la generazione di un gradiente di concentrazione

La progettazione del dispositivo è stata inizialmente indirizzata verso un sistema di generazione di gradiente di concentrazione basato su spillamenti successivi: due microcanali in cui sono inseriti *medium* per colture cellulari e stronzio ranelato confluiscono in un condotto centrale dal quale vengono spillate delle portate predeterminate con i livelli di concentrazione desiderati ottenuti unicamente mediante processi diffusivi (figura 2.2). La soluzione adottata è stata impostata su un sistema di generazione di gradiente di concentrazione del farmaco dotato di quattro spillamenti successivi per l'ottenimento dei valori di concentrazione 0.01, 0.1, 0.5 e di un valore prossimo ad 1 dipendente dalla quantità di farmaco presente nella porzione superiore del condotto principale e non ancora diffusa. Il livello 0 è stato direttamente ottenuto dall'ingresso contenente il *medium*. Un prototipo della piattaforma microfluidica realizzato per ottimizzare la distribuzione dei diversi componenti è mostrato in figura 2.1: il sistema prevede la disposizione della rete di microcanali e dei pozzetti di coltura in una struttura circolare di diametro pari a 12 cm.

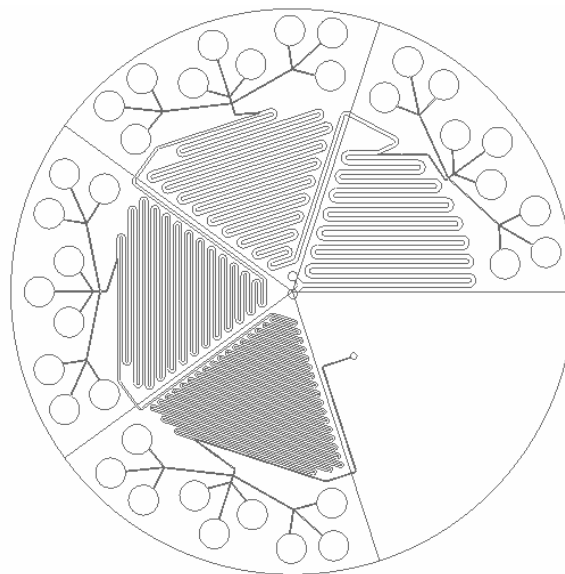


Figura 2.1 – Prototipo iniziale della piattaforma microfluidica.

2.3.1 Modello analitico

Le analisi sono state condotte mediante l'utilizzo di due *software* scritti in codice *Matlab* (*The Mathworks Inc.*) riportati in Appendice, realizzati in un precedente progetto di tesi e ottimizzati per le specifiche esigenze del presente lavoro a partire dalle equazioni riportate negli articoli di Gorman et al. (2008) e di Wu et al. (2005). Il primo consente di valutare il profilo di concentrazione del farmaco nel microcanale di riferimento mentre il secondo permette di ricavare le distanze di spillamento ottimali tali da garantire un valor medio di concentrazione desiderato una volta impostate le condizioni al contorno. Queste dipendono da alcuni parametri che l'utente deve inserire:

- Coefficiente di diffusione della specie chimica considerata
- Numero di canali di spillamento presenti nel dispositivo
- Portata desiderata in ognuno dei microcanali di spillamento
- Valori medi dei livelli di concentrazione di farmaco richiesti in ogni pozzetto
- Larghezza e profondità del condotto principale di riferimento

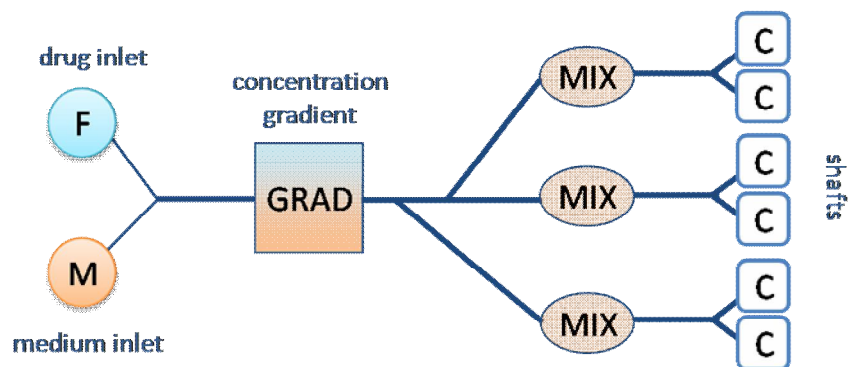
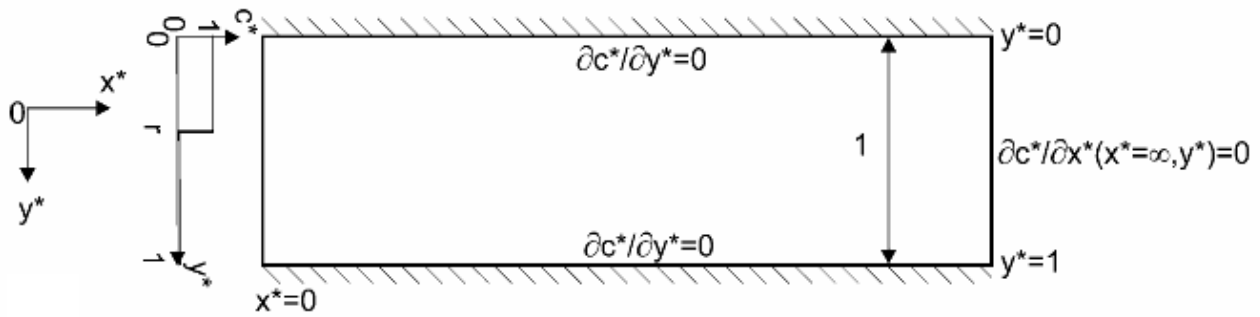


Figura 2.2 – Modello di dispositivo microfluidico basato su spillamenti successivi.

Il codice calcola le portate in ingresso al dispositivo di farmaco e mezzo di coltura, il valor medio dei vettori velocità in ogni singolo tratto ed il numero di *Péclet* [equazione 1.2]. Tali parametri sono utilizzati per la definizione dei livelli di concentrazione di farmaco, valutati punto per punto grazie alla definizione di una griglia di discretizzazione del dominio, e per il calcolo delle distanze alle quali effettuare gli spillamenti destinati alle colture cellulari.

In figura 2.3 viene riportato uno schema del modello bidimensionale implementato mediante codice *Matlab* per il calcolo del profilo di concentrazione del farmaco a seguito del processo diffusivo corredato dalla relativa equazione (Wu et al., 2005) direttamente ricavata dalle leggi di *Fick*.



$$c^*(x^*, y^*) = \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\sin(n\alpha\pi)}{n} \cos(n\pi y^*) \exp\left(-\frac{2n^2\pi^2}{Pe + \sqrt{Pe^2 + 4n^2\pi^2}} x^*\right) + \alpha \quad [2.1]$$

$n = 1, 2, 3, \dots$

Figura 2.3 – Modello analitico utilizzato per il calcolo del profilo di concentrazione del farmaco. [Wu et al., 2005]

Le grandezze caratterizzate dal simbolo * rappresentano parametri adimensionali: assumendo C_0 come concentrazione di riferimento e l'ampiezza del condotto W come dimensione caratteristica del problema vengono dunque ottenute le grandezze $C^* = c/C_0$, $X^* = x/W$ e $Y^* = y/W$.

Pe rappresenta il numero di Péclet [equazione 1.2] in cui v costituisce il valor medio del vettore velocità mentre D rappresenta il coefficiente di diffusione della specie chimica considerata.

Il parametro α costituisce una sorta di *offset* del problema e rappresenta il rapporto tra la portata Q_1 di mezzo di coltura e la portata complessiva in ingresso al sistema Q_1+Q_2 ; nel modello considerato le portate attraverso i due ingressi sono identiche e di conseguenza α risulta pari ad $1/2$.

L'equazione 2.1 precedentemente riportata viene utilizzata dal *software* per il calcolo del profilo di concentrazione fino al primo valore di spillamento e si basa su un ingresso a gradino caratterizzato da livelli di concentrazione pari a 0 ed 1 con interfaccia in corrispondenza dell'asse di simmetria del canale. I successivi profili di concentrazione vengono calcolati utilizzando l'equazione 2.2 sotto riportata ricavata da Gorman et al. (2008) che prevede in ingresso al sistema un generico profilo di concentrazione della specie chimica:

$$C^*(x^*, y^*) = A_0 + \sqrt{2} \sum_{n=1}^{\infty} A_n \cos(n\pi x^*) \exp\left(-\frac{2n^2\pi^2}{1 + \sqrt{1 + 4n^2\pi^2 / Pe^2}} y^*\right) \quad [2.2]$$

dove

$$A_0 = \int_0^1 f(x^*) dx^* \quad [2.3]$$

$$A_n = \sqrt{2} \int_0^1 f(x^*) \cos(n\pi x^*) dx^* \quad [2.4]$$

Il modello bidimensionale utilizzato presenta una serie di ipotesi semplificative: il flusso all'interno del microcanale a sezione rettangolare deve essere laminare in modo da evitare qualsiasi fenomeno di miscelamento dovuto ad effetti convettivi, i due fluidi inseriti devono presentare i medesimi valori di densità e viscosità ed in particolare il rapporto tra profondità e ampiezza del condotto deve essere inferiore all'unità per poter condurre a risultati ottimali. Da sottolineare infine l'utilizzo di valori medi di velocità e non dell'effettivo campo vettoriale con conseguente generazione di un errore intrinseco nel calcolo della soluzione del problema; in particolare l'errore commesso risulta significativo in prossimità della parete proprio dove avviene lo spillamento.

2.3.2 Simulazioni computazionali

Le analisi preliminari condotte utilizzando il modello analitico sono state affiancate da simulazioni computazionali realizzate mediante il codice commerciale *Fluent* (*Ansys Inc., Canonsburg, PA, USA*), comunemente utilizzato per la modellizzazione di molteplici fenomeni termofluidodinamici tra cui flussi di fluidi comprimibili o incompressibili, newtoniani o non newtoniani, laminari o turbolenti, in regime stazionario o tempo-variante all'interno di condotti bidimensionali o tridimensionali.

Le simulazioni effettuate hanno avuto come obiettivo la valutazione della diffusione dello stronzio ranelato all'interno di *medium* per colture cellulari in un condotto a sezione rettangolare con canali di spillamento. La soluzione del problema è stata calcolata inizialmente in un dominio bidimensionale in condizioni di regime stazionario, considerando un coefficiente di diffusione pari a $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

I passi seguiti nella definizione e nella soluzione del problema sono di seguito riassunti:

- Creazione della geometria del modello mediante *software* commerciali di disegno meccanico (*Rhinoceros, Robert McNeel & Associates*)
- Generazione della griglia di calcolo mediante un codice commerciale (*Gambit, Ansys Inc., Canonsburg, PA, USA*)
- Importazione della griglia e verifica della sua correttezza
- Definizione delle equazioni da risolvere
- Impostazione delle proprietà dei materiali utilizzati e delle condizioni al contorno del problema
- Ottimizzazione dei parametri di controllo della soluzione
- Inizializzazione del campo di flusso e calcolo della soluzione

- Analisi dei dati raccolti ed eventuale revisione della griglia impostata o del modello fisico e numerico utilizzato

Il modello fisico implementato in *Fluent* prevede la risoluzione delle equazioni di conservazione della massa e della quantità di moto per il fluido; in presenza di fenomeni diffusivi viene risolta una specifica equazione di conservazione della specie chimica presente. Le equazioni di conservazione, il modello di diffusione e le leggi di *Fick* sono trattati in Appendice.

I parametri del modello sono stati impostati come di seguito illustrato:

Formulazione: implicit

Formulazione velocità: absolute

Solutore: pressure based

Discretizzazione momentum: second order upwind

Discretizzazione della diffusione del farmaco: second order upwind

Pressure-velocity coupling: SIMPLE

Opzioni gradiente: least squares cell based

La precisione richiesta nelle simulazioni per poter monitorare il processo di diffusione del farmaco (figura 2.4) ha reso necessaria l'applicazione di uno schema risolutivo del secondo ordine; differenze significative sono state evidenziate rispetto ai risultati ottenuti mediante utilizzo di uno schema del primo ordine.

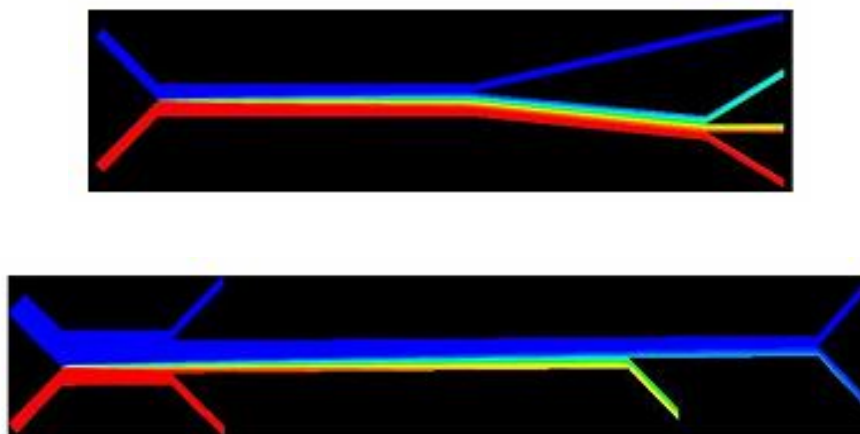


Figura 2.4 – Simulazioni relative alla diffusione del farmaco (rosso) all'interno del *medium* per colture cellulari (blu).

Considerando la necessità di garantire il riempimento dei 45 pozzetti di coltura previsti il livello inizialmente impostato di portata spillata è stato pari a $1.83 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$; la portata attraverso i due ingressi è stata dunque fissata a $3.66 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$.

I risultati raccolti dalle numerose simulazioni effettuate hanno mostrato come un progetto basato su spillamenti successivi sia incompatibile con le specifiche precedentemente definite: in presenza di portate ridotte il requisito di limitati tempi di riempimento tali da garantire la sopravvivenza cellulare non viene rispettato; viceversa l'impostazione di portate adeguate rispondenti alle specifiche (ad esempio una portata spillata pari a $2 \times 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$) non consente lo sviluppo di un gradiente di concentrazione ottimale e richiede microcanali caratterizzati da lunghezze particolarmente elevate.

In ogni circostanza inoltre si sottolinea la difficoltà nell'ottenere i livelli di concentrazione 0.1 e 0.5 a seguito dello spillamento iniziale a concentrazione 0.01; modifiche nei valori di portata o nell'ampiezza e nella profondità dei condotti non consentono in alcun modo di ottenere i risultati desiderati rispettando in pieno le specifiche di progetto.

A titolo esemplificativo si riporta il risultato di una simulazione condotta imponendo una portata di spillamento di $1.83 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$ con ampiezza e profondità del microcanale di partenza di $600 \text{ }\mu\text{m}$. I condotti di spillamento sono caratterizzati da ampiezza pari a $150 \text{ }\mu\text{m}$ mentre il parametro α precedentemente definito corrisponde a 0.5.

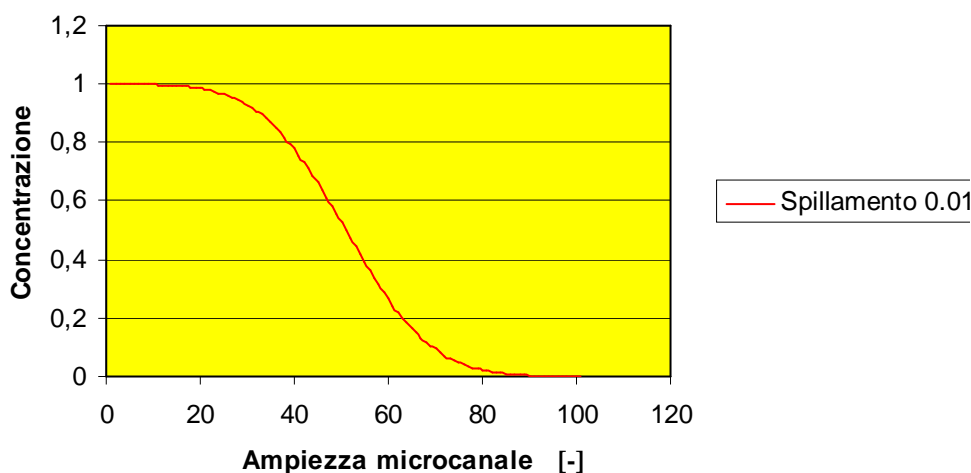


Figura 2.5 – Profilo di concentrazione del farmaco in corrispondenza del punto di spillamento 0.01

Il grafico in figura 2.5 mostra l'andamento del profilo di concentrazione in funzione dell'ampiezza del condotto normalizzata tra 0 e 100 in corrispondenza dello spillamento 0.01; dopo 1.88 cm il processo diffusivo ha consentito la generazione del primo livello di concentrazione desiderato

risultante dalla media dei valori di concentrazione sui primi 150 μm di ampiezza del microcanale rappresentati dalle ascisse comprese tra 75 e 100; lo spillamento del successivo valore 0.1 risulta impossibile dal momento che è già stato raggiunto un livello di concentrazione pari a 0.22 sull'ampiezza del condotto corrispondente alla seconda estrazione.

Analizzando i risultati ottenuti si è pensato di intraprendere una via alternativa basata sulla progettazione di un dispositivo “ibrido”: i livelli di concentrazione 0 ed 1 sono direttamente estratti dai canali di ingresso prima che confluiscono nel condotto principale; la concentrazione 0.5 è ottenuta tramite miscelazione diretta di uguali portate di farmaco e mezzo di coltura. Il processo diffusivo è sfruttato unicamente per ottenere i livelli di concentrazione 0.01 e 0.1. La rimanente quantità di *medium* e farmaco, caratterizzata da un livello di concentrazione superiore a 0.5, può essere utilizzata per condurre ulteriori test su altri campioni cellulari evitando in tal modo qualsiasi spreco. In figura 2.6 è mostrato uno schema del dispositivo disegnato sulla base delle nuove specifiche di progetto: il sistema è realizzato su una struttura in PDMS di forma quadrata di lato 7.18 cm e prevede la disposizione di 45 pozzetti di coltura.

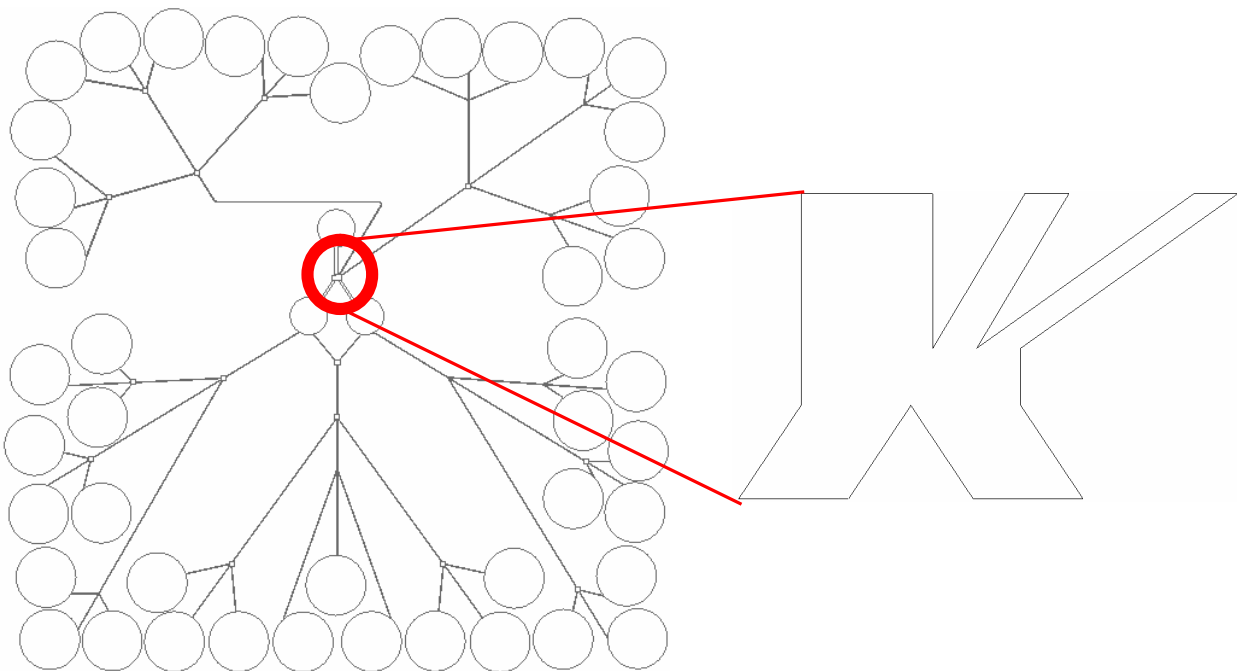


Figura 2.6 – Prototipo del dispositivo “ibrido” in cui il processo diffusivo è responsabile della generazione dei soli livelli di concentrazione 0.01 e 0.1

Al fine di valutare le lunghezze di spillamento per ottenere le concentrazioni di farmaco pari a 0.01 e 0.1 sono stati realizzati modelli computazionali bidimensionali con il codice *Fluent*. Sulla base di

dati presenti in letteratura (Hattori et al., 2009) è stata impostata una portata di 0.015 $\mu\text{l}/\text{min}$ per ognuno dei due ingressi del sistema. Risultati ottimali sono stati ottenuti in presenza di microcanale centrale caratterizzato da ampiezza 530 μm e profondità 50 μm con ingressi dotati di ampiezza 260 μm . Come mostrato in figura 2.7 il primo punto di spillamento è localizzato dopo 800 μm mentre il successivo dopo ulteriori 250 μm . Le resistenze fluidodinamiche sono studiate per garantire le portate desiderate in ognuna delle tre linee (portata spillata pari a 0.004 $\mu\text{l}/\text{min}$): i microcanali di spillamento sono caratterizzati da ampiezza 120 μm e lunghezza 10 mm mentre il condotto destinato al pozzetto di scarto presenta ampiezza 250 μm e lunghezza 14.9 mm. La griglia di calcolo generata è caratterizzata da 568232 elementi quadrilatero con infittimento in corrispondenza dei punti critici del dominio, ovvero dove il condotto principale presenta delle biforcazioni. La portata volumetrica stabilita in base ai dati presenti in letteratura è stata garantita attraverso l'imposizione di una condizione di velocità di 1.923×10^{-5} m/s (profilo piatto) in ogni ingresso mentre in corrispondenza delle uscite del sistema è stata adottata una condizione di pressione atmosferica. Infine una condizione di “no slip” è stata assunta alle pareti dei microcanali. Il profilo di velocità è visibile nella mappa colorimetrica riportata in figura 2.7: è possibile osservare una significativa deviazione del flusso in corrispondenza dei due punti di spillamento a causa della ridotta resistenza fluidodinamica presente nel canale di scarto; i dati ottenuti mostrano come le portate rilevate nei due condotti di spillamento siano prossime a quelle desiderate e pari a 0.00373 $\mu\text{l}/\text{min}$.

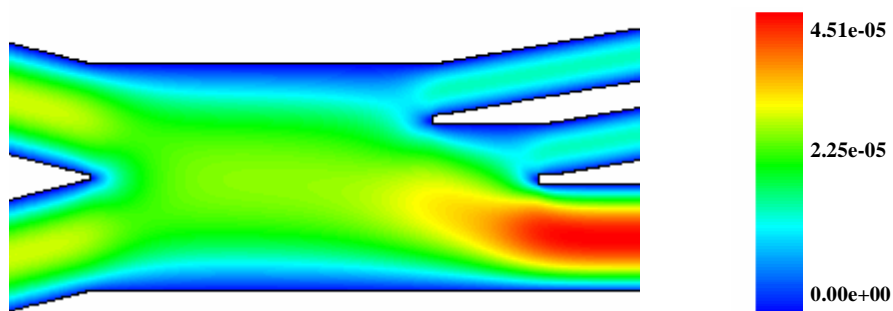


Figura 2.7 – Mappa colorimetrica delle velocità [m/s] in corrispondenza del punto di spillamento.

Il processo di miscelazione del farmaco è stato simulato utilizzando un coefficiente di diffusione pari a 1×10^{-10} m^2/s . Mezzo di coltura e farmaco sono stati considerati fluidi newtoniani caratterizzati da densità 1000 kg/m^3 e viscosità 0.001 $\text{kg}/(\text{m}\cdot\text{s})$. Come mostrato nella mappa colorimetrica in figura 2.8 i valori di concentrazione di farmaco presenti nei due canali di spillamento risultano pari a 0.0109 e 0.1019 mentre nel canale di scarto, utilizzabile per eventuali test aggiuntivi, si registra un valore di 0.6465. I dati raccolti, seppur ricavati da simulazioni

bidimensionali, sono stati utilizzati per la fabbricazione di un primo dispositivo, realizzato presso la fondazione FBK di Trento, di cui verranno proposti i risultati sperimentali nel capitolo 3.

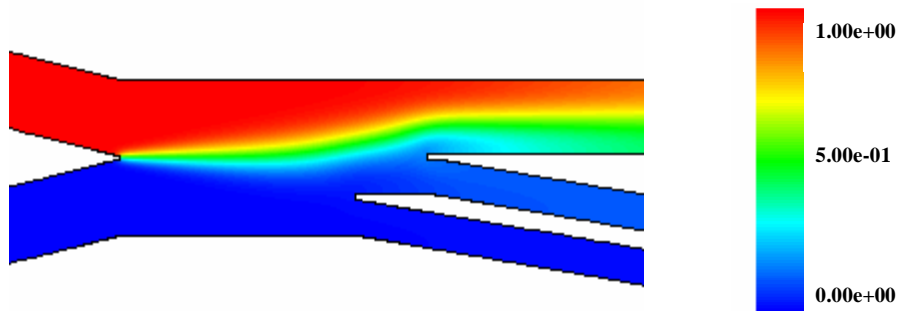


Figura 2.8 – Mappa colorimetrica relativa al processo di diffusione del farmaco (rosso) nel mezzo di coltura (blu)

La necessità di garantire adeguati tempi di riempimento, compatibili con una coltura cellulare, ha richiesto l'impostazione di portate significativamente più elevate; i risultati migliori, sebbene non ottimali rispetto alla richiesta di garantire i livelli di concentrazione 0.01 e 0.1, sono stati ottenuti con portate nei due ingressi di $12 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$. L'ampiezza del microcanale deputato all'iniezione del farmaco è stata fissata a $236 \text{ }\mu\text{m}$ mentre quella relativa al condotto per l'inserimento del mezzo di coltura a $354 \text{ }\mu\text{m}$; la profondità è stata impostata a circa $600 \text{ }\mu\text{m}$. Il tratto iniziale necessario per la parziale diffusione del farmaco è risultato di 8.8 cm . Rispetto al progetto precedentemente esposto è stata modificata l'area di spillamento così da poter ottenere nei due condotti di interesse le portate desiderate con i corretti livelli di concentrazione; sono stati quindi realizzati otto microcanali caratterizzati da differenti resistenze fluidodinamiche (figura 2.9):

- Un condotto per lo spillamento del livello 0.01 di lunghezza 3.4 mm ed ampiezza $100 \text{ }\mu\text{m}$
- Un microcanale per lo spillamento del livello 0.1 di lunghezza $820 \text{ }\mu\text{m}$ con ampiezza $60 \text{ }\mu\text{m}$
- Un condotto di lunghezza $615 \text{ }\mu\text{m}$ ed ampiezza $50 \text{ }\mu\text{m}$ affiancato da cinque microcanali di lunghezza $650 \text{ }\mu\text{m}$ con ampiezza $40 \text{ }\mu\text{m}$ disposti simmetricamente rispetto ai primi due, deputati a limitare l'alterazione della fluidodinamica locale e quindi i livelli di concentrazione di farmaco nei due microcanali di interesse.

Le resistenze sono studiate per poter assicurare una portata di $5 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$ nei due spillamenti destinati ai pozzetti di coltura (volume totale $1800 \text{ }\mu\text{l}$ e tempo di riempimento 60 min), $4 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$ nel condotto da $50 \text{ }\mu\text{m}$ e $10 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$ equamente distribuiti nei cinque microcanali da $40 \text{ }\mu\text{m}$.

Per poter ottimizzare i tempi di calcolo necessari per il completamento delle simulazioni bidimensionali è stato precedentemente testato il tratto di imbocco del dispositivo con il successivo canale di miscelamento fino ad una lunghezza di 8.677 cm ; in seguito il profilo di velocità e la

curva di concentrazione del farmaco sono stati estratti ed utilizzati per la realizzazione della simulazione del punto di spillamento; la griglia di calcolo utilizzata per questo ultimo tratto ha previsto 41675 quadrilateri con infittimento in corrispondenza delle biforcazioni; l'uscita dei condotti è stata posta a pressione atmosferica mentre alle pareti è stata fissata una condizione di “no slip”.

In figura 2.9a viene riportata una mappa colorimetrica del profilo di velocità in corrispondenza del punto di spillamento. La portata viene distribuita in modo adeguato secondo quanto previsto dai calcoli analitici che avevano condotto alla definizione delle resistenze fluidodinamiche dei micro canali. La diffusione del farmaco viene invece proposta in figura 2.9b: il valor medio di concentrazione presente nei due canali di interesse risulta rispettivamente di 0.001 e 0.11 con un brusco gradino in corrispondenza del terzo microcanale dove si registra una concentrazione di 0.583 (figura 2.10).

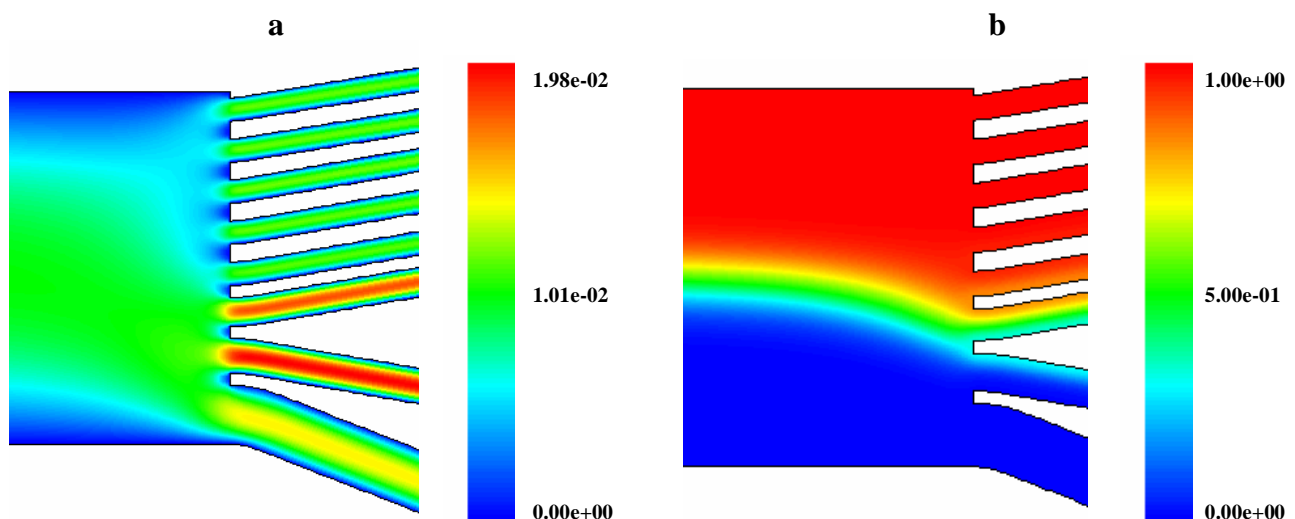


Figura 2.9 – Mappa colorimetrica delle velocità [m/s] in corrispondenza del punto di spillamento (a) e mappa colorimetrica relativa alla distribuzione del farmaco (rosso) all’interno del *medium* (b).

Non è stato possibile ottenere le concentrazioni definite nelle specifiche del dispositivo. Si ritiene che attraverso l’allungamento del microcanale centrale sia possibile ottenere un andamento del profilo di concentrazione più graduale tale da consentire l’ottenimento dei livelli di farmaco ottimali; tuttavia un sistema basato unicamente su processi diffusivi e su microcanali di spillamento risulta fortemente influenzato dal valore del coefficiente di diffusione, da difetti di fabbricazione e da particolari condizioni sperimentali.

Pertanto si è stabilito di realizzare un sistema che consenta l’ottenimento delle concentrazioni richieste attraverso il miscelamento di portate proporzionali di farmaco e mezzo di coltura.

La progettazione del dispositivo, le simulazioni effettuate e la discussione dei risultati saranno trattate nei paragrafi successivi.

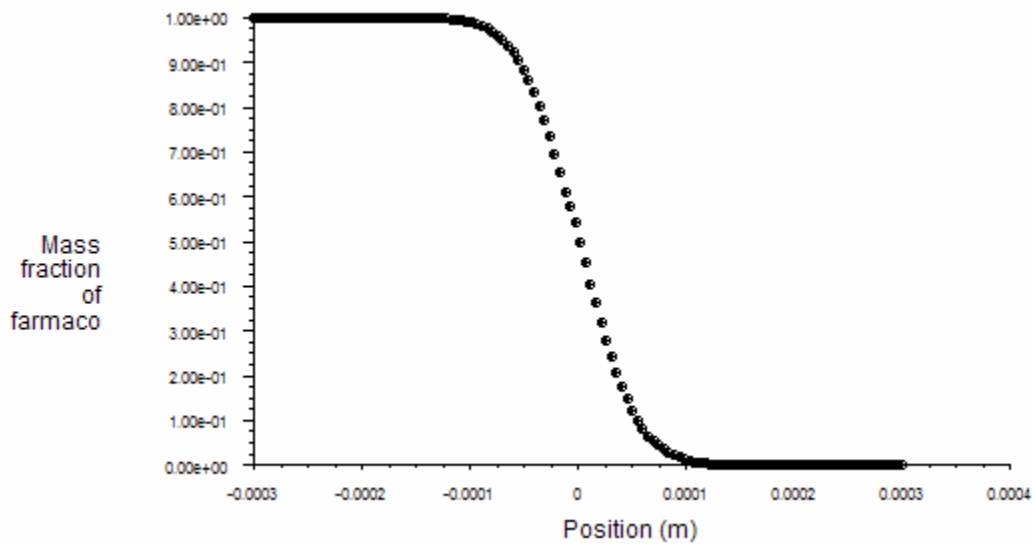


Figura 2.10 – Profilo di concentrazione del farmaco in funzione dell'ampiezza del microcanale (600 µm) in corrispondenza del punto di spillamento.

2.4 La soluzione progettuale sviluppata: dispositivo microfluidico innovativo

Nel paragrafo precedente è stata mostrata la progettazione di due possibili soluzioni per la realizzazione di un dispositivo in grado di generare un gradiente di concentrazione di farmaco su una popolazione cellulare; un sistema basato unicamente sul processo diffusivo e sull'inserimento di microcanali di spillamento ha evidenziato la presenza di numerose problematiche progettuali dovute principalmente alla difficoltà di ottimizzare le portate desiderate, i tempi di riempimento dei pozzetti di coltura ed i livelli di concentrazione del farmaco. Nei seguenti paragrafi viene proposta una soluzione basata sulla miscelazione di portate proporzionali di mezzo di coltura e farmaco in grado di generare le concentrazioni richieste e allo stesso tempo erogare portate che permettano un rapido riempimento dei pozzetti.

2.4.1 Progettazione e ottimizzazione del dispositivo

Il sistema microfluidico prevede due differenti reti per l'erogazione del farmaco e del mezzo di coltura mediante due pompe a siringa; i condotti principali sono disposti sulla circonferenza del dispositivo in PDMS mentre canali di spillamento adeguatamente progettati consentono l'estrazione di portate proporzionali di fluido che si misceleranno in corrispondenza dei punti di intersezione. Le concentrazioni 0 ed 1 sono estratte immediatamente a valle delle pompe mentre le rimanenti tre concentrazioni sono ottenute attraverso l'utilizzo di tre *micromixer* disposti nei punti di incrocio dei due circuiti. La sostanziale differenza tra questa soluzione e quella proposta nel paragrafo 2.3

risiede nel fatto che le concentrazioni di farmaco desiderate vengono ottenute indipendentemente dalla cinetica di diffusione del farmaco stesso; ciò garantisce una maggior versatilità e quindi la possibilità di effettuare test con qualsiasi tipo di farmaco (figura 2.11).

Il dispositivo è composto da una rete di microcanali, *mixer* per la miscelazione di farmaco e mezzo di coltura e sistemi di distribuzione alle cellule. E' stata adottata una piattaforma circolare con diametro 9 cm. Per quanto riguarda la tecnica di fabbricazione utilizzata si rimanda al paragrafo 1.3.

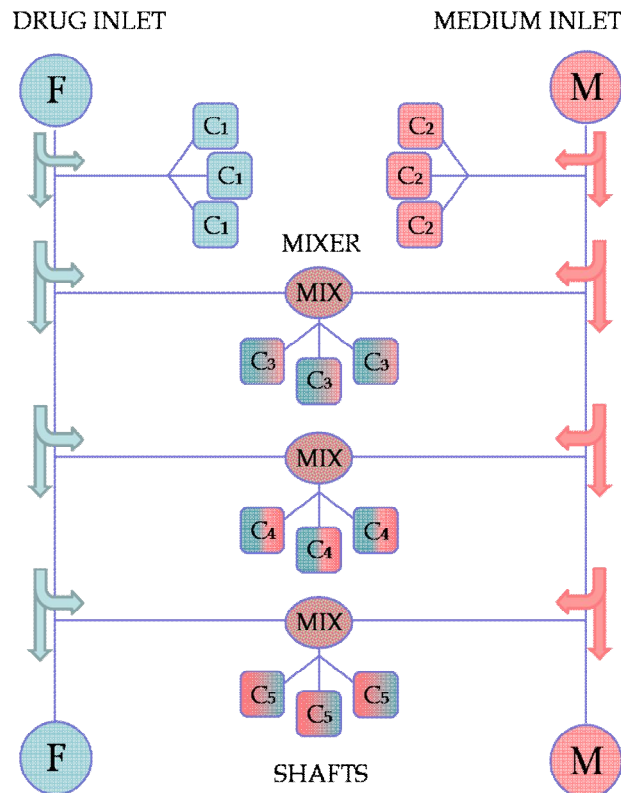


Figura 2.11 – Rappresentazione schematica del dispositivo microfluidico.

Al fine di ottenere un riempimento omogeneo dei pozzetti cellulari è stato necessario ottimizzare le resistenze fluidodinamiche delle differenti porzioni di circuito con lo scopo di garantire uguali perdite di carico nei rami in parallelo e portate ottimali. In corrispondenza di ogni punto di spillamento, inoltre, le perdite di carico presenti nelle due differenti reti fluidodinamiche devono essere identiche per soddisfare la legge di *Kirchhoff* delle tensioni.

A causa delle specifiche dimensionali stabilite l'ottimizzazione è stata condotta principalmente inserendo in alcuni punti delle strozzature per incrementare l'entità delle perdite di carico. I condotti hanno ampiezza non inferiore a 50 μm dovuta alla risoluzione del processo di microfabbricazione, al fine di non introdurre difetti significativi. Tutti i microcanali sono caratterizzati inoltre da una profondità di 500 μm .

La progettazione del dispositivo microfluidico è stata condotta inizialmente mediante un approccio analitico attraverso la realizzazione dell'equivalente elettrico del circuito; il sistema è stato suddiviso in una serie di componenti analizzabili separatamente ed è stata adottata una trattazione a parametri concentrati per modellizzare le perdite di carico distribuite e localizzate in ogni singolo tratto.

Simulazioni computazionali sono state effettuate con lo scopo di valutare la bontà dei calcoli analitici e migliorare progressivamente la soluzione.

2.4.2 Equivalente elettrico del circuito

Il dispositivo microfluidico è stato modellizzato mediante una rete elettrica puramente resistiva di cui viene proposto uno schema in figura 2.12: detta Q la portata erogata da ognuna delle due pompe a siringa di alimentazione il sistema deve assicurare per ciascuno dei cinque blocchi composti da nove pozzetti di coltura una portata pari a $Q/4$; considerando quindi che a valle dei due sistemi pompanti vengono estratte le concentrazioni di farmaco 0 ed 1 le portate a disposizione per l'ottenimento dei rimanenti livelli di farmaco risultano pari a $0.75Q$.

Il criterio logico seguito durante la progettazione è stato quello di creare un primo livello destinato all'ottenimento della concentrazione 0.5 e alla disposizione dei relativi nove pozzetti di coltura per poi procedere con la realizzazione dei livelli 0.1 e 0.01 rispettivamente; per questo motivo due portate identiche e pari a $Q/8$ sono spillate dai rami di farmaco e mezzo di coltura per il livello 0.5, il sistema di pozzetti con concentrazione 0.1 è alimentato con portate pari a $(0.9/4)Q$ lato *medium* e $(0.1/4)Q$ lato farmaco mentre il livello 0.01 riceve $(0.99/4)Q$ dalla rete di distribuzione del mezzo e $(0.01/4)Q$ dal circuito del farmaco.

Le rimanenti quantità di fluido presenti nelle due reti fluidodinamiche vengono convogliate verso un pozzetto di recupero nel quale non avverrà alcun miscelamento; gli sprechi vengono completamente azzerati dal momento che i due fluidi possono essere facilmente recuperati e utilizzati per altre applicazioni oppure in fase di ricambio del *medium* fornito alle cellule.

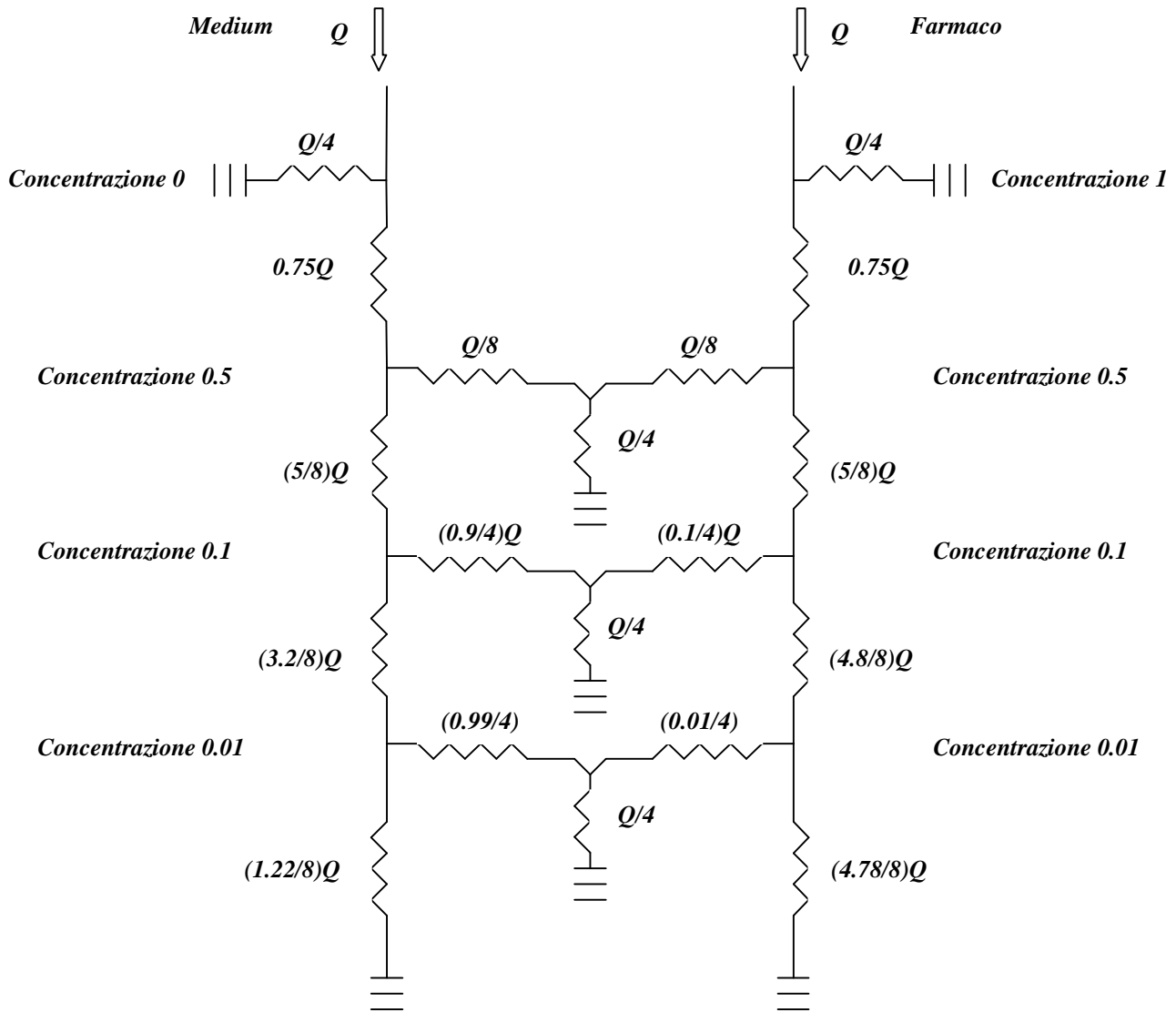


Figura 2.12 – Equivalente elettrico del circuito.

2.4.3 Perdite di carico

L'analisi del sistema è stata condotta valutando le perdite di carico distribuite e concentrate; le prime sono state calcolate mediante la relazione di *Poiseuille* adattata per condotti a sezione rettangolare in condizioni di moto laminare e profilo sviluppato di velocità:

$$\Delta P = Q \cdot R \quad R = \frac{12 \cdot \mu \cdot \ell}{w \cdot h^3} \quad [2.5]$$

dove **Q** rappresenta la portata, **R** la resistenza fluidodinamica del circuito, **μ** la viscosità del fluido considerato, **w** la larghezza del condotto, **h** la profondità ed **l** la lunghezza.

Le perdite di carico concentrate sono state calcolate in corrispondenza di bruschi allargamenti o restringimenti dei microcanali oltre che nei punti di biforcazione o confluenza; la relazione utilizzata, basata su un legame quadratico tra caduta di pressione e portata, viene di seguito riportata:

$$\Delta P = \frac{1}{2} \xi \rho v^2 \quad [2.6]$$

dove ρ rappresenta la densità del fluido, v la velocità e ξ il fattore di resistenza.

Il parametro ξ è stato assunto pari ad 1 in presenza di bruschi allargamenti e a 0.5 in corrispondenza di repentini restringimenti dei condotti; nei punti di biforcazione ξ assume valore 0.2 per il microcanale che prosegue con la medesima direzione del condotto a monte ed 1 per la linea che subisce un cambio di direzione; viceversa in caso di confluenze il fattore di resistenza assume valori compresi tra 0.3 e 0.7 in funzione dell'inclinazione dei condotti secondo lo stesso principio descritto per i punti di biforcazione.

2.4.4 Progettazione della rete di distribuzione ai pozzetti di coltura

I pozzetti di coltura utilizzati nel presente dispositivo sono caratterizzati da un diametro di 6.4 mm e da un volume di 200 μ l; le portate delle due pompe a siringa sono state impostate a 0.0000002 m³/s così da garantire un rapido riempimento di ogni singolo pozzetto. Il tempo stimato per il raggiungimento del volume di 200 μ l è risultato pari a 36 secondi; come esposto nel paragrafo 2.4.8 relativo alla progettazione del sistema di distribuzione alle cellule del fluido, l'erogazione avviene a pioggia mediante 36 fori al fine di limitare le sollecitazioni meccaniche sulle cellule presenti nel pozzetto.

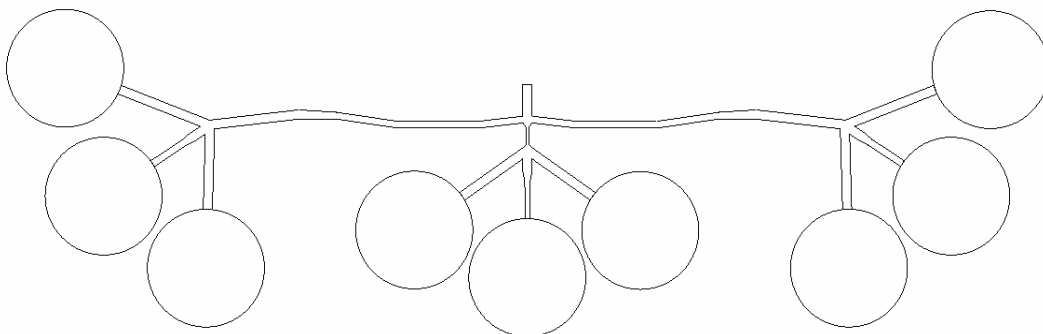


Figura 2.13 – Rete di distribuzione della miscela di farmaco e *medium* ai pozzetti di coltura.

In figura 2.13 è proposto lo schema della rete di distribuzione ai nove pozzetti di coltura; lunghezze e larghezze dei condotti sono progettate rispettando i vincoli di spazio e la necessità di garantire uguali portate ($5.555 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$) ad ogni popolazione cellulare. Tale sistema di distribuzione è utilizzato per ognuno dei tre livelli di concentrazione basati sul miscelamento di *medium* e farmaco. L'unità strutturale riportata in figura 2.13 è costituita da tre sottosistemi: un blocco composto dai tre pozzetti centrali e due formati dai tre pozzetti laterali.

La progettazione del blocco centrale ha previsto la realizzazione di due condotti laterali con inclinazione 55° , lunghezza 3.8 mm e ampiezza 500 μm e di un canale centrale caratterizzato da una lunghezza di 3.2 mm e da una ampiezza di 500 μm con restringimento graduale a 250 μm ; calcoli effettuati tenendo conto delle perdite distribuite, del progressivo restringimento e della suddivisione del flusso hanno evidenziato una caduta di pressione nei tre rami confrontabile e prossima ad 11.75 Pa. Seguendo il medesimo principio i due sottosistemi laterali sono stati progettati con un canale centrale di lunghezza 3.3 mm ed ampiezza variabile tra 500 e 370 μm e con canali laterali caratterizzati da ampiezza 500 μm e lunghezze di 4.8 e 4 mm rispettivamente. Le perdite di carico registrate sono prossime a 14 Pa.

La distribuzione delle portate alle sottounità costituite da tre pozzetti avviene attraverso due condotti laterali di circa 16 mm dotati di ampiezza variabile tra 350 e 500 μm e mediante un microcanale destinato al blocco centrale caratterizzato da una lunghezza di 1 mm e da una ampiezza di 130 μm ; la rete progettata determina una perdita complessiva nei tre sottosistemi di distribuzione di circa 240 Pa. Il sistema di distribuzione è stato successivamente valutato mediante simulazioni effettuate con il codice di calcolo *Fluent* a seguito delle quali, come esposto nel relativo paragrafo 2.5.4, sono state realizzate piccole modifiche tali da garantire l'effettiva ripartizione delle portate desiderate.

Il sistema di distribuzione del fluido alle popolazioni cellulari sottoposte alle concentrazioni 0 ed 1 di farmaco (figura 2.14) prevede la realizzazione di microcanali con resistenze completamente differenti rispetto a quelle progettate per i rimanenti livelli di concentrazione.

Il blocco di pozzetti centrale prevede un microcanale di ampiezza 500 μm e lunghezza prossima ai 7 mm e due canali laterali di circa 5.5 mm con ampiezza 500 μm ; i due sottosistemi laterali presentano invece un condotto centrale di 6 mm con ampiezza variabile tra 500 e 450 μm e due canali laterali lunghi 4.5 mm e larghi 500 μm .

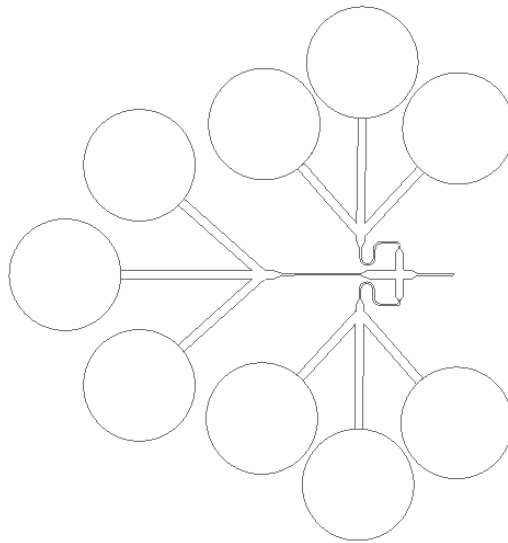


Figura 2.14 – Rete di distribuzione del fluido con concentrazione 0 ed 1 di farmaco.

Un condotto di 4.5 mm con ampiezza 100 μm con inserimento di due tratti di lunghezza complessiva 3 mm con ampiezza 500 μm garantisce l'approvvigionamento del blocco centrale mentre dei condotti di circa 4 mm con ampiezza 100 μm corredati da un breve tratto di 1 mm largo 500 μm riforniscono le unità laterali; anche in questo caso le perdite di carico risultano in prima approssimazione bilanciate così da garantire una equa distribuzione delle portate.

2.4.5 Progettazione dei micromixer

Il dimensionamento dei *micromixer* per la miscelazione di farmaco e mezzo di coltura è stato effettuato tenendo conto del fatto che i sistemi devono garantire un perfetto mescolamento delle due specie chimiche, evitando che i nove pozzetti a valle siano riforniti con livelli di concentrazione disomogenei; è necessario inoltre che i *mixer* siano compatti, a causa del limitato spazio a disposizione. Infine, come sottolineato nel lavoro di tesi di Nason F. e Romanelli E. "Approccio combinato sperimentale e computazionale per l'analisi di *micromixer* passivi integrabili su *lab-on-a-chip*", il numero di *Reynolds* dovrebbe essere elevato ($Re \approx 100$) così da attivare un processo di miscelamento efficace (le portate inizialmente impostate sono state pensate anche in funzione di tale specifica). Il modello di *micromixer* adottato prevede un profilo a dente di sega con sfasamento nullo tra creste e valli con profondità 500 μm e sezione di passaggio pari al 20% (100 μm x 500 μm) di quella del condotto di uscita. I tre sistemi di miscelazione proposti per l'ottenimento delle concentrazioni 0.01, 0.1 e 0.5 prevedono microcanali di ingresso di dimensioni differenti, come verrà in seguito trattato, ma sono caratterizzati da un tratto di uscita di lunghezza comune 1.734 mm

necessario per assicurare la generazione di un profilo sviluppato prima della ripartizione nei nove pozzetti di coltura. I singoli segmenti dei *mixer* presentano una lunghezza di 265 μm mentre l'angolo tra due porzioni consecutive è di 81.8° .

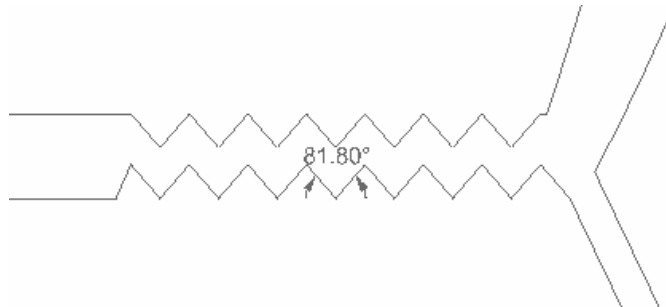


Figura 2.15 – Modello di *micromixer* utilizzato per l'ottenimento della concentrazione 0.01

Le lunghezze dei *mixer* sono differenti per ognuno dei tre livelli di concentrazione richiesti:

- 2.514 mm per il *mixer* deputato all'ottenimento della concentrazione 0.01 (figura 2.15)
- 2.426 mm per il *mixer* utilizzato in corrispondenza del livello di concentrazione 0.1
- 2.946 mm per il *mixer* destinato al livello di concentrazione 0.5

Come evidente il caso critico è rappresentato dalla concentrazione 0.5 che richiede un *mixer* di lunghezza superiore rispetto agli altri due casi per poter ottenere una distribuzione omogenea di farmaco.

I calcoli analitici tengono conto della perdita di carico distribuita all'interno del *micromixer*, ipotizzando una sezione di passaggio di $100\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$, della caduta di pressione nel tratto di uscita oltre che delle perdite concentrate dovute al brusco restringimento ed al repentino allargamento del condotto. Le perdite stimate risultano rispettivamente di 3500 Pa, 3400 Pa e 3950 Pa per i *mixer* destinati ai livelli di concentrazione 0.01, 0.1 e 0.5; si sottolinea come i calcoli effettuati tenendo conto di una sezione di passaggio di soli $100\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ comportino una sovrastima delle cadute di pressione come risulterà evidente dalle simulazioni numeriche in cui i dati rilevati risulteranno generalmente inferiori a quanto riportato nel presente paragrafo.

La valutazione delle perdite di carico nel resto del capitolo terrà conto delle simulazioni preventivamente effettuate sui *micromixer* trascurando i calcoli analitici realizzati su questi componenti.

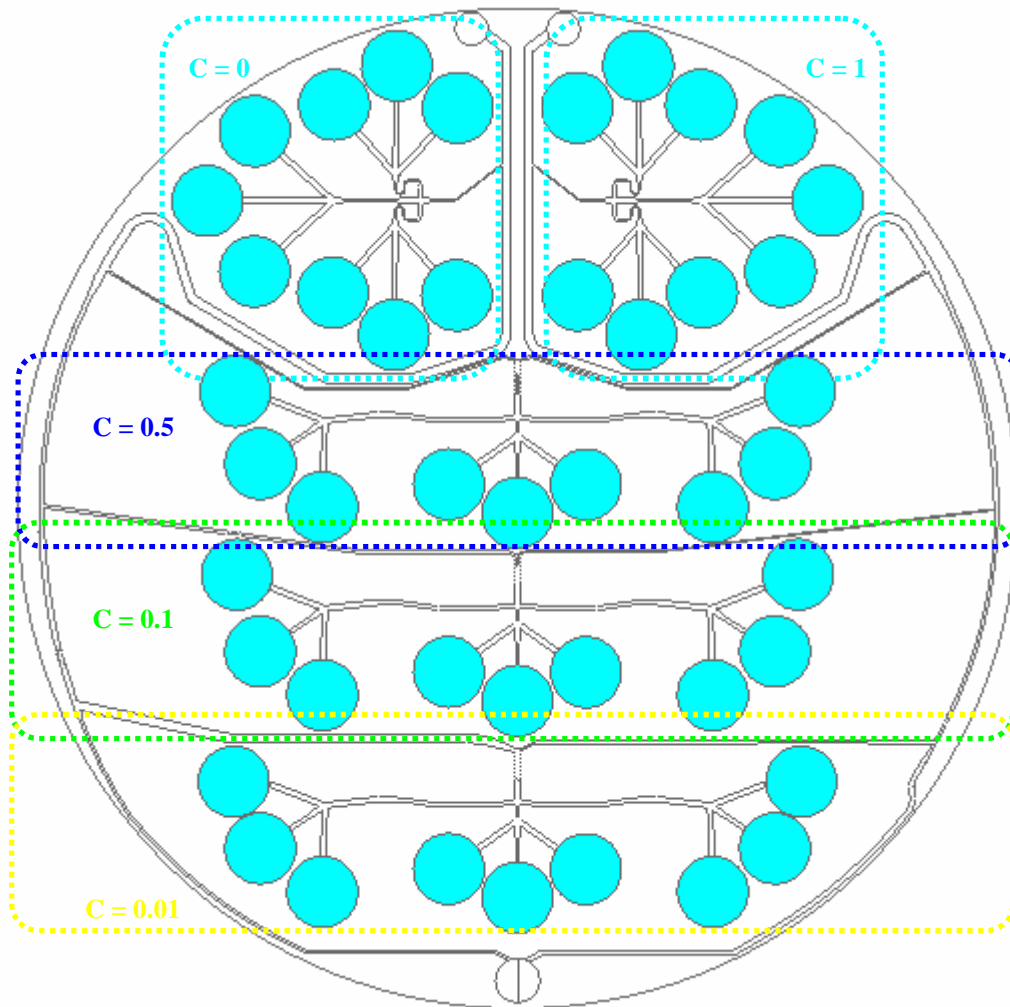


Figura 2.16 – Disegno completo del dispositivo microfluidico realizzato su una piattaforma circolare con diametro 9 cm.

2.4.6 Progettazione della rete di distribuzione del mezzo di coltura

Il circuito destinato alla ripartizione del mezzo di coltura riportato nella porzione sinistra del disegno CAD (figura 2.16) è stato suddiviso in quattro differenti sezioni analizzabili separatamente e successivamente simulate mediante CFD.

La progettazione è partita dalla porzione più a valle del circuito in corrispondenza del terzo punto di spillamento (concentrazione farmaco 0.01) ed ha riguardato da una parte il microcanale destinato al pozzetto di recupero e dall'altra il condotto fino all'imbocco del *micromixer* (figura 2.17). Come trattato nel paragrafo "Progettazione e ottimizzazione del dispositivo" è stato necessario assicurare uguali perdite di carico nei due settori con ripartizione delle portate basata sul rapporto tra le resistenze fluidodinamiche dei condotti. Considerando un canale di spillamento di lunghezza 39.5 mm, pressoché fissata date le dimensioni complessive del dispositivo, e di ampiezza 800 μm , sufficientemente ampio tale da evitare significative perdite di carico data l'elevata portata fornita attraverso di esso, è stato stabilito di realizzare un condotto destinato al pozzetto di scarto di circa

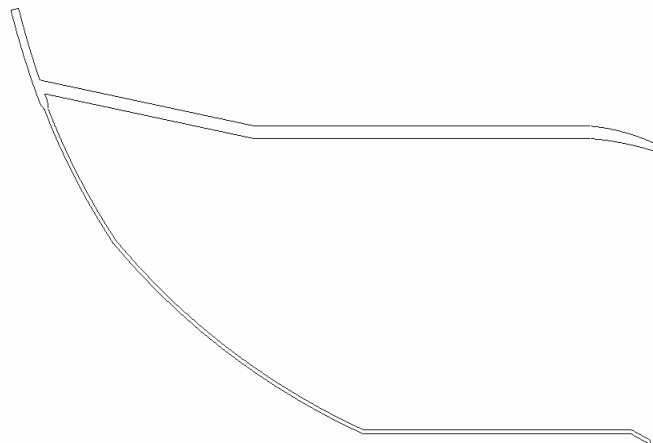


Figura 2.17 – Rappresentazione del terzo punto di spillamento relativo alla concentrazione 0.01 di farmaco.

49.2 mm dotato di ampiezza 250 μm ; dal momento che la portata destinata al pozzetto di recupero (posto a pressione atmosferica) è pari a $(1.22/8)Q$ risulta nel tratto considerato una caduta di pressione di circa 3550 Pa che equilibra la perdita di carico presente tra il punto di spillamento ed i pozzetti di coltura e pari a 3560 Pa, composta da 240 Pa (sistema di distribuzione dei nove pozzetti) + 2850 Pa (*micromixer*) + 470 Pa (canale di spillamento).

Seguendo un analogo principio di lavoro sono state definite le dimensioni dei microcanali presenti a monte: il condotto presente tra il secondo spillamento (concentrazione 0.1) ed il terzo spillamento (concentrazione 0.01) nel quale scorre una portata pari a $(3.2/8)Q$ è stato realizzato con una

lunghezza di circa 17.6 mm e con una ampiezza di 500 μm ; la lunghezza è stata stabilita sulla base di esigenze di organizzazione funzionale del sistema mentre la larghezza è stata scelta in modo da evitare significative perdite di carico e allo tempo consentire la fabbricazione di un condotto con rapporto tra le dimensioni caratteristiche pari ad uno, dotato quindi di elevata stabilità (figura 2.18).



Figura 2.18 – Disegno CAD del secondo spillamento relativo alla concentrazione 0.1 di farmaco.

Il canale di spillamento è stato progettato con lunghezza 42.8 mm ed ampiezza 300 μm ; per poter equilibrare le perdite di carico presenti tra il secondo punto di spillamento e i pozzetti di coltura/pozzetto di recupero posti a pressione atmosferica sono stati inseriti dei *mixer* (sezione di passaggio pari al 20% della sezione di uscita) di 1.6 mm nel condotto di distribuzione e di 1.7 mm in quello di spillamento in grado di generare perdite di carico localizzate e consentire il rispetto delle specifiche di progetto; la caduta di pressione complessiva rilevata in corrispondenza della biforcazione è stata prossima a 8800-9000 Pa. Le simulazioni computazionali mostreranno in seguito un valore inferiore di pressione ed un perfetto equilibrio tra i due rami considerati: i calcoli eseguiti analiticamente pesano infatti in modo eccessivo le perdite concentrate presenti all'interno del circuito.

Successivamente sono state identificate delle dimensioni ottimali per i microcanali presenti a monte: la lunghezza del condotto di distribuzione (portata $5/8 Q$) presente tra primo spillamento (concentrazione 0.5) e secondo spillamento (concentrazione 0.1) è stata fissata a 21.9 mm mentre l'ampiezza impostata è stata pari a 400 μm secondo gli stessi principi descritti al punto precedente (tratto di imbocco di 800 μm); il canale di spillamento è stato progettato con un'ampiezza di 150 μm

e con una lunghezza, quasi predeterminata, di circa 40.1 mm; la perdita di carico rilevata in corrispondenza della biforcazione è stata di circa 11300 Pa (figura 2.19).

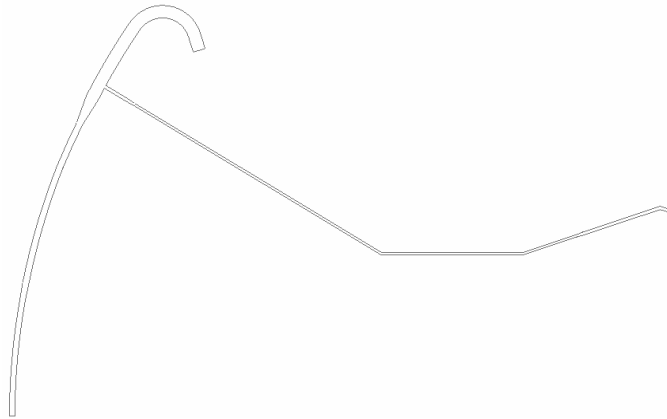


Figura 2.19 – Rappresentazione del punto di spillamento con concentrazione 0.5 di farmaco.

Viene ora riportato il disegno CAD dell'ultimo tratto preso in esame situato tra la pompa a siringa ed il punto di spillamento della concentrazione 0.5 di farmaco (figura 2.20): il condotto principale, caratterizzato da una lunghezza di circa 62.1 mm, è stato progettato con un'ampiezza di ben 800 μm così da evitare elevate cadute di pressione a causa dell'elevata portata presente, pari a 0.75Q; la perdita di carico rilevata in corrispondenza del punto di biforcazione riportato in figura 2.20 risulta quindi prossima ai 13200 Pa; per poter assicurare un uguale ΔP anche nel blocco composto dai nove pozzetti di coltura è stato utilizzato un microcanale di circa 8.3 mm con ampiezza 100 μm destinato al trasferimento del fluido a concentrazione 0 al sistema di distribuzione.

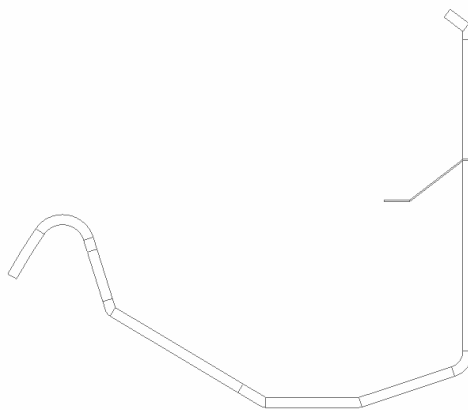


Figura 2.20 – Disegno CAD del tratto di circuito compreso tra la pompa a siringa ed il punto di spillamento della concentrazione 0.5 di farmaco.

2.4.7 Progettazione della rete di distribuzione del farmaco

Come precedentemente trattato è stato necessario garantire uguali perdite di carico in corrispondenza dei nodi principali delle due reti di distribuzione di farmaco e *medium* per colture cellulari. I calcoli analitici effettuati hanno consentito il dimensionamento dei diversi microcanali, caratterizzati da una profondità di 500 μm , i cui valori sono di seguito riportati in modo schematico in tabella 2.1.

	<i>Lunghezza [mm]</i>	<i>Larghezza [μm]</i>
<i>Blocco spillamento 0.01</i>		
Microcanale di spillamento	37.2	200
Microcanale di distribuzione	45.8	430
<i>Blocco spillamento 0.1</i>		
Microcanale di spillamento	42.9	100
Microcanale di distribuzione	21.9	250
<i>Blocco spillamento 0.5</i>		
Microcanale di spillamento	40.1	150
Microcanale di distribuzione	22.4	400
<i>Blocco spillamento 1</i>		
Microcanale di spillamento	8.3	100
Microcanale di distribuzione	62.1	800

Tabella 2.1 – Calcoli analitici relativi alla progettazione della rete di distribuzione del farmaco.

2.4.8 Progettazione dei pozzetti di coltura e del sistema di distribuzione

Il sistema di distribuzione alle cellule del fluido (figura 2.21) prevede la realizzazione di un microcanale circolare disposto sulla circonferenza del pozzetto di coltura in prossimità della sommità; il condotto, posto 7 mm al di sopra del fondo del pozzetto, è caratterizzato da una profondità di 500 μm e da una ampiezza di 200 μm ; 36 fori dotati di ampiezza 5 μm , altezza 500 μm

e profondità 40 μm sono disposti con passo uniforme lungo il canale e assicurano una omogenea distribuzione a pioggia del mezzo di coltura alla popolazione cellulare. Come noto la distribuzione delle portate risulta più uniforme in presenza di fori con diametro particolarmente ridotto; un secondo parametro in grado di influenzare la ripartizione dei flussi è rappresentato dal numero di fori realizzati: all'aumentare di questo valore oltre un limite critico dipendente dalla geometria del dispositivo si assiste infatti progressivamente ad una ripartizione non equilibrata delle portate. Il tratto compreso tra due fori consecutivi sembra avere un effetto di stabilizzazione e l'aumento del numero di fori realizzati determina una sensibile diminuzione di tale fenomeno con effetti non trascurabili sulla distribuzione del fluido. Il progetto iniziale prevedeva fori con dimensione caratteristica 10 μm ma le simulazioni numeriche eseguite, come mostrato nel paragrafo 2.5.4, hanno evidenziato migliori risultati in presenza di un sistema di distribuzione composto da fori di 5 μm . Da sottolineare infine come inizialmente fossero stati progettati dei fori quadrati mentre in seguito si sia optato per fori con dimensione 5 μm x 500 μm che garantiscono perdite di carico notevolmente inferiori e rispettano i vincoli costruttivi imposti dal processo di microfabbricazione condotto presso la fondazione FBK.

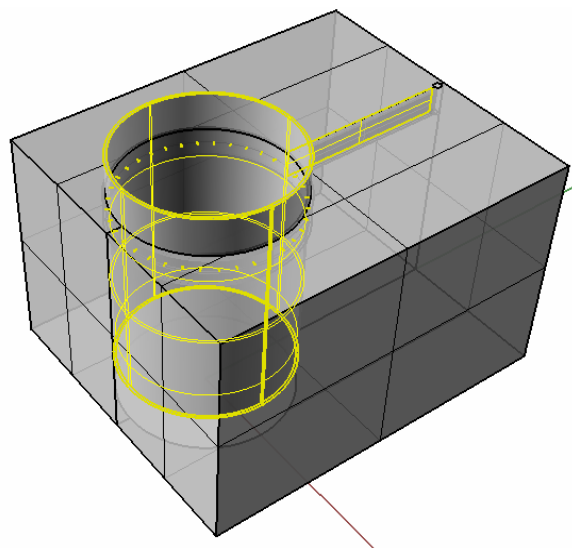


Figura 2.21 – Sistema di distribuzione del fluido ai pozzetti di coltura.

2.5 Simulazioni numeriche dei componenti del sistema

2.5.1 Generazione della griglia di calcolo e condizioni al contorno del problema

La progettazione del circuito eseguita mediante calcoli analitici è stata accompagnata, come già anticipato, da simulazioni computazionali 3D condotte mediante *software Fluent* dei componenti

del sistema. I disegni CAD delle differenti porzioni del circuito, realizzati mediante *software Rhinoceros*, sono stati esportati in formato IGES ed elaborati attraverso *software Gambit*; quest'ultimo ha consentito la generazione della griglia di calcolo e l'impostazione delle condizioni al contorno del problema. Ogni blocco è stato discretizzato utilizzando elementi esaedrici in numero variabile in funzione delle dimensioni dei canali; per limitare la pesantezza computazionale è stata inoltre utilizzata una condizione di simmetria sulla profondità dei condotti dove sono stati posti 15 elementi.

Test preliminari sono stati eseguiti sui sistemi di distribuzione ai pozzetti di coltura, così da poter verificare l'ideale collocazione di questi ultimi sulla piattaforma, e sui *micromixer* in modo da valutare l'effettiva miscelazione di farmaco e mezzo di coltura.

Le simulazioni sulla rete di distribuzione sono state eseguite a partire dai due blocchi di spillamento presenti più a valle sui due rami del circuito, relativi all'estrazione della concentrazione di farmaco 0.01, per poi proseguire con l'analisi delle unità strutturali presenti a monte. I pozzetti di coltura sono stati impostati a pressione atmosferica così come il pozzetto di recupero situato al margine inferiore del dispositivo; ogni blocco è stato analizzato considerando un breve tratto di ingresso sufficiente a garantire la creazione di un profilo sviluppato di velocità seguito dalla biforcazione nel condotto di spillamento e nel ramo di distribuzione successivo. Una condizione di portata sotto forma di velocità media è stata impostata in ingresso al sistema e all'uscita del condotto di spillamento mentre una condizione di pressione è stata fissata al termine del ramo di distribuzione collegato come mostrato nello schema riportato in figura 2.22.

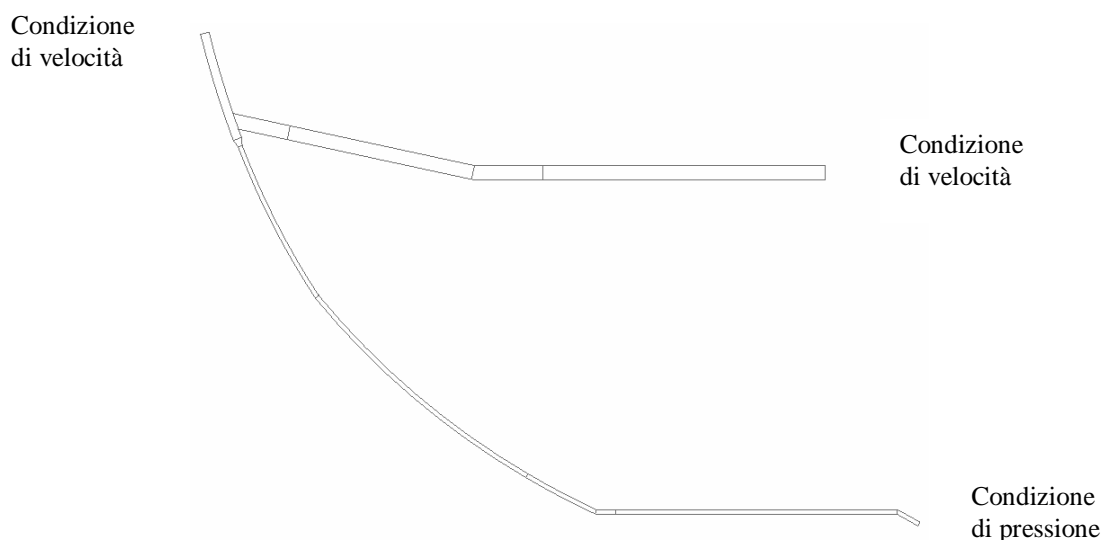


Figura 2.22 – Impostazione delle condizioni al contorno del problema.

2.5.2 Proprietà termofisiche del farmaco

- Densità: 1000 Kg/m³
- Viscosità: 0.001 Kg/(m·s)
- Coefficiente di diffusione all'interno del *medium* a 298 K: 1×10^{-10} m²/s

2.5.3 Analisi di sensitività spaziale

Prima di procedere con le simulazioni del dispositivo è stata eseguita una analisi di sensitività della griglia di calcolo in termini di numero di elementi (sensitività spaziale); l'analisi è stata condotta con lo scopo di verificare l'indipendenza della soluzione dal tipo di griglia spaziale utilizzata. Sono state generate quattro differenti griglie composte da un numero crescente di elementi esaedrici testate sul blocco di circuito relativo allo spillamento del livello di concentrazione 0.01 sul ramo di distribuzione del mezzo di coltura; il criterio adottato per il confronto è stato la caduta di pressione valutata tra ingresso e pozzetto di recupero terminale; sono stati calcolati gli errori percentuali rispetto alla griglia più fitta (3000000 elementi). Come mostrato in tabella 2.2 il test condotto con 1800000 elementi ha evidenziato un errore percentuale dello 0.54 %; valutando l'errore commesso e la pesantezza computazionale delle simulazioni si è stabilito di utilizzare tale modello di discretizzazione anche per le restanti analisi della rete di distribuzione.

	<i>Mesh [n° elementi]</i>	<i>Errore sul ΔP [%]</i>
<i>Test 1</i>	1100000	0.87
<i>Test 2</i>	1800000	0.54
<i>Test 3</i>	2400000	0.28
<i>Test 4</i>	3000000	0

Tabella 2.2 – Analisi di sensitività spaziale.

2.5.4 Risultati e discussione

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti dalle simulazioni numeriche; essi vengono illustrati in termini di valori medi di pressione registrati nei differenti punti del circuito e di mappe colorimetriche di velocità, pressione e diffusione delle specie chimiche presenti.

Simulazione della rete di distribuzione ai pozzetti di coltura

La rete di distribuzione ai pozzetti di coltura alimentati con concentrazioni di farmaco 0.01, 0.1 e 0.5 progettata analiticamente secondo quanto riportato nel paragrafo 2.4.4 è stata simulata imponendo una condizione di pressione atmosferica in uscita ai nove microcanali ed una portata pari a $Q/4$ in ingresso. I calcoli sono stati effettuati su una griglia di calcolo composta da 1375000 elementi esaedrici con imposizione di una condizione di simmetria per ridurre la pesantezza computazionale della simulazione. Nelle immagini sottostanti (figure 2.23 e 2.24) vengono riportate le mappe colorimetriche relative all'andamento delle pressioni e delle velocità nei microcanali: la caduta di pressione complessiva è di circa 220-225 Pa mentre la massima velocità registrata risulta di 0.458 m/s all'interno del condotto con ampiezza 130 μm (particolare in figura 2.23); infine è possibile notare il parziale recupero di pressione presente in corrispondenza dei bruschi allargamenti del sistema. La perdita di carico risulta leggermente inferiore rispetto a quanto previsto dal modello analitico e la ripartizione delle portate pressoché ottimale, salvo correzioni nei punti di restringimento/allargamento dei condotti dove è stato necessario operare piccole modifiche. In tabella 2.3 sono indicati i valori di portata rilevati in corrispondenza delle nove uscite del sistema: considerando la numerazione progressiva dei microcanali da sinistra verso destra la massima differenza nei valori di portata è presente tra le uscite numero 6 e 9 e risulta pari allo 0.86%.

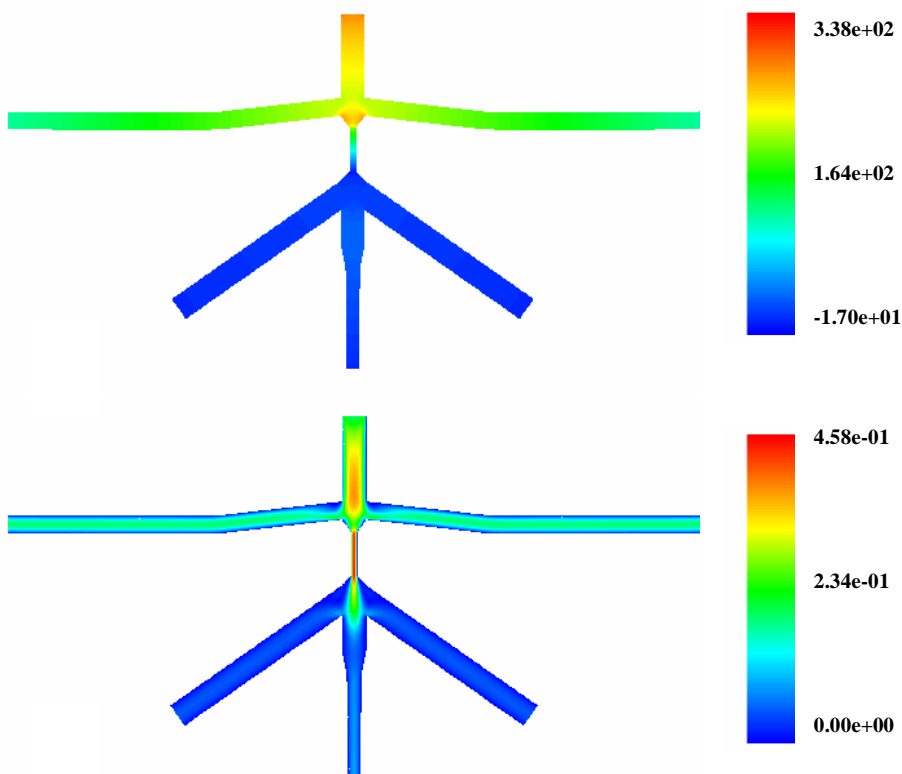


Figura 2.23 – Mappa colorimetrica di pressione [Pa] (sopra) e di velocità [m/s] (sotto) del blocco di distribuzione centrale (pozzetti 4-5-6).

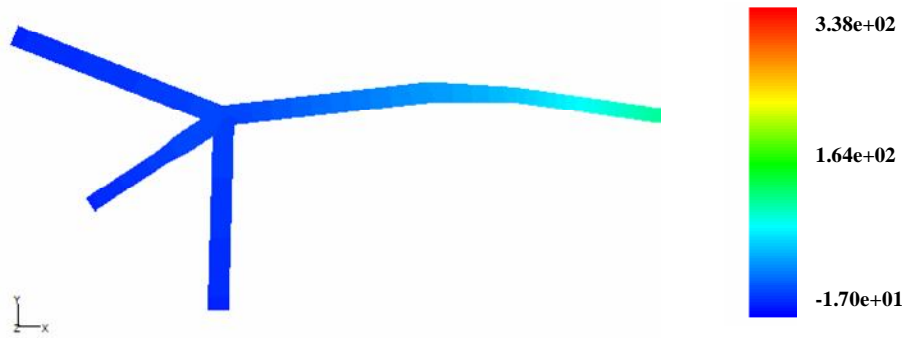


Figura 2.24 – Mappa colorimetrica di pressione [Pa] relativa ai sistemi di distribuzione laterali.

Nr. uscita	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Portata [10 ⁻⁹ m ³ /s]	5.576	5.531	5.542	5.535	5.572	5.528	5.542	5.531	5.576

Tabella 2.3 – Distribuzione delle portate volumetriche nei pozzetti di coltura alimentati con *medium* e farmaco.

Il valore di portata registrato nei pozzetti di coltura è risultato di 5.548 ± 0.0205 [10⁻⁹ m³/s].

Successivamente è stata realizzata la simulazione del sistema di distribuzione del fluido ai pozzetti con concentrazione 0 oppure 1 di farmaco; le condizioni al contorno sono state impostate come riportato per il precedente sottosistema mentre la griglia utilizzata è stata realizzata con 1600000 elementi esaedrici applicando una condizione di simmetria. Il tratto di imbocco, necessario per la generazione di un profilo sviluppato di velocità, presenta lunghezza 2 mm e la caduta di pressione complessiva registrata è di 5160 Pa. In figura 2.25 è riportata la mappa colorimetrica del profilo di pressione mentre in tabella 2.4 (numerazione delle uscite in senso orario a partire dai pozzetti sul margine inferiore) è possibile osservare la distribuzione delle portate nei nove condotti di uscita: la differenza massima rilevata nei flussi è stata dello 0.98%. Il valore di portata registrato nei pozzetti è risultato di 5.543 ± 0.0214 [10⁻⁹ m³/s].

Nr. uscita	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Portata [10 ⁻⁹ m ³ /s]	5.538	5.514	5.563	5.569	5.516	5.550	5.544	5.523	5.566

Tabella 2.4 – Distribuzione delle portate volumetriche nei pozzetti di coltura alimentati con *medium* o farmaco.

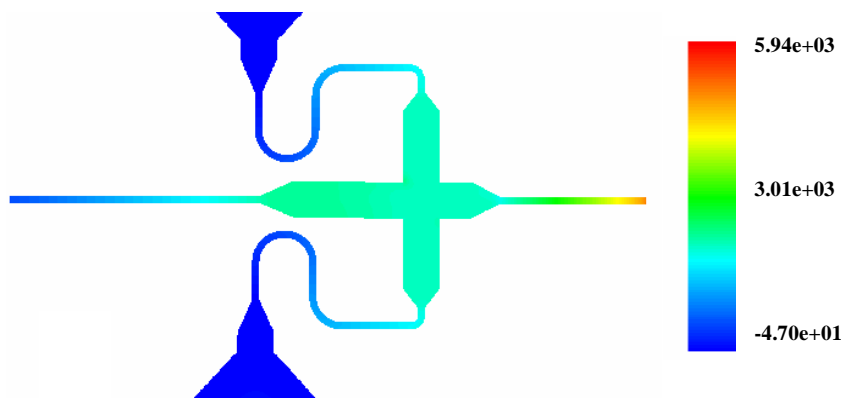


Figura 2.25 – Mappa colorimetrica del profilo di pressione [Pa] nel sistema di distribuzione di *medium* o farmaco

Come per il precedente sistema di distribuzione i calcoli analitici si sono rilevati corretti rendendo necessarie solo piccole correzioni in corrispondenza delle zone di raccordo e dei punti di restringimento/allargamento; le perdite di carico concentrate risultano infatti essere solo stimate e solo una simulazione numerica consente la loro corretta valutazione.

Simulazioni numeriche dei micromixer

Le simulazioni computazionali dei *micromixer* sono state effettuate utilizzando delle griglie di calcolo particolarmente fitte per poter valutare in modo estremamente accurato il processo di miscelamento convettivo-diffusivo. Le condizioni al contorno impostate sono state un valor medio di velocità nei due rami di ingresso ed il valore di pressione calcolato all’imbocco della rete di distribuzione ai pozzetti di coltura in uscita. Ogni sistema presenta un tratto di uscita di 1.734 mm necessario per garantire il ripristino di un profilo di velocità sviluppato a seguito dell’alterazione introdotta nel sistema di miscelazione mentre i due microcanali di ingresso presentano ampiezze variabili nei tre casi considerati come riportato in tabella 2.5.

	<i>Larghezza ingresso mezzo</i> [μm]	<i>Larghezza ingresso farmaco</i> [μm]	<i>Portata mezzo</i>	<i>Portata farmaco</i>	<i>Mesh</i> [nr. elementi]
<i>Micromixer 0.5</i>	200	200	Q/8	Q/8	2000000
<i>Micromixer 0.1</i>	300	100	(0.9/4)Q	(0.1/4)Q	2000000
<i>Micromixer 0.01</i>	800	200	(0.99/4)Q	(0.01/4)Q	2860000

Tabella 2.5 – Dimensioni, portate e *mesh* relative ai tre sistemi di miscelazione.

Le cadute di pressione nel solo tratto di miscelazione risultano di 2850 Pa (*mixer 0.01*), 2750 Pa (*mixer 0.1*) e 3250 Pa (*mixer 0.5*); come evidente i valori rilevati risultano inferiori rispetto ai

calcoli analitici di circa 650-700 Pa; si ritiene che ciò sia dovuto alla limitata sezione di passaggio di soli 100 μm x 500 μm considerata in fase di progettazione che determina una sovrastima nelle perdite di carico del componente in esame.

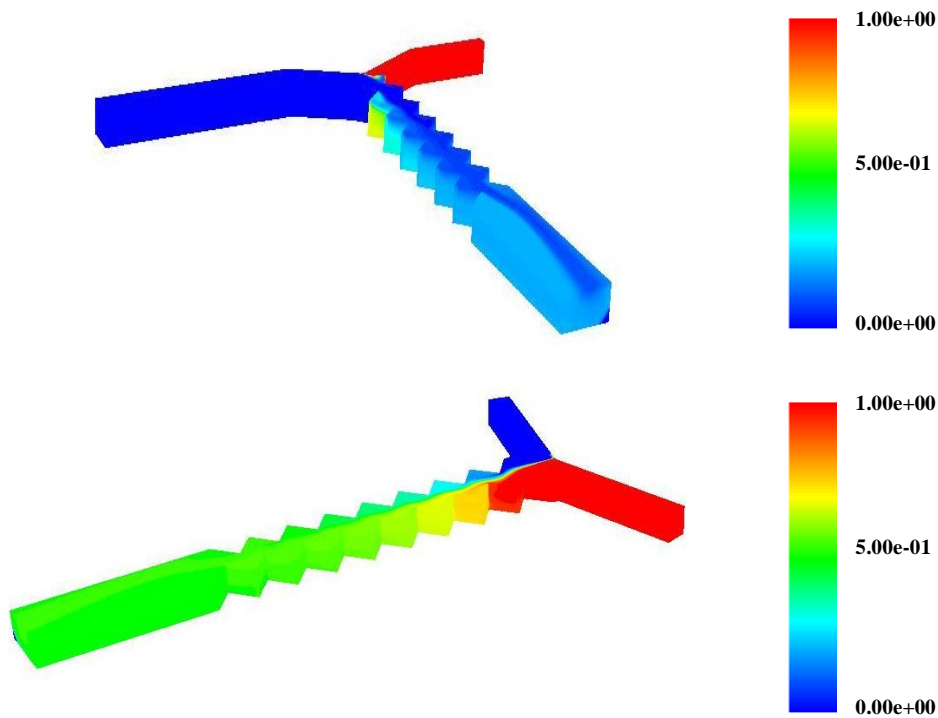


Figura 2.26 – Mappe colorimetriche relative al processo di miscelazione all'interno del *mixer* utilizzato per l'ottenimento del livello di concentrazione 0.1 (sopra) e 0.5 (sotto).

La miscelazione risulta ottimale in ognuno dei tre casi in esame con una distribuzione omogenea di farmaco all'interno del mezzo di coltura in corrispondenza del condotto di uscita, come riportato nelle mappe colorimetriche presentate in figura 2.26.

In figura 2.27 viene proposta un'immagine relativa al campo di velocità all'interno di uno dei *micromixer* in cui è possibile osservare l'alterazione della fluidodinamica nell'area di miscelazione ed il graduale ripristino di un profilo di velocità parabolico in corrispondenza del tratto di uscita.

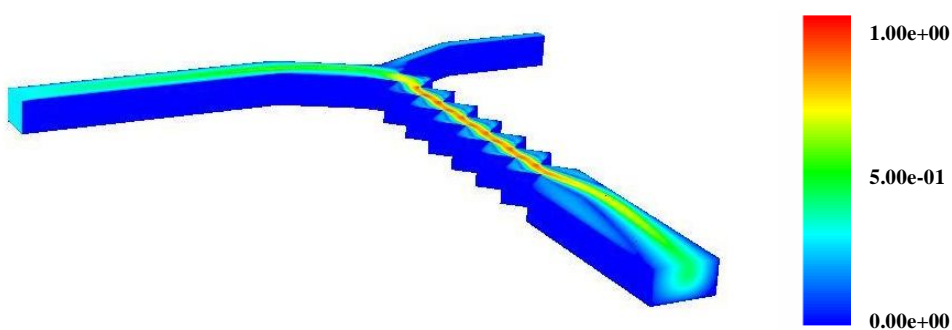


Figura 2.27 – Mappa colorimetrica di velocità [m/s] relativa al *mixer* utilizzato per lo spillamento del livello di concentrazione 0.1

Simulazioni numeriche della rete di distribuzione del mezzo di coltura

L'analisi dell'unità strutturale legata al processo di spillamento della concentrazione 0.01 (posta nella porzione più a valle del circuito) è stata realizzata impostando in ingresso una condizione di portata pari a $(3.2/8)Q$, in uscita al condotto di spillamento una portata pari a $(0.99/4)Q$ ed in prossimità del pozzetto di recupero del *medium* una condizione di pressione nulla. Le simulazioni sono state effettuate con una griglia di calcolo composta da 1815000 elementi esaedrici ed utilizzando una condizione di simmetria. I calcoli effettuati analiticamente sono stati confermati dalle simulazioni sebbene sia stato necessario ridurre l'ampiezza del microcanale di scarto a $245 \mu\text{m}$ per poter equilibrare in modo ottimale le cadute di pressione presenti nei due rami, risultate di 3493 Pa nel punto di biforcazione come evidenziato dalla mappa colorimetrica in figura 2.28; la differenza registrata in termini di perdite di carico nelle due diramazioni a partire dal punto di spillamento è risultata dello 0.85%.

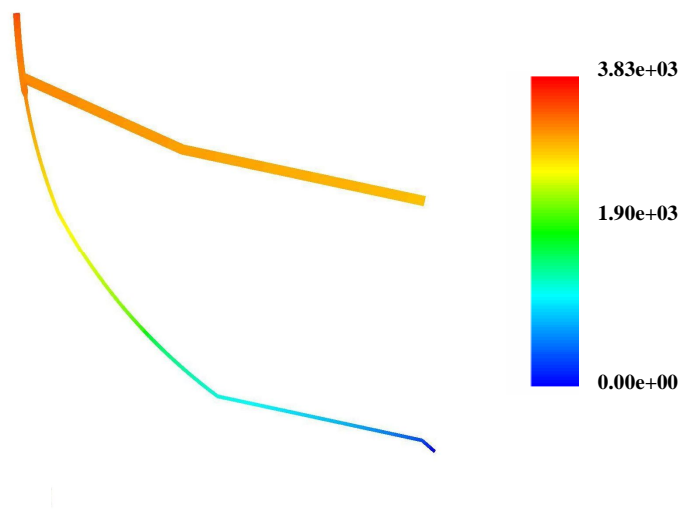


Figura 2.28–Mappa colorimetrica di pressione [Pa] relativa allo spillamento della concentrazione di farmaco 0.01

Con lo stesso schema di lavoro si è passati all'analisi del secondo blocco di spillamento (concentrazione 0.1); applicando una griglia di calcolo composta da 1800000 celle esaedriche ed una condizione di simmetria si è imposta in ingresso una condizione di portata pari a $(5/8)Q$, in uscita al condotto di spillamento una portata pari a $(0.9/4)Q$ ed in corrispondenza del canale di distribuzione il valore di pressione definito nella simulazione precedente (3493 Pa). Le perdite di carico rilevate, seppur ripartite in modo ottimale nei due rami considerati, sono risultate inferiori di 200 Pa rispetto a quanto previsto, attestandosi su un valore di 8635 Pa in corrispondenza del punto di biforcazione; si ritiene che ciò sia dovuto all'inserimento di due resistenze concentrate utilizzate per equilibrare le cadute di pressione in corrispondenza delle quali le formule analitiche considerate

portano ad una sovrastima delle perdite di carico. In figura 2.29 è mostrata una mappa colorimetrica del profilo di velocità all'interno dei condotti; da sottolineare l'instaurarsi di piccoli vortici all'interno delle resistenze concentrate in corrispondenza delle quali vengono registrate perdite di carico di centinaia di Pascal; la differenza rilevata in termini di perdite di carico nelle due diramazioni a partire dal punto di spillamento è risultata dello 0.2%.

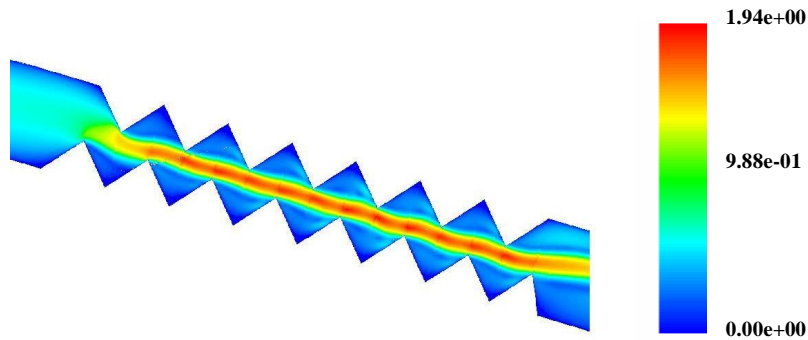


Figura 2.29 – Mappa colorimetrica di velocità [m/s] all'interno di un microcanale (particolare di perdita concentrata).

Analogamente a quanto descritto nei punti precedenti è stata impostata la simulazione relativa al terzo blocco di spillamento (concentrazione 0.5); la griglia di calcolo è stata realizzata con 1300000 elementi esaedrici mentre per quanto concerne le condizioni al contorno è stata imposta una portata pari a $0.75Q$ e a $Q/8$ rispettivamente in ingresso al sistema e in uscita al condotto di spillamento; la pressione stabilita in uscita al microcanale di distribuzione è stata di 8635 Pa. Le simulazioni hanno mostrato una non perfetta distribuzione delle perdite di carico; per questo motivo nel condotto di distribuzione è stato inserito un tratto di 7 mm con ampiezza $350\ \mu\text{m}$ in sostituzione del tratto a $400\ \mu\text{m}$ mentre nel microcanale di spillamento è stato considerato un tratto di 6.5 mm con ampiezza $200\ \mu\text{m}$ (un condotto con ampiezza uniforme $150\ \mu\text{m}$ genererebbe perdite di carico eccessive). Le cadute di pressione registrate a partire dal punto di biforcazione sono risultate di 11241 e 11256 Pa nei due rami con una differenza pari allo 0.13% (figura 2.30).

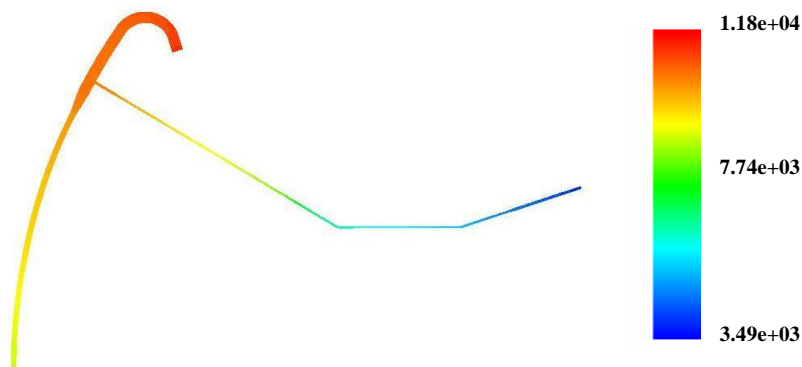


Figura 2.30 – Mappa colorimetrica di pressione [Pa] relativa allo spillamento della concentrazione di farmaco 0.5

Infine, a monte del dispositivo, è stato simulato il tratto relativo allo spillamento del livello 0 di concentrazione; la griglia di calcolo è stata realizzata con 1560000 celle esaedriche mentre come condizioni al contorno sono state imposte una portata Q pari a $0.0000002 \text{ m}^3/\text{s}$ in ingresso, una portata pari a $Q/4$ in corrispondenza del ramo di spillamento ed una pressione di 11241 Pa nel condotto di distribuzione; il microcanale destinato al trasferimento del mezzo di coltura ai pozzetti è stato modificato rispetto ai calcoli analitici date le elevate perdite di carico generate ed il conseguente squilibrio del sistema; la lunghezza del condotto in esame è passata da 8.3 a 7.3 mm mantenendo una larghezza di $100 \text{ }\mu\text{m}$. Le cadute di pressione rilevate nei due rami di circuito dalla zona di spillamento ai punti posti a pressione atmosferica sono quindi risultate di 13229 Pa e 13177 Pa con un errore dello 0.39%. In figura 2.31 è mostrato il particolare del punto di spillamento con la notevole perdita di carico registrata necessaria per l'equilibrio generale della rete di distribuzione del mezzo di coltura.

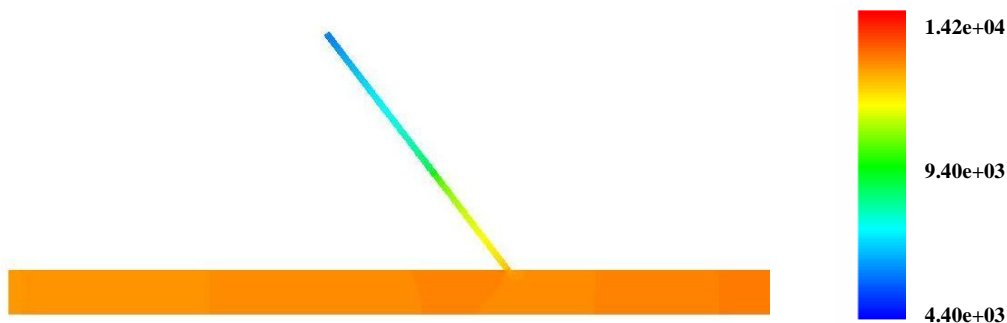


Figura 2.31 – Mappa colorimetrica di pressione [Pa] relativa al punto di spillamento della concentrazione di farmaco 0.

Simulazioni numeriche della rete di distribuzione del farmaco

Analogamente a quanto trattato nel precedente paragrafo sono state realizzate le simulazioni numeriche relative alla rete di distribuzione del farmaco. L'equilibrio del sistema ha imposto la realizzazione di piccole modifiche rispetto a quanto stabilito precedentemente mediante i calcoli analitici. In tabella 2.6 sono riportate le nuove dimensioni caratteristiche dei microcanali, caratterizzati da una profondità di $500 \text{ }\mu\text{m}$.

	<i>Lunghezza [mm]</i>	<i>Larghezza [μm]</i>
<i>Blocco spillamento 0.01</i>		
Microcanale di spillamento	37	200
Microcanale di distribuzione	45	437
<i>Blocco spillamento 0.1</i>		
Microcanale di spillamento	42	100
Microcanale di distribuzione	21	277
<i>Blocco spillamento 0.5</i>		
Microcanale di spillamento	33.5 + 6.5	150/200
Microcanale di distribuzione	14 + 7	400/350
<i>Blocco spillamento 1</i>		
Microcanale di spillamento	7	100
Microcanale di distribuzione	62	800

Tabella 2.6 – Dimensioni caratteristiche dei microcanali nella rete di distribuzione del farmaco.

Si sottolinea come il microcanale di spillamento relativo al livello di concentrazione 0.01 sia stato modificato rispetto al modello analitico con l’inserimento di una resistenza concentrata della lunghezza di 10 mm mantenendo complessivamente inalterata la lunghezza totale del condotto. Le modifiche apportate al blocco di spillamento 0.5 sono analoghe a quelle riportate nel paragrafo precedente: inserimento di un tratto di 6.5 mm con ampiezza 200 μm nel condotto di spillamento e di un tratto di 7 mm con ampiezza 350 μm nel ramo di distribuzione.

Simulazioni numeriche del sistema di distribuzione ai pozzetti di coltura

Il sistema di distribuzione alle cellule è costituito da un microcanale circolare profondo 500 μm disposto sulla circonferenza del pozzetto di coltura in cui sono presenti 36 fori equispaziati con dimensioni caratteristiche 5 μm e 40 μm . Le simulazioni sono state effettuate considerando un condotto di ingresso dotato di ampiezza 200 μm e imponendo come condizioni al contorno una portata di $5.5555 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$ in arrivo al sistema ed una pressione nulla in corrispondenza delle 36 uscite. La griglia di calcolo è stata realizzata con 1320000 elementi esaedrici imponendo una condizione di simmetria. In figura 2.32 viene riportata una mappa colorimetrica relativa alla distribuzione delle velocità nel sistema, con particolare attenzione al foro di uscita del fluido.

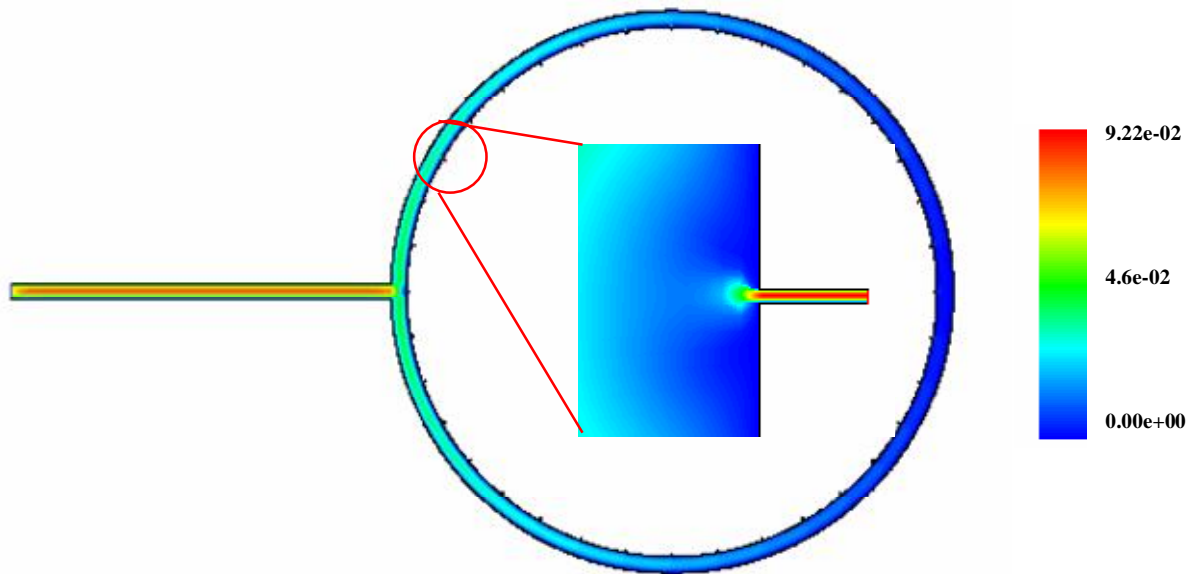


Figura 2.32 – Mappa colorimetrica di velocità [m/s] relativa al sistema di distribuzione ai pozzetti di coltura con ingrandimento relativo al foro di uscita del fluido.

I dati relativi alla distribuzione delle portate volumetriche nei fori di uscita del microcanale circolare sono visibili in tabella 2.7: l'uscita 1, in cui si registra la portata massima, è quella prospiciente il condotto di ingresso mentre il foro numero 19 è posto in posizione diametralmente opposta; come mostrato nella mappa colorimetrica precedente i punti di uscita da 2 a 18 sono posti sulla semicirconferenza inferiore mentre i fori da 2a fino a 18a appartengono alla semicirconferenza superiore. La massima differenza di portata erogata è quella rilevata tra le uscite 1 e 19 e corrisponde al 4.8% confermando una ottimale distribuzione del fluido alla popolazione cellulare. La portata volumetrica media registrata è risultata di $1.5431 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$ con una deviazione standard di $0.0225 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{s}$.

	<i>Portata [10⁻¹⁰m³/s]</i>
<i>Uscita 1</i>	1.596
<i>Uscita 2</i>	1.585
<i>Uscita 2a</i>	1.584
<i>Uscita 3</i>	1.577
<i>Uscita 3a</i>	1.577
<i>Uscita 4</i>	1.570
<i>Uscita 4a</i>	1.569
<i>Uscita 5</i>	1.563
<i>Uscita 5a</i>	1.562
<i>Uscita 6</i>	1.557
<i>Uscita 6a</i>	1.556
<i>Uscita 7</i>	1.551
<i>Uscita 7a</i>	1.550
<i>Uscita 8</i>	1.546
<i>Uscita 8a</i>	1.545
<i>Uscita 9</i>	1.541
<i>Uscita 9a</i>	1.540
<i>Uscita 10</i>	1.537
<i>Uscita 10a</i>	1.536
<i>Uscita 11</i>	1.533
<i>Uscita 11a</i>	1.532
<i>Uscita 12</i>	1.530
<i>Uscita 12a</i>	1.529
<i>Uscita 13</i>	1.527
<i>Uscita 13a</i>	1.526
<i>Uscita 14</i>	1.525
<i>Uscita 14a</i>	1.524
<i>Uscita 15</i>	1.523
<i>Uscita 15a</i>	1.522
<i>Uscita 16</i>	1.521
<i>Uscita 16a</i>	1.521
<i>Uscita 17</i>	1.520
<i>Uscita 17a</i>	1.520
<i>Uscita 18</i>	1.519
<i>Uscita 18a</i>	1.519
<i>Uscita 19</i>	1.519

Tabella 2.7 – Ripartizione delle portate volumetriche nelle diverse uscite del sistema di distribuzione alle cellule.

Capitolo 3

Test sperimentali

3.1 Introduzione

Nel presente capitolo vengono esposti i risultati raccolti nei test sperimentali eseguiti presso il Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche del Politecnico di Milano; le prove sperimentali sono state eseguite mediante il sistema Micro Particle Image Velocimetry (μ PIV, TSI Inc.), per una descrizione del quale si rimanda in Appendice, ed hanno consentito di validare i risultati delle simulazioni computazionali eseguite al calcolatore mediante il codice di calcolo commerciale *Fluent*.

In particolare verranno presentati i test eseguiti su due diverse tipologie di *micromixer* e gli esperimenti condotti sul dispositivo illustrato nel presente lavoro di tesi all'interno del capitolo 2 paragrafo 2.3. In seguito verrà esposto il test sperimentale volto all'individuazione del coefficiente di diffusione dello stronzio-cloruro (SrCl_2), principio attivo dello stronzio ranelato, utilizzato per il trattamento dell'osteoporosi. La valutazione quantitativa del sistema di distribuzione alle cellule del mezzo di coltura non è stata possibile a causa dell'ottica presente sul microscopio in dotazione al laboratorio, pertanto è stata effettuata un'osservazione puramente qualitativa. Gli esperimenti sono stati realizzati mediante Rodamina WT liquida (*Organic Dyestuffs Corporation*), molecola che eccitata da una sorgente laser ad una lunghezza d'onda di 532 nm genera fluorescenza.

3.2 Componenti del sistema μ PIV

Viene di seguito proposta un'immagine relativa al sistema Micro PIV (*TSI Inc.*) presente al Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche (figura 3.1); è possibile osservare i seguenti componenti:

- sorgente laser (*Nd:YAG Laser, TSI Inc.*)
- sincronizzatore (*Model 610034 Laser Pulse Synchronizer, TSI Inc.*)
- microscopio *Olympus IX71 (TSI Inc.)* dotato di ottiche con ingrandimento 4x e 10x
- videocamera *Power View Plus Olympus (TSI, Inc.)*
- PC di acquisizione dei dati



Figura 3.1 – Componenti del sistema μ PIV presente al Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche del Politecnico di Milano.

3.3 Preparazione della Rodamina WT

La rodamina WT (formula bruta $C_{29} H_{29} N_2 O_5 Cl$) è un colorante fluorescente rosso brillante originariamente sviluppato per applicazioni di analisi delle acque, in seguito utilizzato nella preparazione di liquidi antigelo per autoveicoli e in diverse tipologie di inchiostro. La rodamina WT, nota anche come “Acid red 388”, viene inoltre spesso utilizzata come tracciante in acqua per determinare la velocità e la direzione del flusso. I test sperimentali descritti nel presente capitolo sono stati eseguiti utilizzando rodamina WT analizzando il processo di miscelamento convettivo-diffusivo di tale molecola in acqua deionizzata. Le analisi relative al dispositivo presentato nel capitolo 2 paragrafo 2.3 sono state effettuate sfruttando le proprietà ottiche della rodamina che, eccitata da una sorgente laser con lunghezza d’onda 532 nm genera fluorescenza (figura 3.2). La soluzione di rodamina è stata preparata utilizzando 0.1 g di *Orcoacid Rhodamine WT Liquid (Organic Dyestuffs Corporation)* ogni 400 g di H_2O deionizzata (densità acqua pari a 998.2 Kg/m^3); la preparazione è stata effettuata mediante bilancia di precisione (*OHAUS Analytical Plus*). Il coefficiente di diffusione della rodamina WT in acqua valutato a 298 K è stato calcolato sperimentalmente e assunto pari a $7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.



Figura 3.2 – Immagini in fluorescenza relative al processo diffusivo della rodamina in acqua deionizzata: portata di 3 μ l/min (sinistra) e di 20 μ l/min (destra).

3.4 Analisi sperimentale dei micromixer

Il dispositivo microfluidico progettato ed analizzato nel capitolo 2 paragrafo 2.4 necessita di tre *micromixer*, fondamentali per garantire una corretta miscelazione di farmaco e mezzo di coltura; i test sperimentali proposti nel presente capitolo sono stati eseguiti su *micromixer* caratterizzati da un profilo dentato con ampiezza del condotto principale di 200 μ m, profondità pari a 50 μ m o 210 μ m e lunghezza 3 mm. Come riportato in figura 3.3 i condotti di miscelazione presentano due ingressi attraverso i quali sono inseriti acqua deionizzata e rodamina WT con uguali portate di 0.3 μ l/min o 3 μ l/min erogate da una pompa a siringa (*Harvard PHD 2000*) (volume siringhe 2.5 ml). Le connessioni fluidiche sono garantite da due aghi direttamente inseriti all'interno del PDMS con cui è realizzato il dispositivo. Il coefficiente di diffusione della rodamina è stato assunto pari a 7×10^{-11} m²/s.

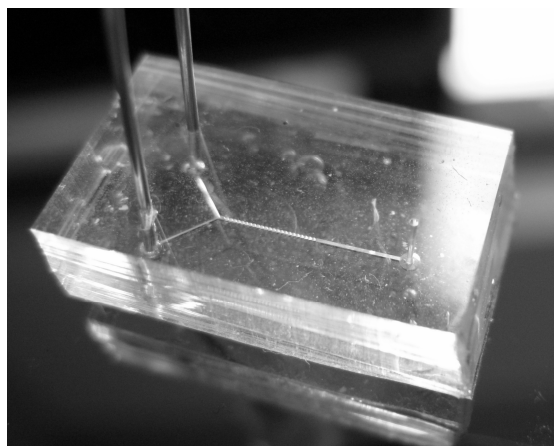


Figura 3.3 – Immagine relativa ad uno dei *micromixer* in PDMS testati.

Le immagini relative al processo di miscelazione, acquisite mediante microscopio ottico (*Olympus IX71*) e videocamera (*Power View Plus Olympus, TSI Inc.*), sono mostrate in figura 3.4. I profili di concentrazione della rodamina sono stati ricavati attraverso un processo di analisi delle immagini. Mediante *software Paint Shop Pro 9 (Jasc Software Inc.)* e *Matlab R2009a (The Mathworks Inc.)* sono stati estratti i livelli di grigio relativi a delle griglie rettangolari alte quanto il canale e larghe dieci *pixel* in corrispondenza di ingresso ed uscita dei *micromixer*; essi sono stati normalizzati rispetto ai valori di grigio registrati in presenza di sola rodamina o acqua deionizzata nei due microcanali di alimentazione; il calcolo della media su dieci *pixel* fornisce un vettore colonna contenente i livelli di grigio medi della linea considerata.

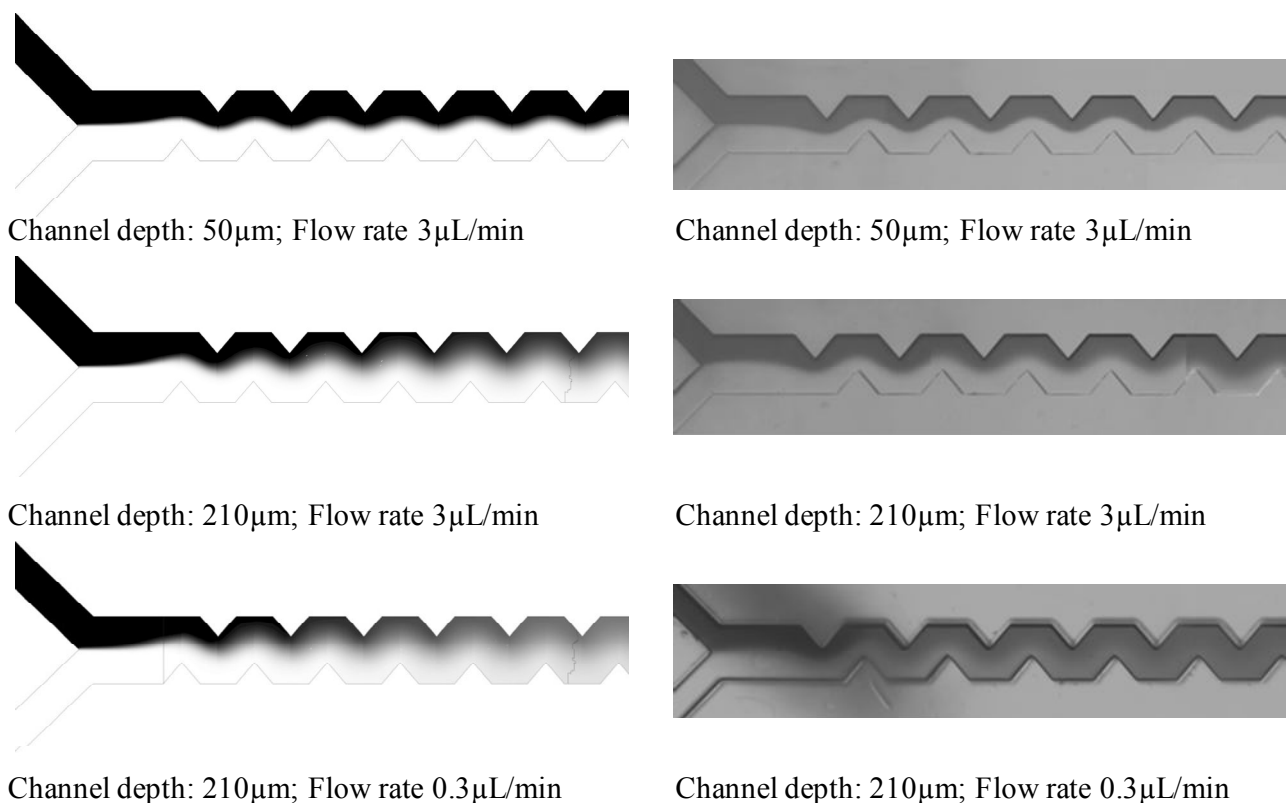


Figura 3.4 – Immagini relative al processo di miscelazione nei *micromixer*: simulazioni numeriche (sinistra) e test sperimentali (destra, ingrandimento 40x).

I risultati raccolti sono stati confrontati con le simulazioni computazionali 3D condotte mediante *software Fluent* sulla medesima geometria; i dati estratti dalle simulazioni numeriche sembrano concordare con un ridotto margine di errore con i valori sperimentali, come riassunto in tabella 3.1. Il valore di deviazione standard sulla concentrazione di rodamina calcolato in uscita al *mixer* con profondità 50 μm in presenza di una portata di 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ è risultato di 0.4285 a fronte di un dato sperimentale di 0.3958.

Analogamente la deviazione standard registrata in uscita al *micromixer* con profondità 210 μm è stata di 0.1759 con portata di 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ e di 0.0106 con portata di 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ mentre le simulazioni computazionali hanno evidenziato valori di 0.2403 e 0.0534.

	<i>Sperimentale</i>	<i>CFD</i>
$h=50\mu\text{m}, Q=3 \mu\text{l}/\text{min}$	0.3958	0.4285
$h=210\mu\text{m}, Q=3 \mu\text{l}/\text{min}$	0.1759	0.2403
$h=210\mu\text{m}, Q=0.3 \mu\text{l}/\text{min}$	0.0106	0.0534

Tabella 3.1 – Deviazione standard sulla concentrazione di rodamina in uscita ai *mixer*: confronto sperimentale/computazionale.

Sia i dati sperimentali che le simulazioni computazionali evidenziano come a parità di portata la miscelazione (diffusivo-convettiva) risulti migliore in presenza di superiori valori di profondità del *micromixer*; inoltre è possibile osservare un superiore grado di mescolamento con una portata di 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ rispetto ai dati raccolti con una portata di un ordine di grandezza superiore. Il processo diffusivo, trasversale al moto di avanzamento del fluido nel condotto, risulta favorito in presenza di ampie sezioni e ridotte portate, le quali determinano una velocità di scorrimento inferiore ed una superiore capacità diffusiva.

Vengono ora proposte alcune immagini (ingrandimento 20x) relative ai test sperimentali eseguiti su *micromixer* con canale ricurvo (figura 3.5) con del semplice colorante alimentare (E124); le acquisizioni sono state realizzate mediante stereo microscopio (*Nikon*) e videocamera (*Nikon SMZ800*). I *micromixer* analizzati presentano una geometria differente rispetto a quelli utilizzati nel dispositivo progettato nel presente lavoro di tesi e sono stati realizzati dal gruppo di ricerca BioMEMS della fondazione FBK unicamente come prototipi al fine di valutare ed ottimizzare il processo di microfabbricazione; i test sperimentali eseguiti presso il Politecnico di Milano sono stati effettuati prima di procedere con la progettazione del dispositivo microfluidico.



Figura 3.5 – Immagine ottenuta mediante stereo microscopio del *micromixer*.

Come mostrato in figura 3.6 e 3.7 è possibile osservare il diverso posizionamento dell'interfaccia presente tra colorante ed acqua deionizzata al variare della portata impostata sulla pompa a siringa; in presenza di portate di 10-20 $\mu\text{l}/\text{min}$ il processo diffusivo risulta fortemente limitato se confrontato con la prova eseguita imponendo una portata di 3 $\mu\text{l}/\text{min}$.

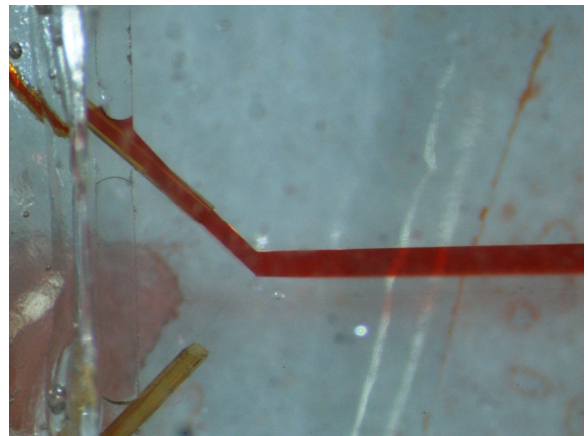
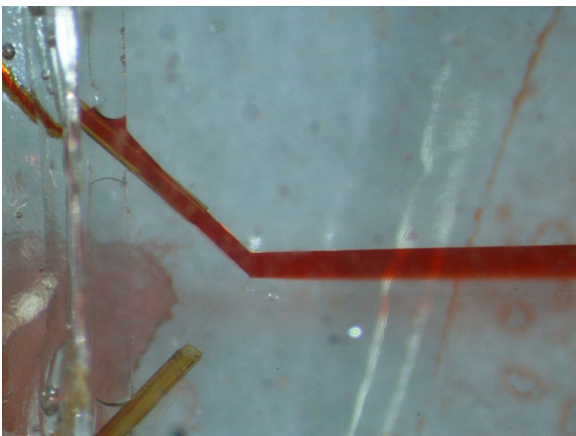


Figura 3.6 – Diffusione del colorante in acqua deionizzata con portate di 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ (sinistra) e 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (destra).

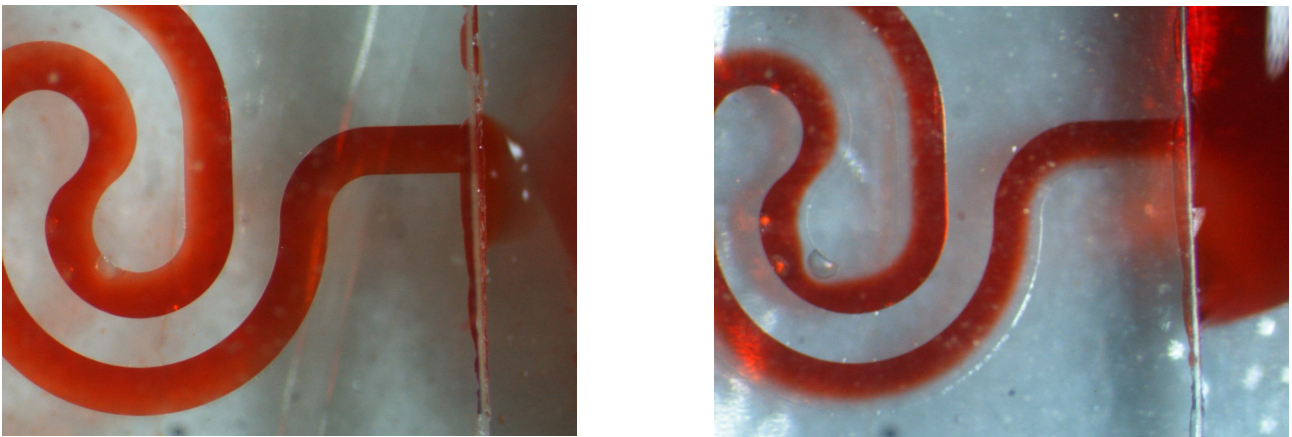


Figura 3.7 – Variazione del grado di miscelazione di colorante e acqua deionizzata in presenza di portate di 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ (sinistra) e 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ (destra).

3.5 Analisi sperimentale del meccanismo di spillamento

Nel presente paragrafo vengono proposti i risultati dei test sperimentali eseguiti sul dispositivo microfluidico discusso nel capitolo 2 paragrafo 2.3; il sistema è basato su tre spillamenti a partire da un condotto centrale di ampiezza 530 μm e profondità 50 μm nel quale confluiscono due micro canali di ampiezza 260 μm (figura 3.8). Acqua deionizzata e rodamina WT sono erogate nei due ingressi con uguali portate di 0.015 $\mu\text{l}/\text{min}$ mediante pompa a siringa. I profili di concentrazione ed i relativi valori medi sono stati valutati in termini di fluorescenza attraverso *software Insight 3G* in corrispondenza del punto di confluenza dei due condotti di ingresso e del punto di spillamento.

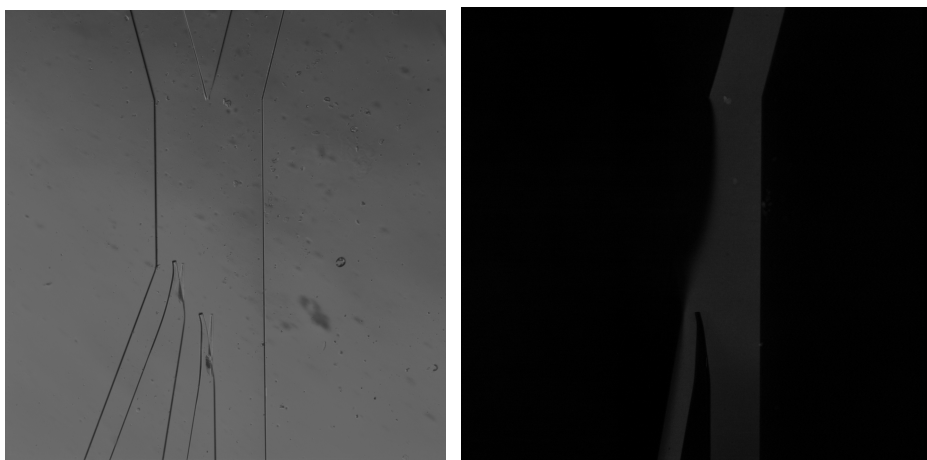


Figura 3.8 – Immagini al microscopio ottico (ingrandimento 40x) relative al dispositivo basato sul meccanismo di spillamento (sinistra) e al processo diffusivo della rodamina (destra).

Il processo diffusivo della rodamina (coefficiente di diffusione $7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) è mostrato in figura 3.8 attraverso un'immagine in fluorescenza mentre i profili di concentrazione estratti sono riportati in figura 3.9.

I valori medi di concentrazione rilevati in corrispondenza del punto di spillamento nei tre microcanali sono stati confrontati con le simulazioni computazionali 3D eseguite sul dispositivo; nel microcanale di sinistra è stato registrato un valore di concentrazione media di 0.0298 a fronte di un valore di 0.0141 calcolato dalle simulazioni numeriche; le prove sperimentali hanno inoltre evidenziato una concentrazione media di 0.6019 e di 0.9303 rispettivamente nel condotto centrale e nel canale di scarto laddove le simulazioni computazionali hanno invece mostrato valori di 0.3304 e 0.9012. Si sottolinea come il sistema analizzato sia fortemente influenzato dal coefficiente di diffusione della specie chimica considerata, dalle portate impostate e da difetti di micro fabbricazione; un dispositivo basato unicamente su processi diffusivi per l'ottenimento delle concentrazioni desiderate risulta pertanto inaffidabile come mostrato dalle simulazioni eseguite e dai test sperimentali svolti.

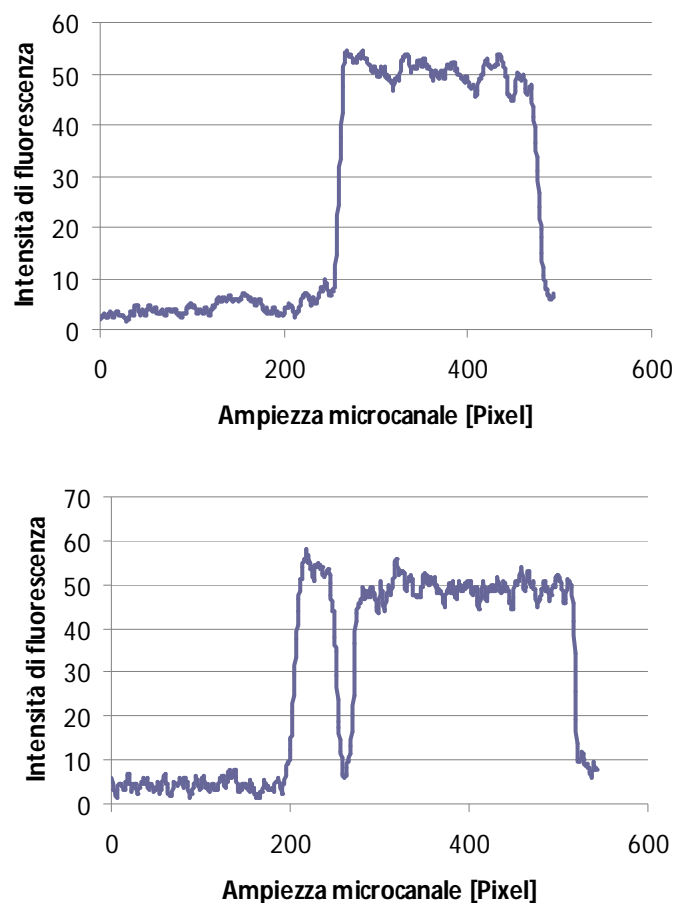


Figura 3.9 – Profilo di concentrazione della rodamina in corrispondenza dell'ingresso del sistema (sopra) e del punto di spillamento (sotto); dati filtrati mediante media mobile.

3.6 Calcolo del coefficiente di diffusione dello stronzio-cloruro

Il dispositivo microfluidico progettato nel presente lavoro di tesi è pensato per la valutazione dell'efficacia terapeutica dello stronzio cloruro nel trattamento dell'osteoporosi; in soluzione acquosa il sale si dissocia originando ioni cloro e stronzio. Questi ultimi interagendo con le cellule sarebbero responsabili dell'effetto curativo osservato sebbene non sia ancora chiaro quale livello di concentrazione sia necessario per un trattamento efficace della patologia.

Il coefficiente di diffusione del farmaco in acqua (trasparente e dunque non identificabile) non è presente in letteratura; si è dunque pensato di utilizzare un saggio colorimetrico per la detezione dei cloruri che ne consentisse una stima. Il kit *Aquanal* (*Sigma-Aldrich*) è in grado di interagire con gli ioni cloro presenti in soluzione generando un composto con picco di assorbimento a 455 nm; la minima concentrazione di cloro individuabile è pari a 10^{-9} g/ μ l. La siringa contenente il farmaco da testare è stata preparata sciogliendo in 5 ml di acqua deionizzata 0.079 g di stronzio cloruro; in seguito 200 gocce di *kit Aquanal 70071 Professional Chloride* (*Sigma Aldrich*) sono state aggiunte sotto cappa al preparato e si è atteso per un tempo di 3 minuti in modo da completare la reazione chimica in atto.

Le prove sperimentali sono state eseguite su un microcanale in PDMS con ampiezza 600 μ m e profondità 210 μ m; la portata impostata è stata di 3 μ l/min. Le immagini in figura 3.10 acquisite allo stereo microscopio evidenziano il progressivo processo diffusivo del farmaco in acqua ed il graduale spostamento dell'interfaccia presente tra i due fluidi considerati.

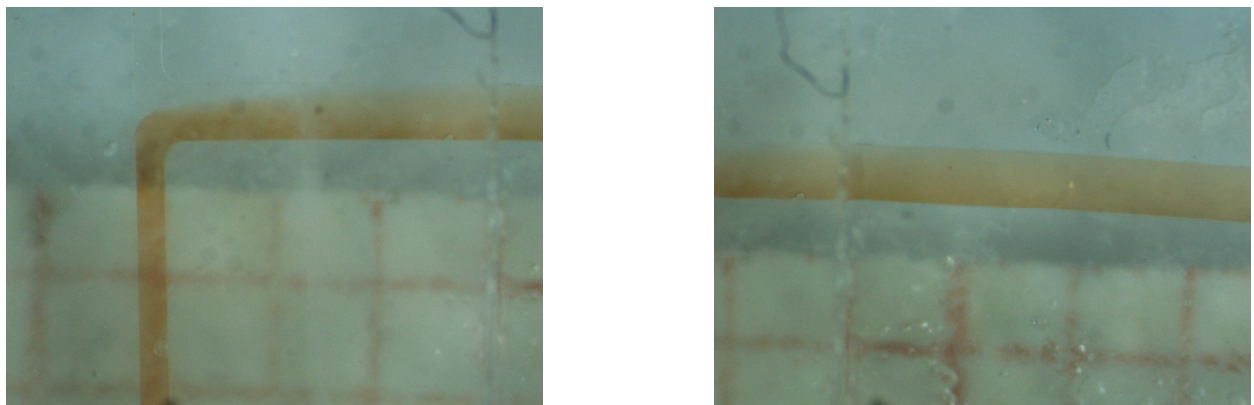


Figura 3.10 – Diffusione del farmaco, colorato mediante *kit Aquanal*, in acqua deionizzata; ingrandimenti 20x relativi all'ingresso del sistema (sinistra) e al punto di uscita (destra).

Le immagini acquisite con videocamera *Nikon SMZ800* sono state analizzate mediante *software Paint Shop Pro 9* e *Matlab R2009a* con lo scopo di estrarre i profili di concentrazione del farmaco all'interno del microcanale; i dati sono stati raccolti a distanze di 1 mm e 2 mm dal punto di confluenza dei condotti di ingresso; i livelli di grigio di ogni *pixel* sono stati normalizzati rispetto ai valori registrati in corrispondenza dei due ingressi del sistema. Parallelamente utilizzando il programma scritto in codice *Matlab* presentato nel capitolo 2 in grado di calcolare il profilo di concentrazione di una data specie chimica dati in ingresso portate, diffusività e dimensioni caratteristiche del microcanale sono state estratte le curve analitiche di distribuzione del farmaco al variare del coefficiente di diffusione; come mostrato nei grafici allegati in figura 3.11 e 3.12 il confronto tra le curve sperimentali e analitiche indica un coefficiente di diffusione dello stronzio cloruro prossimo a $3 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

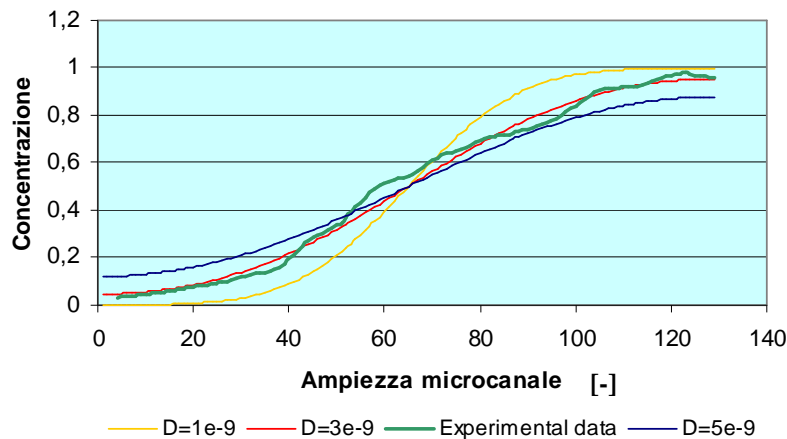


Figura 3.11 – Profilo di concentrazione dello stronzio-cloruro in acqua deionizzata valutato dopo 1 mm dal punto di confluenza dei due canali di ingresso; curva sperimentale e modelli analitici (130 dati estratti sui 600 μm di ampiezza del condotto).

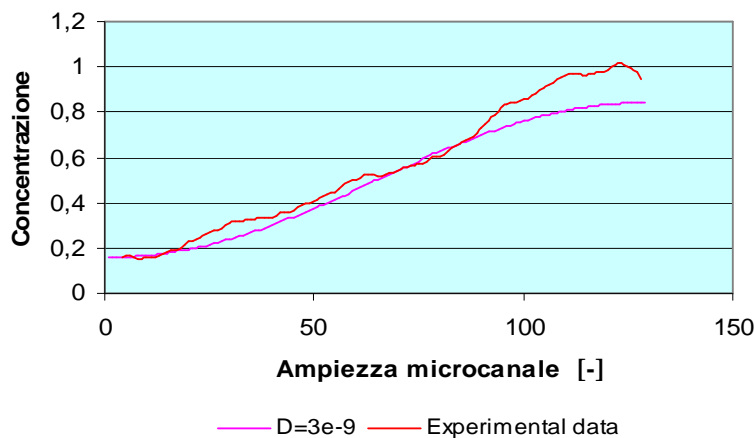


Figura 3.12 - Profilo di concentrazione dello stronzio-cloruro in acqua deionizzata valutato dopo 2 mm dal punto di confluenza dei due canali di ingresso; curva sperimentale e modello analitico (130 dati estratti sui 600 μm di ampiezza del condotto).

Il valore di diffusività estratto sperimentalmente risulta confrontabile con il dato ricavabile in prima approssimazione mediante la relazione di *Stokes-Einstein*:

$$D = \frac{K_B \cdot T}{6r\pi\eta} \quad [3.1]$$

dove K_B rappresenta la costante di *Boltzmann*, T la temperatura assoluta, r il raggio atomico della specie chimica ed η la viscosità del mezzo considerato.

Il coefficiente di diffusione in acqua, che presenta una viscosità di 0.001 Kg/(m·s), alla temperatura di 298 Kelvin risulta di 1×10^{-9} m²/s per lo stronzio (raggio atomico 215 pm) e di 2×10^{-9} m²/s per il cloro (raggio atomico 100 pm).

Le simulazioni computazionali eseguite per la progettazione del dispositivo microfluidico sono state condotte adottando un coefficiente di diffusione pari ad 1×10^{-10} m²/s con lo scopo di garantire un certo margine di sicurezza al processo di miscelamento nei *micromixer*.

3.7 Scelta del materiale per la realizzazione del dispositivo

In fase di progettazione del presente dispositivo la scelta del materiale è ricaduta sul polidimetilsilossano poroso che presenta interessanti proprietà fisico-chimiche oltre ad una elevata biocompatibilità, necessaria per la realizzazione dei pozzetti di coltura in cui sono seminate le cellule.

Le prove di biocompatibilità sono state realizzate presso il laboratorio di biologia molecolare e colture cellulari dell'Istituto Ortopedico Galeazzi su diverse tipologie di materiali. Le valutazioni di proliferazione, vitalità e morfologia di cellule SAOS-2 (osteosarcoma) sono state effettuate su plastica per colture cellulari (controllo), PDMS, PDMS + CNT (*Carbon Nanotube Composite*), PDMS poroso, PDMS silanizzato, COC (*Cyclo-Olefine Copolymer*) e resina epossidica. Gli esperimenti di proliferazione e vitalità sono stati realizzati a differenti istanti di tempo (24, 48, 72, 96 ore dalla semina). Le immagini riportate in figura 3.15 sono relative alle prove condotte dopo 96 ore (controlli, ingrandimenti 100x e 160x al microscopio ottico).

I test di proliferazione (2 esperimenti effettuati) mostrano come la resina epossidica sia il peggiore dei substrati utilizzati in quanto dopo 72 e 96 ore dalla semina la proliferazione delle cellule poste su questo materiale risulta ridotta rispetto a quella del medesimo tipo cellulare seminato sui diversi PDMS e sul COC (figura 3.13).

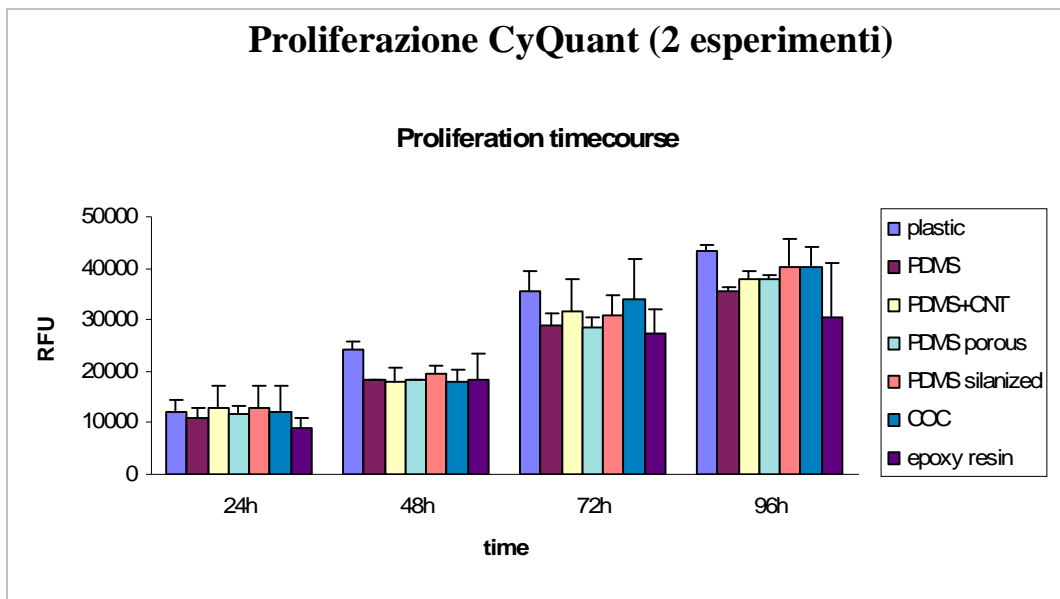


Figura 3.13 – Test di proliferazione cellulare eseguiti a differenti *time-point*.

Il test di vitalità (un esperimento effettuato) mostra risultati particolarmente interessanti: sin dalle 24 ore immediatamente successive alla semina la vitalità delle cellule disposte su resina epossidica è marcatamente ridotta rispetto a quella delle stesse cellule seminate sugli altri substrati mantenendosi tale fino alle 96 ore. I due substrati sui quali le cellule sembrano essere più vitali sono il COC ed il PDMS poroso, probabilmente perché maggiormente idrofilici (figura 3.14).

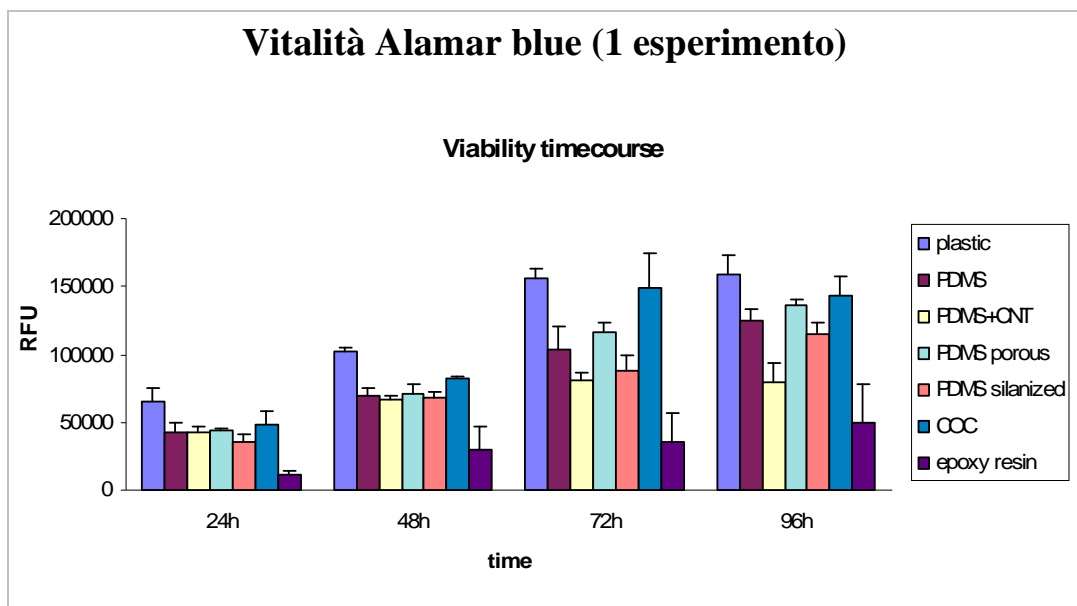


Figura 3.14 – Test di vitalità cellulare eseguiti mediante *Alamar Blue*.

L'analisi morfologica evidenzia come le cellule seminate su COC e PDMS poroso presentino un aspetto simile a quello dei campioni seminati su plastica polistirenica, comunemente utilizzata per colture cellulari. Prove di coltura su PDMS, PDMS + CNT e PDMS silanizzato evidenziano come le cellule sembrano raggrupparsi in *cluster*, probabilmente per la maggior idrofobicità di questi substrati (figura 3.16).

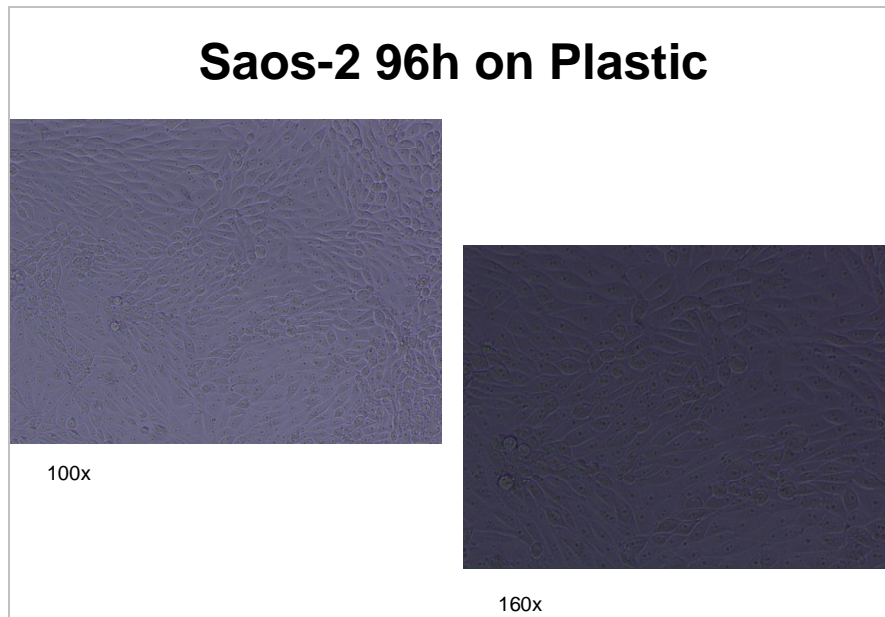


Figura 3.15 – Immagini ottenute con microscopia ottica relative a cellule SAOS-2 coltivate per 96 ore su polistirene (controllo).

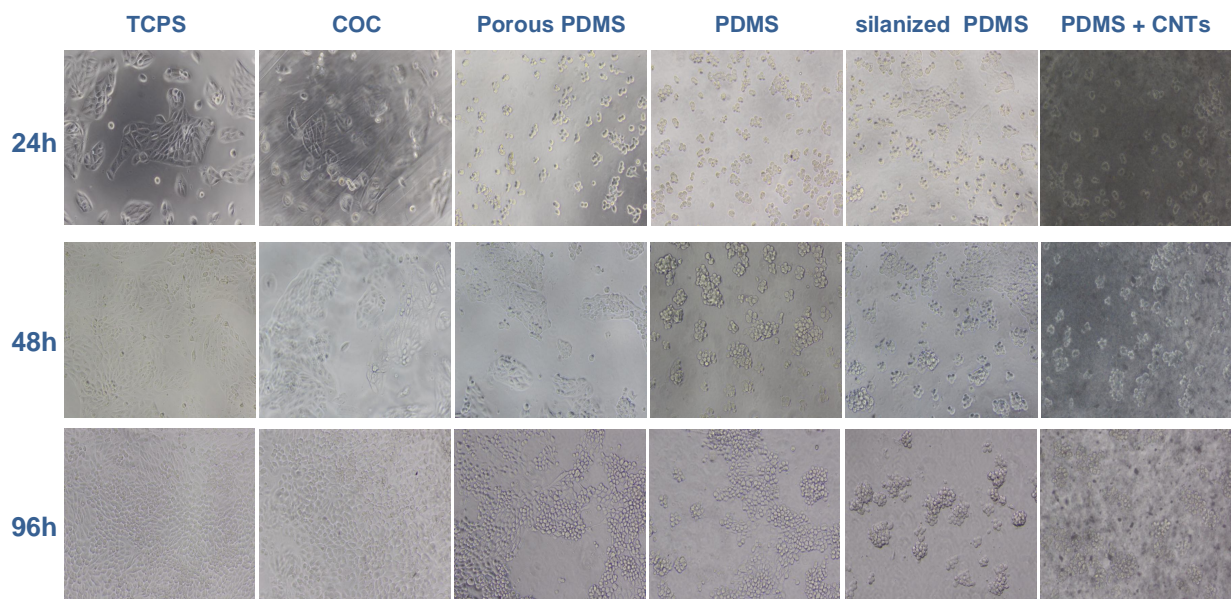


Figura 3.16 – Immagini ottenute con microscopia ottica (ingrandimento 100x) relative a cellule SAOS-2 coltivate per 24, 48 e 96 ore su polistirene per colture cellulari (TCPS), COC, PDMS poroso, PDMS, PDMS silanizzato e PDMS + CNTs.

Il dispositivo verrà realizzato attraverso l'applicazione di tecniche fotolitografiche con deposizione di *fotoresist* negativo SU-8, materiale polimerico basato su resine epossidiche, chimicamente resistente, in grado di consentire la generazione di multistrati e di microcanali caratterizzati da un rapporto altezza/larghezza (*aspect ratio*) fino a 10:1.

La maschera progettata verrà esposta alla sorgente luminosa consentendo la generazione della microstrutturazione in SU-8; in seguito il processo di microfabbricazione procederà con l'applicazione della tecnica di *replica molding* per la generazione della struttura in PDMS [paragrafo 1.3.2]. I test sperimentali eseguiti sui sistemi di distribuzione ai pozzetti di coltura hanno evidenziato il corretto funzionamento del dispositivo trattato nel capitolo 2 basato su 36 fori sebbene una valutazione quantitativa non sia stata possibile a causa dell'ottica presente sul microscopio in dotazione al laboratorio che non consentiva una ottimale visione dei pozzetti.

Capitolo 4

Conclusioni e sviluppi futuri

Il presente lavoro di tesi nasce dall'esigenza di realizzare un dispositivo microfluidico versatile e compatto che consenta la miscelazione di *medium* per colture cellulari e farmaco così da generare diversi livelli di concentrazione a cui esporre una popolazione cellulare; esso riguarda l'ottimizzazione terapeutica per il trattamento dell'osteoporosi in quanto consentirà ai biologi di valutare gli effetti di differenti concentrazioni di stronzio ranelato, farmaco utilizzato per la cura di tale patologia, sul metabolismo cellulare. Le potenzialità di un sistema di questo tipo spaziano dalla ridotta quantità di reagenti e campioni da utilizzare, con notevole abbattimento dei costi, fino alla automatizzazione delle pratiche di laboratorio e alla conseguente riduzione degli errori manuali introdotti dagli operatori oltre che dei tempi necessari per l'organizzazione delle prove di coltura cellulare.

Il progetto è realizzato in collaborazione con il laboratorio di colture cellulari e biologia molecolare dell'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano e con il *Center for Materials and Microsystems* della Fondazione Bruno Kessler (FBK) di Trento grazie ai finanziamenti della Fondazione Caritro. La progettazione si è avvalsa di modelli analitici realizzati in codice *Matlab* che hanno consentito una valutazione preliminare della diffusione dello stronzio ranelato all'interno del mezzo per colture cellulari. L'analisi dei risultati ha permesso di reindirizzare la progettazione da un sistema di spillamenti successivi ad una differente soluzione progettuale basata sulla miscelazione di portate proporzionali di farmaco e *medium* in grado di generare le concentrazioni stabilite inizialmente. I risultati raccolti hanno infatti evidenziato come un sistema impostato su spillamenti successivi sia incompatibile con le specifiche di progetto: in presenza di portate ridotte il requisito di limitati tempi di riempimento tali da garantire la sopravvivenza cellulare non viene rispettato; viceversa l'impostazione di portate adeguate non consente lo sviluppo di un gradiente di concentrazione ottimale e richiede microcanali con lunghezze particolarmente elevate. Un sistema di questo genere, inoltre, risulta fortemente influenzato dal valore del coefficiente di diffusione, da difetti di fabbricazione e da particolari condizioni sperimentali.

La soluzione progettuale definitiva prevede due differenti reti per l'erogazione del farmaco e del mezzo di coltura mediante una pompa a siringa. I condotti principali sono disposti sulla circonferenza del dispositivo, mentre canali di spillamento opportunamente dimensionati consentono l'estrazione di portate proporzionali di fluido che si misceleranno in corrispondenza dei punti di intersezione. Il sistema è stato sviluppato mediante l'utilizzo di una trattazione a parametri concentrati e la realizzazione dell'equivalente elettrico del circuito di distribuzione; simulazioni computazionali eseguite mediante *software Fluent* hanno consentito di valutare i calcoli effettuati e migliorare progressivamente il sistema. I risultati raccolti dalle simulazioni numeriche hanno mostrato piccole differenze rispetto ai calcoli analitici evidenziando tuttavia come anche una

trattazione semplificata come quella a parametri concentrati sia estremamente utile per sviluppare un progetto di base prima di ricorrere a metodi computazionali particolarmente esigenti in termini di potenza di calcolo richiesta. I diversi componenti del sistema sono stati realizzati presso il gruppo di ricerca BioMEMS della Fondazione Bruno Kessler di Trento attraverso l'applicazione di tecniche di *soft lithography* e l'utilizzo del polidimetilsilossano (PDMS), materiale caratterizzato da elevata biocompatibilità e stabilità. La realizzazione dei prototipi consente da una parte il miglioramento delle procedure di microfabbricazione e contemporaneamente fornisce la possibilità di effettuare test sperimentali in laboratorio i cui risultati possono essere confrontati con quelli delle simulazioni numeriche. Le prove sperimentali, eseguite mediante tecnologia *Micro Particle Image Velocimetry* sui *micromixer*, hanno consentito la caratterizzazione dei dispositivi e la validazione dei risultati numerici ottenuti.

Il sistema progettato è caratterizzato da un'elevata compattezza che ne consente un facile trasporto e utilizzo nei laboratori di colture cellulari. Un ulteriore aspetto significativo è rappresentato dalla semplicità di utilizzo del sistema che consente anche a personale non specializzato di operare con estrema facilità.

Infine, considerando che densità, viscosità e coefficiente di diffusione di numerosi liquidi risultano confrontabili, il sistema si dimostra potenzialmente utile per la generazione di diversi livelli di concentrazione di altre specie chimiche in base alle specifiche esigenze.

Appendice

A.1 Equazioni di conservazione della massa e della quantità di moto

Il modello fisico implementato in *Fluent* prevede la risoluzione delle equazioni di conservazione della massa e della quantità di moto per il fluido; in presenza di fenomeni diffusivi viene risolta una specifica equazione di conservazione della specie chimica presente. Il modello di diffusione e le leggi di *Fick* sono trattati nel paragrafo A.2.

Le equazioni di *Navier-Stokes* sono la formalizzazione matematica di tre principi fisici ai quali i fluidi, imposta la condizione di continuo deformabile, sono sottoposti:

- principio di conservazione della massa (equazione di continuità);
- secondo principio della dinamica (bilancio della quantità di moto);
- primo principio della termodinamica (conservazione dell'energia).

Le equazioni vengono completate dalle condizioni al contorno e dalle condizioni iniziali del problema.

Equazione di continuità

Il principio di conservazione della massa può essere espresso come segue:

la variazione di massa in un volume infinitesimo considerata nell'unità di tempo eguaglia la differenza tra i flussi di massa entranti ed uscenti.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{v}) = 0 \quad [\text{A1}]$$

dove ρ rappresenta la densità del fluido mentre \mathbf{v} il campo di velocità.

Bilancio della quantità di moto

Il secondo principio della dinamica esprime la conservazione della quantità di moto e può essere enunciato come segue:

la variazione nell'unità di tempo della quantità di moto del fluido contenuto nel volume di controllo τ sommata al flusso netto di quantità di moto attraverso la superficie σ uguaglia la risultante delle forze esterne agenti sull'elemento di fluido contenuto nel volume stesso.

$$\rho \left(\frac{\partial v_i}{\partial t} + v_j \frac{\partial v_i}{\partial x_j} \right) = - \frac{\partial p}{\partial x_i} + \mu \nabla^2 v_i + \rho f_i \quad [\text{A2}]$$

dove ρ rappresenta la densità del fluido, μ la viscosità dinamica mentre \mathbf{v} e \mathbf{p} indicano rispettivamente il campo di velocità e la pressione del fluido.

A.2 Modello di diffusione e leggi di Fick

Coefficienti di diffusione di massa adeguati devono essere impostati nel modello ogni volta in cui vengano risolte equazioni di trasporto di specie chimiche; tali coefficienti sono utilizzati per il calcolo del flusso di diffusione, come espresso dalle leggi di *Fick*. Le leggi di *Fick* sono equazioni di diffusione differenziali alle derivate parziali non lineari che descrivono le variazioni di densità e concentrazione nei materiali in cui sono in atto fenomeni di diffusione.

Prima legge di Fick

L'equazione differenziale alla base della descrizione dei fenomeni diffusivi è la seguente:

$$J = -D \frac{\partial \phi}{\partial x} \quad [\text{A3}]$$

in cui \mathbf{J} rappresenta il flusso lungo la direzione \mathbf{x} , ϕ la concentrazione della specie chimica, \mathbf{D} la diffusività o coefficiente di diffusione, dipendente strettamente dal soluto, dal solvente e dalla temperatura di esercizio; il segno negativo è giustificato dal fatto che il flusso è diretto da una concentrazione più alta ad una inferiore.

L'espressione della legge precedente per la descrizione di fenomeni in due o tre dimensioni richiede l'utilizzo dell'operatore ∇ gradiente che generalizza la prima derivata; si ottiene così la seguente relazione:

$$J = -D \nabla \phi \quad [\text{A4}]$$

Seconda legge di Fick

La seconda legge di *Fick* rappresenta un'equazione di conservazione della massa; in forma differenziale è espressa come segue:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} \quad [\text{A5}]$$

in cui:

- ϕ rappresenta la concentrazione della specie [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$]
- t indica il tempo di osservazione del fenomeno [s]
- D rappresenta il coefficiente di diffusione [$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$].

La variazione di concentrazione è funzione del tempo e dello spazio; nella forma precedente la legge esprime la variazione della concentrazione nella sola direzione \mathbf{x} mentre per il caso bidimensionale la relazione diviene:

$$\frac{\partial\phi}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2\phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\phi}{\partial y^2} \right). \quad [\text{A6}]$$

L'espressione in forma del tutto generale, in due o più dimensioni, può essere scritta utilizzando l'operatore gradiente ∇ :

$$\frac{\partial\phi}{\partial t} = D \nabla^2 \phi \quad [\text{A7}]$$

Se il coefficiente di diffusione non è costante e risulta dipendente dalle coordinate e/o dalla concentrazione la seconda legge di *Fick* diviene:

$$\frac{\partial\phi}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla \phi) \quad [\text{A8}]$$

Nel caso in cui ϕ sia costante nel tempo si ottiene l'equazione di *Laplace*, le cui soluzioni sono delle leggi armoniche; l'equazione sarà dunque nella forma:

$$\nabla^2 \phi = 0 \quad [\text{A9}]$$

Dipendenza dalla temperatura del coefficiente di diffusione

Il coefficiente di diffusione a differenti temperature è spesso esprimibile, con margini di errore generalmente accettabili, dalla relazione:

$$D = D_0 \exp\left(\frac{-E_A}{R \cdot T}\right) \quad [\text{A10}]$$

dove:

D è il coefficiente di diffusione

D₀ rappresenta il coefficiente massimo di diffusione (a temperatura infinita)

E_A è l'energia di attivazione del processo diffusivo

T rappresenta la temperatura assoluta misurata in gradi Kelvin

R è la costante universale dei gas.

Un'equazione in questa forma è conosciuta come equazione di *Arrhenius*.

A.3 Caratteristiche del software commerciale *Fluent*

Formulazione del problema

Le equazioni non lineari impostate dall'utente vengono linearizzate dal *software* portando alla generazione di un sistema lineare in ogni singola cella computazionale; la modalità con cui le equazioni vengono linearizzate può essere **implicita** oppure **esplicita**. Nella formulazione implicita il valore incognito assunto all'interno di ogni cella da una determinata variabile è calcolato utilizzando una relazione che includa sia valori noti che incogniti della variabile in celle adiacenti; nella formulazione esplicita, al contrario, il valore incognito di una variabile all'interno di una cella computazionale è calcolato utilizzando esclusivamente una relazione che includa solo coefficienti già noti.

Schema risolutivo

Fluent utilizza una tecnica basata sulla definizione di volumi di controllo per convertire il sistema di equazioni integrali in equazioni algebriche che possano essere risolte numericamente; il *software* calcola i valori assunti da ogni singola variabile al centro di ogni cella; questi ultimi vengono utilizzati per ricavare mediante interpolazione i valori su ogni faccia della cella della variabile considerata. Il processo di interpolazione può essere effettuato utilizzando uno **schema risolutivo del primo o del secondo ordine**: quando è desiderata una accuratezza del primo ordine i valori delle variabili sulle facce vengono determinati assumendo che le quantità al centro di ogni cella rappresentino il valor medio della variabile; nel momento in cui viene selezionato uno schema del primo ordine il valore assunto da una variabile su una faccia viene impostato uguale al valore presente al centro della cella a monte (*upstream*). L'applicazione di uno schema risolutivo del secondo ordine implica che il valore di ogni variabile sulle facce della cella considerata venga calcolato utilizzando un approccio di ricostruzione lineare multidimensionale. In tale approccio è possibile raggiungere una accuratezza di ordine superiore mediante una espansione in serie di *Taylor* della soluzione presente al centro della cella considerata; il valore assunto in corrispondenza di una faccia viene calcolato mediante la formula $\varphi_f = \varphi + \nabla \varphi \cdot \Delta s$ in cui Δs rappresenta il vettore spostamento dal centro della cella a monte (*upstream*) al centro della faccia considerata; il gradiente viene calcolato utilizzando il teorema della divergenza. In genere quando il flusso non risulta allineato con la griglia creata l'applicazione di uno schema del primo ordine introduce un significativo errore di discretizzazione numerica, riducendo notevolmente l'accuratezza dei risultati.

Modalità di risoluzione del problema

Il *software* interpola i valori di pressione sulle facce delle singole celle utilizzando coefficienti presenti nell'equazione di conservazione della quantità di moto; questa procedura si dimostra efficace fino a quando la variazione di pressione tra i centri di celle adiacenti è ridotta e graduale; in presenza di significativi gradienti nel profilo di pressione possono verificarsi sovrastime oppure sottostime nei valori di velocità calcolati con introduzione di notevoli errori nei risultati ottenuti. Le equazioni di conservazione della quantità di moto e della massa vengono risolte in modo sequenziale; in tale procedura l'equazione di continuità (conservazione massa) è utilizzata per il calcolo della pressione; tuttavia la pressione non compare esplicitamente nell'equazione considerata dal momento che la densità non è direttamente legata a tale variabile; la famiglia di algoritmi *SIMPLE* (*Semi Implicit Method for Pressure Linked Equations*), **algoritmi di accoppiamento pressione-velocità**, viene utilizzata per introdurre la pressione nell'equazione di continuità. L'utilizzo dell'algoritmo *SIMPLE* è preferibile rispetto all'algoritmo *SIMPLEC* (il quale consente di raggiungere più rapidamente la condizione di convergenza) nei problemi in cui l'incremento del fattore di rilassamento relativo alla pressione fino al valore unitario possa generare una condizione di instabilità.

Calcolo dei gradienti

I gradienti possono essere calcolati secondo tre differenti metodi: *Green-Gauss cell based*, *Green-Gauss node based* e *least square cell based*.

Il teorema di *Green-Gauss* può essere utilizzato per calcolare il gradiente di una data variabile ϕ :

$$(\nabla \phi)_{c0} = \frac{1}{V} \sum_f \bar{\phi}_f \vec{A}_f \quad [\text{A11}]$$

in cui la sommatoria è estesa a tutte le facce che costituiscono la cella computazionale.

Il valore della variabile di interesse Φ_f sulla faccia considerata può essere calcolato con il metodo *Green-Gauss cell based* che utilizza il valore assunto da ϕ in corrispondenza del centro di due celle adiacenti:

$$\bar{\phi}_f = \frac{\phi_{c0} + \phi_{c1}}{2} \quad [\text{A12}]$$

In alternativa è possibile utilizzare la media aritmetica dei valori assunti in corrispondenza dei nodi N della faccia in esame (*Green-Gauss node based*, maggiore accuratezza rispetto al metodo precedente):

$$\overline{\phi}_f = \frac{1}{N_f} \sum_n^{N_f} \overline{\phi}_n \quad [\text{A13}]$$

Nelle simulazioni effettuate è stata utilizzata la metodologia *least square cell based* (fig. A1) in cui il gradiente della variabile in esame rispetto al centro della cella c_0 può essere espresso come segue:

$$(\nabla \phi)_{c_0} \cdot \Delta r_i = (\phi_{c_i} - \phi_{c_0}) \quad [\text{A14}]$$

in cui Δr_i rappresenta il vettore congiungente il centro delle celle c_0 e c_i .

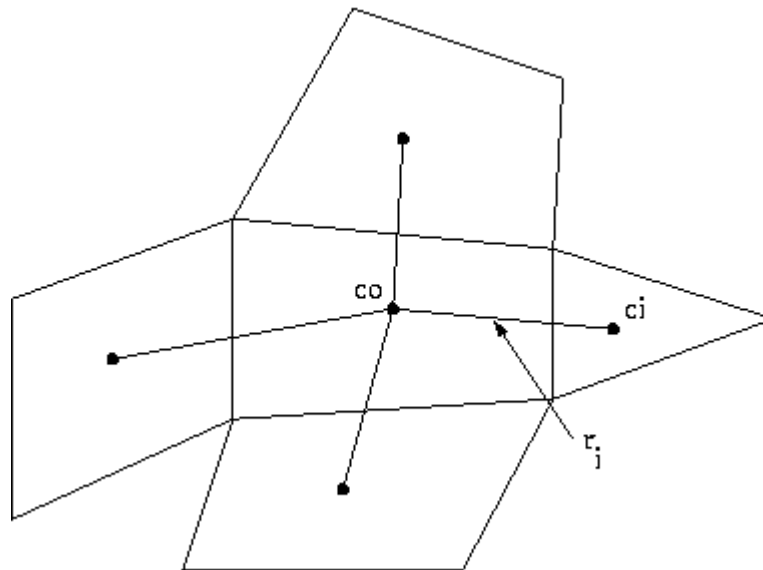


Figura A1 – Calcolo del gradiente secondo metodologia *least square cell based*. [Manuale utente di Ansys Fluent].

Considerando ogni cella nell'intorno di c_0 si ottiene il seguente sistema:

$$[J](\nabla \phi)_{c_0} = \Delta \phi \quad [\text{A15}]$$

in cui \mathbf{J} rappresenta la matrice dei coefficienti, dipendente unicamente dalla geometria; la decomposizione della matrice \mathbf{J} determina la formazione di una matrice di “funzioni peso” \mathbf{W} per ogni cella computazionale (tre componenti o fattori di peso per ogni faccia della cella).

Il gradiente rispetto al centro della cella in esame viene ottenuto moltiplicando i fattori di peso per la differenza

$$\Delta\phi = (\phi_{c1} - \phi_{c0}) \quad [\text{A16}]$$

Il metodo precedentemente illustrato è indicato nel caso in cui sia richiesta una elevata accuratezza della soluzione del problema ed è stato quindi utilizzato nel corso delle simulazioni effettuate nel presente lavoro di tesi.

A.4 Particle Image Velocimetry (PIV)

Componenti del sistema

Il *Particle Image Velocimetry* (PIV) è un metodo ottico di visualizzazione dei flussi; è utilizzato per ricavare misure di velocità istantanea e per estrarre informazioni su altri importanti parametri tra cui il coefficiente di diffusione di una determinata specie chimica all'interno di un fluido.

Il *setup* sperimentale di un sistema di “*particle image velocimetry*” o PIV è costituito da molteplici componenti; particelle o sostanze fluorescenti devono essere inserite all'interno della rete di micro canali da analizzare e necessitano di due eccitazioni da parte di una sorgente laser in un brevissimo intervallo temporale; la luce diffusa (*scattering*) dalle particelle viene registrata in un singolo fotogramma o in una sequenza di fotogrammi; un complesso sistema di *post-processing* elabora infine i dati ottenuti consentendo l'estrazione delle informazioni desiderate.

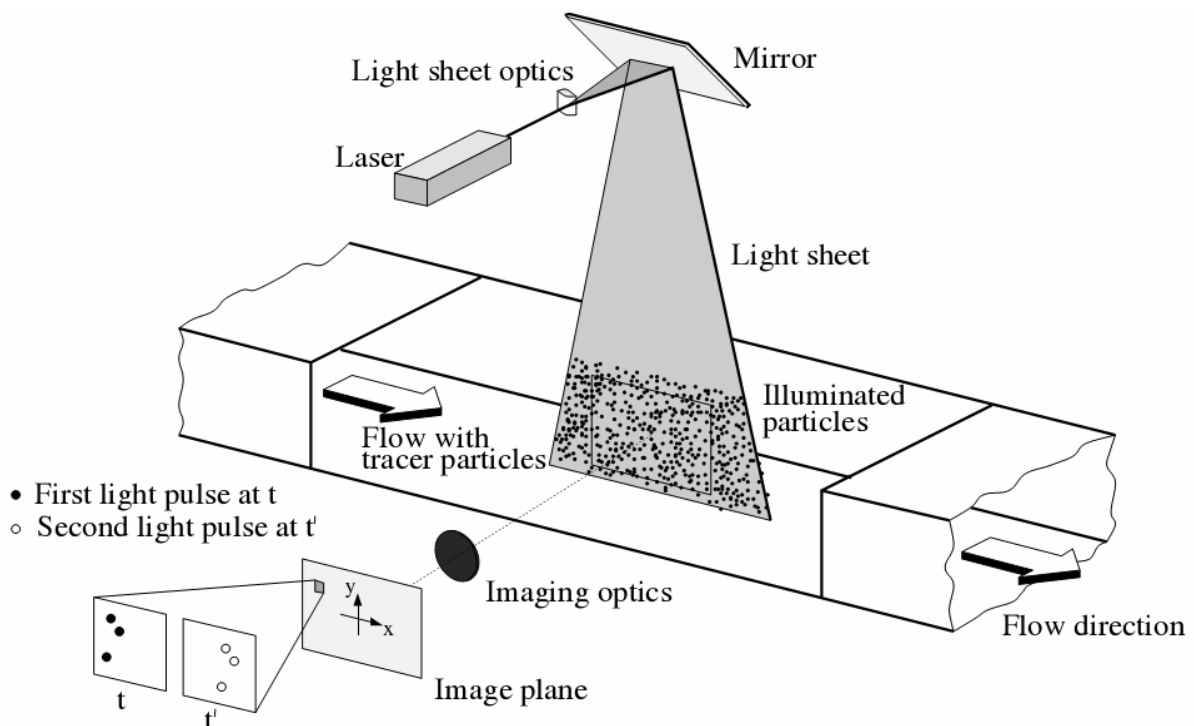


Figura A2 – Schema dei componenti del sistema PIV. [*Particle Image Velocimetry, A Practical Guide*]

In figura A2 è riportato uno schema dei principali sottosistemi che costituiscono il dispositivo: dopo l'aggiunta delle molecole fluorescenti un piano denominato “*light sheet*” all'interno del flusso viene illuminato due volte in un ridotto intervallo di tempo dalla sorgente laser (l'intervallo temporale compreso tra i due impulsi laser dipende da diversi parametri tra cui la velocità media del flusso nei

microcanali); la radiazione diffusa dalle particelle attraversa un sistema ottico costituito da una lente di alta qualità e viene registrata in uno o due fotogrammi separati; uno scanner consente la digitalizzazione delle acquisizioni che vengono direttamente trasferite nella memoria di un PC. Le acquisizioni PIV sono suddivise in una serie di piccole superfici denominate “*interrogation areas*”; il vettore di spostamento delle molecole fluorescenti è determinato per ognuna delle microaree attraverso l'utilizzo di funzioni di auto-correlazione e cross-correlazione; si assume che tutte le particelle presenti all'interno di una *interrogation area* si siano mosse in modo omogeneo tra i due istanti di eccitazione laser; la proiezione del vettore velocità nel piano *light sheet* precedentemente definito è calcolata tenendo in considerazione il ritardo temporale tra i due impulsi. Il processo viene ripetuto per ognuna delle *interrogation areas* in cui è suddivisa l'acquisizione e l'intero processo di elaborazione, considerando la presenza di migliaia di vettori velocità istantanea, ha una durata dell'ordine del secondo o delle frazioni di secondo sui moderni computer.

Caratteristiche generali del sistema PIV

Misura non invasiva del campo di velocità

In contrasto con altre tecniche di misura delle velocità di flusso che utilizzano sonde invasive in grado di alterare le proprietà del moto la tecnologia PIV utilizza metodi ottici non invasivi; ciò consente di acquisire informazioni accurate anche in presenza di alte velocità o in prossimità delle pareti dei condotti dove la presenza di sonde può alterare il comportamento fluidodinamico.

Misura indiretta della velocità

La velocità degli elementi fluidi è misurata in modo indiretto a partire dal calcolo delle velocità delle particelle fluorescenti presenti all'interno del flusso, proprio come nella tecnica “*laser doppler velocimetry*”. La tecnologia PIV consente di registrare immagini di ampie sezioni del campo di flusso in molteplici applicazioni che utilizzano liquidi o gas; al contrario la maggior parte delle tecniche attualmente a disposizione consente la misurazione puntuale della velocità, sebbene con una elevata risoluzione temporale; la tecnologia PIV è caratterizzata da un'ottima risoluzione spaziale mentre la risoluzione temporale non è ancora paragonabile a quella delle applicazioni tradizionali a causa di limitazioni tecniche.

Velocity lag

La necessità di utilizzare particelle per la misura delle velocità richiede un controllo accurato per ogni singola prova sperimentale del comportamento che queste assumeranno all'interno

del flusso: in genere molecole di piccole dimensioni sono in grado di seguire in modo migliore il moto del fluido utilizzato.

Illuminazione

In molteplici applicazioni che coinvolgono fluidi gassosi una sorgente luminosa ad elevata potenza è richiesta per l'illuminazione delle piccole particelle così da esporre in modo ottimale i sensori ottici alla radiazione diffusa; la necessità di utilizzare molecole di grosse dimensioni a causa della superiore capacità di *scattering* risulta in contrasto con il requisito di piccole particelle, in grado di seguire in modo fedele il moto del fluido; ogni singola prova eseguita in laboratorio richiede quindi la definizione di un compromesso a causa del *trade-off* presente. In presenza di fluidi liquidi è possibile utilizzare particelle di dimensioni superiori rispetto ad altre applicazioni: la superiore capacità di *scattering* consente di utilizzare sorgenti luminose con potenza di picco limitata.

Durata dell'impulso laser

La durata dell'impulso laser deve essere sufficientemente breve in modo da "congelare" il moto delle particelle ed al contempo evitare fenomeni di *blurring* delle immagini ("no streaks"). In genere la durata di ogni impulso è di circa 5 ns.

Ritardo temporale tra i due impulsi

Il ritardo temporale tra i due impulsi forniti dalla sorgente laser deve essere sufficientemente lungo da consentire la determinazione dello spostamento tra le due immagini acquisite delle particelle con buona risoluzione e sufficientemente breve tale da evitare che particelle dotate di una componente di velocità fuori dal piano siano in grado di lasciare il cosiddetto "*light sheet*" tra le due illuminazioni consecutive.

Distribuzione delle particelle all'interno del fluido

Qualitativamente possono essere distinte tre diverse tipologie di immagini di densità come riportato in figura A3: nel caso di immagini a bassa densità è possibile identificare singole particelle ed osservare immagini della medesima particella originate da diverse illuminazioni (i due impulsi); questa situazione è nota come PTV cioè *particle tracking velocimetry*. Nel caso di immagini a media densità è ancora possibile localizzare le singole particelle mentre risulta impossibile identificare coppie di immagini dall'analisi visiva delle acquisizioni; immagini di questo tipo sono richieste per applicare le tecniche statistiche di valutazione PIV. Immagini ad alta densità sono

caratterizzate dall'impossibilità di rilevare singole particelle dal momento che queste si sovrappongono in molti casi originando i cosiddetti "speckle"; questa situazione è denominata "laser speckle velocimetry" o LSV.

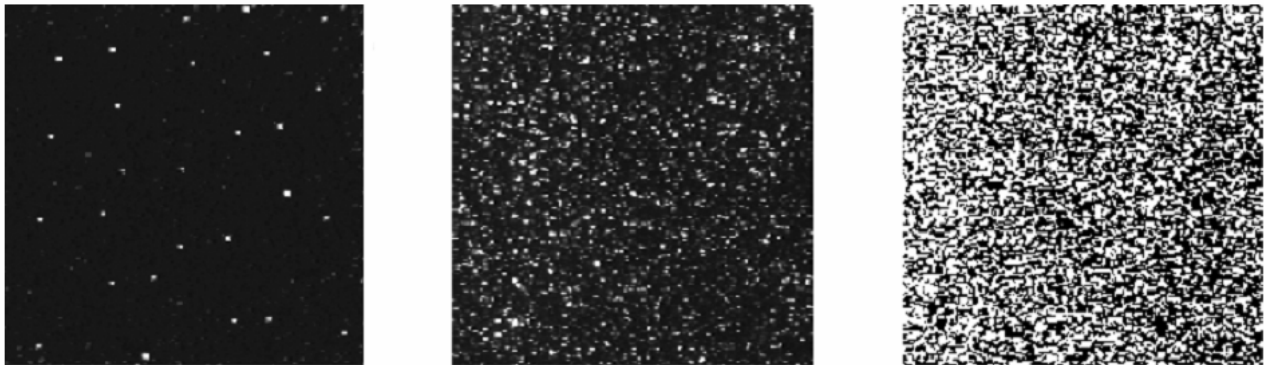


Figura A3 – Immagini a bassa (sinistra), media (centro) ed alta (destra) densità ottenibili mediante sistema PIV. [Particle Image Velocimetry, A Practical Guide]

Numero di componenti del vettore velocità

A causa dell'illuminazione planare del campo di moto solo due componenti del vettore velocità possono essere identificate mediante la tecnologia PIV standard denominata 2C-PIV; sono disponibili metodi per l'estrazione della terza componente del vettore velocità tra cui la cosiddetta *dual-plane* PIV che consentono di definire la tecnica 3C-PIV. Si sottolinea infine la possibilità di definire differenti *light sheets* paralleli all'interno di un volume: tale tecnica prende il nome di 2+1D-PIV in quanto introduce un'analisi tridimensionale del campo di moto.

Risoluzione temporale e spaziale

La risoluzione temporale dei sistemi PIV (*frame rate of recording PIV images*) non è particolarmente elevata sebbene lo sviluppo attuale di laser ad alta velocità di emissione e di sistemi di acquisizione adeguati stia migliorando sensibilmente la situazione. La dimensione delle *interrogation areas* deve essere sufficientemente ridotta per evitare la generazione di errori nei risultati: essa determina il numero di vettori velocità indipendenti e quindi la massima risoluzione spaziale della mappa di velocità che può essere ottenuta una volta fissata la risoluzione spaziale del sensore utilizzato per l'acquisizione.

Tecnologia PIV e microscala

La tecnologia PIV apre nuove prospettive nel campo della fluidodinamica specialmente in presenza di flussi non stazionari dal momento che consente di catturare istantaneamente l'intero campo di velocità; altre tecniche quantitative di visualizzazione in grado di fornire informazioni su importanti parametri fisici dei fluidi quali densità e temperatura sono già note e ampiamente utilizzate; l'unione delle potenzialità offerte dalle differenti metodologie consentirà nell'immediato futuro una più accurata descrizione sperimentale del comportamento di un fluido e un confronto sempre più rigoroso con i modelli computazionali utilizzati.

La progettazione e realizzazione di dispositivi microfluidici ha subito una forte accelerazione nel corso degli ultimi anni: citometria a flusso, piattaforme per l'analisi di nuovi farmaci o del comportamento cellulare, elettroforesi capillare per la separazione di frammenti di DNA o altre molecole, microcamere PCR sono solo alcune delle nuove tecnologie a disposizione dei laboratori di biologia molecolare/cellulare. I dettagli del moto dei fluidi attraverso reti di microcanali uniti alle molteplici interazioni tra molecole, cellule e pareti del dispositivo determinano fenomeni molto complessi e difficili da simulare numericamente. L'applicazione della tecnologia PIV alla microscala ha condotto così alla realizzazione dei primi sistemi μ PIV dotati di una risoluzione spaziale così elevata tale da consentire misurazioni su una scala micrometrica. Il primo sistema μ PIV progettato era dotato di una risoluzione spaziale di $6.9 \times 6.9 \times 1.5 \mu\text{m}^3$ e utilizzava un microscopio a fluorescenza ed una camera CCD per rilevare particelle di polistirene con diametro di 300 nm. In figura A4 è riportato lo schema di un sistema μ PIV attuale caratterizzato da una sorgente di illuminazione laser in grado di eccitare particelle fluorescenti con diametro di 200 nm.

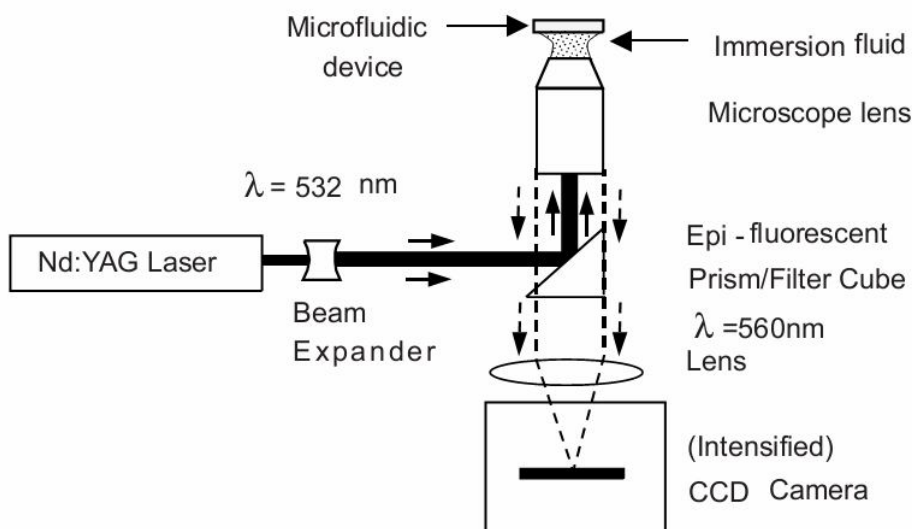


Figura A4 – Apparato sperimentale di un sistema μ PIV. [*Particle Image Velocimetry, A Practical Guide*]

Tra i primi studi condotti con μ PIV ricordiamo quelli di Meinhart e colleghi del 1999 che misurarono il campo di flusso all'interno di microcanali con ampiezza $300\ \mu\text{m}$ e profondità $30\ \mu\text{m}$ generato da una portata di $50\ \mu\text{l/h}$; l'apparato sperimentale utilizzato (figura A4) era dotato di una lente con ingrandimento $60\times$ e apertura numerica 1.4 immersa in olio. Le particelle utilizzate dotate di diametro $200\ \text{nm}$ furono scelte in modo da seguire in modo ottimale il flusso e risultavano circa 150 volte più piccole rispetto alla più piccola dimensione dei canali.

La tabella A1 consente di confrontare diverse tecniche utilizzate per la valutazione del campo di moto di un fluido nel corso degli ultimi 15 anni con indicazioni sulla risoluzione spaziale e sul tipo di particelle utilizzate; l'avvento dei sistemi μ PIV ha portato ad un significativo miglioramento delle prestazioni consentendo di superare limiti ritenuti fino a pochi anni prima insormontabili.

<i>Technique</i>	<i>Author</i>	<i>Flow Tracer</i>	<i>Spatial Resolution</i> (μm)	<i>Observation</i>
LDA	Tieu et al. (1995)	—	$5 \times 5 \times 10$	4–8 fringes limits velocity resolution
Optical Doppler tomography (ODT)	Chen et al. (1997)	$1.7\ \mu\text{m}$ polystyrene beads	5×15	Can image through highly scattering media
Optical flow using video microscopy	Hitt et al. (1996)	$5\ \mu\text{m}$ blood cells	$20 \times 20 \times 20$	In vivo study of blood flow
Optical flow using X-ray imaging	Lanzillotto et al. (1996)	$1 - 20\ \mu\text{m}$ emulsion droplets	$\sim 20 - 40$	Can image without optical access
Uncaged fluorescent dyes	Paul et al. (1997)	Molecular Dye	$100 \times 20 \times 20$	Resolution limited by molecular diffusion
Particle streak velocimetry	Brody et al. (1996)	$0.9\ \mu\text{m}$ polystyrene beads	~ 10	Particle streak velocimetry
PIV	Urushihara et al. (1993)	$1\ \mu\text{m}$ oil droplets	$280 \times 280 \times 200$	Turbulent flows
Super-resolution PIV	Keane et al. (1995)	$1\ \mu\text{m}$ oil droplets	$50 \times 50 \times 200$	Particle tracking velocimetry
μ PIV	Santiago et al. (1998)	$300\ \text{nm}$ polystyrene particles	$6.9 \times 6.9 \times 1.5$	Hele-Shaw Flow
μ PIV	Meinhart et al. (1999)	$200\ \text{nm}$ polystyrene particles	$5.0 \times 1.3 \times 2.8$	Microchannel flow
μ PIV	Westerweel et al. (2004)	$500\ \text{nm}$ polystyrene particles	$0.5 \times 0.5 \times 2.0$	Silicon microchannel flow

Tabella A1 – Tecniche utilizzate per la valutazione del campo di moto di un fluido.
[*Particle Image Velocimetry, A Practical Guide*]

Rodamina WT

Prove sperimentali effettuate mediante tecnologia μ PIV possono essere eseguite utilizzando rodamina WT (figura A5); è possibile valutare la diffusione di tale molecola all'interno di un dato solvente, confrontare le prestazioni di differenti *micromixer* o in generale il funzionamento di molteplici dispositivi microfluidici; la rodamina WT è un colorante rosso che eccitato da una sorgente laser ad una lunghezza d'onda prossima ai 540 nm presenta un picco di emissione intorno ai 585 nm; in figura A6 vengono riportati gli spettri di emissione relativi a due isomeri di rodamina WT: la massima emissione viene rilevata a 585 nm per l'isomero 1 e a 588 nm per l'isomero 2.

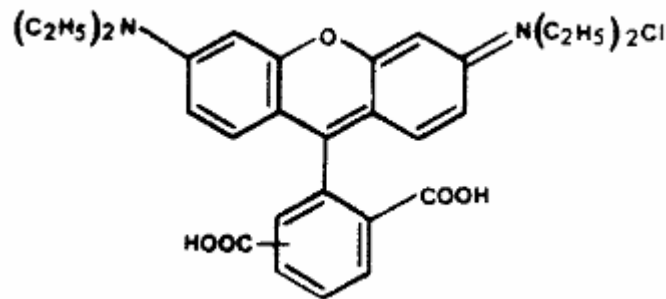


Figura A5 – Struttura chimica della rodamina WT. [Sutton et al., 2000]

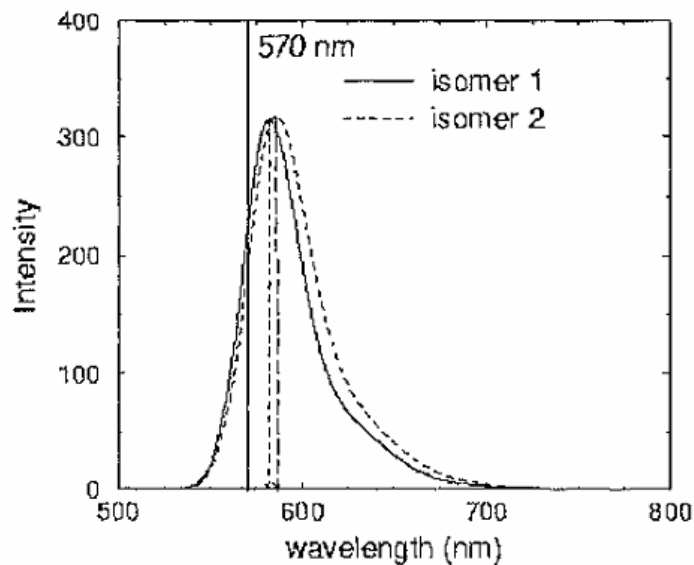


Figura A6 – Spettri di emissione relativi a due isomeri di rodamina WT. [Sutton et al., 2000]

A.5 Modelli analitici

```

% Modello analitico utilizzato per la definizione dei punti di spillamento nel
% dispositivo presentato al capitolo 2 paragrafo 2.3

% Bibliografia:
% Gorman et al., 2008
% Wu et al., 2005

% Parametri definiti dall'utente
D=1e-10; % Coefficiente di diffusione [m^2/s]
Z=4; % Livelli di concentrazione richiesti in uscita/numero di colture cellulari
Qc=1.83e-10; % Portata desiderata alle cellule [m^3/s]

% Inserimento manuale dei valori di concentrazione richiesti
C=zeros(Z,1); % Vettore dei valori medi di concentrazione richiesti
C(1,1)=0.01; % Primo valore di concentrazione richiesto (min=0, max=1)
C(2,1)=0.1; % Secondo valore di concentrazione richiesto (min=0, max=1)
C(3,1)=0.5; % Terzo valore di concentrazione richiesto (min=0, max=1)
C(4,1)=0.97; % Quarto valore di concentrazione richiesto (min=0, max=1)

% Dimensionamento del microcanale
wIN=600e-6; % Width A1 [m]
d=600e-6; % Depth [m]; i microcanali hanno tutti la stessa profondità

% Parametri relativi ai due ingressi - A0
Q0b=(1/2)*Qc*Z; % Portata nel microcanale A0 mezzo [m^3/s]
Q0a=Q0b; % Portata nel microcanale A0 farmaco [m^3/s]
gamma=Q0b/Q0a;
alfa=1/(1+gamma); % Parametro utilizzato per il calcolo del profilo di
%concentrazione
Q1=Q0a+Q0b; % Portata nel canale A1 [m^3/s]

% Vettori per la risoluzione dell'algoritmo
w=zeros(Z,1); % Larghezze dei microcanali in cui avviene la diffusione [m]
l=zeros(Z,1); % Lunghezze dei microcanali in cui avviene la diffusione [m]
v=zeros(Z,1); % Velocità [m/s]
Pe=zeros(Z,1); % Numeri di Péclet nei microcanali in cui avviene diffusione [-]
N=zeros(Z,1); % Livelli di concentrazione in ingresso al canale Ap
T=zeros(Z,1); % Rapporto lunghezza/larghezza dei microcanali
% Parametri relativi ai canali di miscelamento
T(1,1)=2000; % Inserimento manuale di T
T(2,1)=1000;
T(3,1)=80;
T(4,1)=80;
for p=1:Z
    w(p,1)=wIN*((Z+1-p)/Z); % Definizione larghezza microcanali a partire da wIN
    l(p,1)=T(p,1)*w(p,1); % Definizione lunghezza microcanali come multipli
%della larghezza
    v(p,1)=(Q1*((Z-p+1)/Z))/(w(p,1)*d); % Velocità in Ap [m/s]
    Pe(p,1)=v(p,1)*w(p,1)/D; % Numero di Péclet [-]
    N(p,1)=int32(101*(Z+1-p)/(Z+2-p));
end
N(1,1)=101; % La formula precedente non funziona per N(1,1)

% Parametri per approssimazione numerica
q=0.01; % Intervallo per creazione vettori
M=1000; % Infinito della sommatoria
s=zeros(Z,1); % Indice della matrice in cui si trova il primo valore da spillare

```

```

tic
x1=[0:q:T(1,1)]; % Vettore adimensionalizzato per lunghezza microcanale
x2=[0:q:T(2,1)];
x3=[0:q:T(3,1)];
x4=[0:q:T(4,1)];
y1=[0:q:1]; % Vettore adimensionalizzato per larghezza microcanale
y2=[0:q:1];
y3=[0:q:1];
y4=[0:q:1];
OUT1=zeros(length(y1),length(x1)); % Matrice delle uscite/soluzioni
OUT2=zeros(length(y2),length(x2));
OUT3=zeros(length(y3),length(x3));
OUT4=zeros(length(y4),length(x4));
media_S1=zeros(1,length(x1)); % Matrice degli spillamenti con valori medi di
%concentrazione
media_S2=zeros(1,length(x2));
media_S3=zeros(1,length(x3));
media_S4=zeros(1,length(x4));

% Calcoli per ottenere Cp ed lp
A=zeros(Z,1); % Costante da aggiungere ad OUT
Ak=zeros(M,Z); % Valore per ottenere OUT
toc

% Calcolo l(1,1)
tic
for i=1:M
    OUT1=OUT1+(2/pi)*(sin(i*alfa*pi)/i)*cos(i*pi*y1)^(exp(-
2*i^2*pi^2/(Pe(p,1)+sqrt(Pe(p,1)^2+4*i^2*pi^2))*x1));
end
OUT1=OUT1+alfa; % Matrice della concentrazione lungo A1
media_S1=mean(OUT1(N(1+1,1):length(y1),:)); % Media delle concentrazioni nella
%zona di spillamento
for j=1:(length(x1))
    if s(1,1)==0
        if media_S1(1,j)>=(C(1,1)-0.01*C(1,1)) &
media_S1(1,j)<=(C(1,1)+0.01*C(1,1)) % Scelta di un intorno del livello di
%concentrazione
            s(1,1)=j;
        end
    end
end
C_fin1=OUT1(:,s(1,1)); % Concentrazioni spillamento 1
%surf(OUT1(:,1:s(1,1))) % Visualizzazione del profilo di concentrazione nel
%microcanale di miscelamento 1 fino al punto di spillamento
toc

% Calcolo l(2,1)
tic
% Definizione della costante A
for i=1:(N(2,1))
    A(2,1)=A(2,1)+(1/N(2,1))*(OUT1(i,s(2-1,1))/max(OUT1(1:(N(2-1,1)),s(2-
1,1))));
end
% Calcolo della soluzione
for k=1:M
    for z=1:(N(2,1)-1)
        Ak(k,2)=Ak(k,2)+(sqrt(2)/(k*pi))*(OUT1(z,s(2-1,1))-OUT1(z+1,s(2-
1,1)))*sin(k*pi*z/N(2,1));
    end
end
end

```

```

for k=1:M
    OUT2=OUT2+sqrt(2)*Ak(k,2)*cos(k*pi*y2')*(exp(-
2*k^2*pi^2*x2/(Pe(2,1)+sqrt(Pe(2,1)^2+4*k^2*pi^2)));
end
OUT2=OUT2+A(2,1); % Matrice della concentrazione lungo A2
media_S2=mean(OUT2(N(2+1,1):length(y2),:)); % Media delle concentrazioni nella
%zona di spillamento
for j=1:(length(x2))
    if s(2,1)==0
        if media_S2(1,j)>=(C(2,1)-0.01*C(2,1)) &
media_S2(1,j)<=(C(2,1)+0.01*C(2,1)) % Scelta di un intorno del livello di
%concentrazione
            s(2,1)=j;
        end
    end
end
C_fin2=OUT2(:,s(2,1)); % Concentrazioni spillamento 2
%hold on
%surf(OUT2(:,1:s(2,1))) % Visualizzazione del profilo di concentrazione nel
microcanale di miscelamento 2 fino al punto di spillamento
toc

% Calcolo l(3,1)
tic
% Definizione della costante A
for i=1:(N(3,1))
    A(3,1)=A(3,1)+(1/N(3,1))*(OUT2(i,s(3-1,1))/max(OUT2(1:(N(3-1,1)),s(3-
1,1))));
end
% Calcolo della soluzione
for k=1:M
    for z=1:(N(3,1)-1)
        Ak(k,3)=Ak(k,3)+(sqrt(2)/(k*pi))*(OUT2(z,s(3-1,1))-OUT2(z+1,s(3-
1,1)))*sin(k*pi*z/N(3,1));
    end
end
for k=1:M
    OUT3=OUT3+sqrt(2)*Ak(k,3)*cos(k*pi*y3')*(exp(-
2*k^2*pi^2*x3/(Pe(3,1)+sqrt(Pe(3,1)^2+4*k^2*pi^2)));
end
OUT3=OUT3+A(3,1); % Matrice della concentrazione lungo A3
media_S3=mean(OUT3(N(3+1,1):length(y3),:)); % Media delle concentrazioni nella
%zona di spillamento
for j=1:(length(x3))
    if s(3,1)==0
        if media_S3(1,j)>=(C(3,1)-0.01*C(3,1)) &
media_S3(1,j)<=(C(3,1)+0.01*C(3,1)) % Scelta di un intorno del livello di
%concentrazione
            s(3,1)=j;
        end
    end
end
C_fin3=OUT3(:,s(3,1)); % Concentrazioni spillamento 3
%hold on
%surf(OUT3(:,1:s(3,1))) % Visualizzazione del profilo di concentrazione nel
microcanale di miscelamento 3 fino al punto di spillamento
toc

% Calcolo l(4,1)
tic
% Definizione della costante A

```



```

for i=1:(N(4,1))
    A(4,1)=A(4,1)+(1/N(4,1))*(OUT3(i,s(4-1,1))/max(OUT3(1:(N(4-1,1)),s(4-1,1))));
end
% Calcolo della soluzione
for k=1:M
    for z=1:(N(4,1)-1)
        Ak(k,4)=Ak(k,4)+(sqrt(2)/(k*pi))*(OUT3(z,s(4-1,1))-OUT3(z+1,s(4-1,1)))*sin(k*pi*z/N(4,1));
    end
end
for k=1:M
    OUT4=OUT4+sqrt(2)*Ak(k,2)*cos(k*pi*y4')*(exp(-2*k^2*pi^2*x4/(Pe(4,1)+sqrt(Pe(4,1)^2+4*k^2*pi^2))));
end
OUT4=OUT4+A(4,1); % Matrice della concentrazione lungo A4
media_S4=mean(OUT4); % Media delle concentrazioni nella zona di spillamento
%(ultimo canale)
for j=1:(length(x4))
    if s(4,1)==0
        if media_S4(1,j)>=(C(4,1)-0.01*C(4,1)) &
media_S4(1,j)<=(C(4,1)+0.01*C(4,1)) % Scelta di un intorno del livello di
%concentrazione
            s(4,1)=j;
        end
    end
end
if s(4,1)==1
    s(4,1)=100;
end
C_fin4=OUT4(:,s(4,1)); % Concentrazioni spillamento 4
%hold on
%surf(OUT4(:,1:s(4,1))) % Visualizzazione del profilo di concentrazione nel
microcanale di miscelamento 4 fino al punto di spillamento
toc

tic
for p=1:Z
    l(p,1)=l(p,1)*s(p,1)*(q/T(p,1)); % Calcolo lunghezza microcanale di
%miscelazione [m]
end
toc

```

```

% Modello analitico utilizzato per il calcolo del profilo di concentrazione in
% un microcanale dotato di spillamenti successivi (Capitolo 2 paragrafo 2.3)

% Bibliografia:
% Gorman et al., 2008
% Wu et al., 2005

% Parametri definiti dall'utente
D=1e-10; % Coefficiente di diffusione [m^2/s]
Z=3; % Livelli di concentrazione richiesti in uscita/numero di colture cellulari
Qc=2e-8; % Portata desiderata alle cellule [m^3/s]

% Dimensionamento del microcanale
wIN=600e-6; % Width A1 [m]
d=210e-6; % Depth [m]; i microcanali hanno tutti la stessa profondità

% Parametri relativi ai due ingressi - A0
Q0b=(1/2)*Qc*Z; % Portata nel microcanale A0 mezzo [m^3/s]
Q0a=Q0b; % Portata nel microcanale A0 farmaco [m^3/s]
gamma=Q0b/Q0a;
alfa=1/(1+gamma); % Parametro utilizzato per il calcolo del profilo di
%concentrazione
Q1=Q0a+Q0b; % Portata nel microcanale A1 [m^3/s]

% Vettori per la risoluzione dell'algoritmo
w=zeros(Z,1); % Larghezze dei microcanali in cui avviene la diffusione [m]
l=zeros(Z,1); % Lunghezze dei microcanali in cui avviene la diffusione [m]
v=zeros(Z,1); % Velocità [m/s]
Pe=zeros(Z,1); % Numeri di Péclet nei microcanali in cui avviene diffusione [-]
N=zeros(Z,1); % Livelli di concentrazione in ingresso al canale Ap
T=zeros(Z,1); % Rapporto lunghezza/larghezza dei microcanali

% Inserimento manuale delle lunghezze dei microcanali di miscelamento
l(1,1)=1e-3;
l(2,1)=2e-3;
l(3,1)=4e-3;
for p=1:Z
    w(p,1)=wIN*((Z+1-p)/Z); % Definizione larghezza canali a partire da wIN
    T(p,1)=l(p,1)/w(p,1);
    v(p,1)=(Q1*((Z-p+1)/Z))/(w(p,1)*d); % Velocità in Ap [m/s]
    Pe(p,1)=v(p,1)*w(p,1)/D; % Numero di Péclet
    N(p,1)=int32(101*(Z+1-p)/(Z+2-p));
end
N(1,1)=101; % La formula precedente non funziona per N(1,1)

% Parametri per approssimazione numerica
q=0.01; % Intervallo per creazione vettori
M=1000; % Infinito della sommatoria
s=zeros(Z,1); % Indice della matrice in cui si trova il primo valore da spillare

tic
x1=[0:q:T(1,1)]; % Vettore adimensionalizzato per lunghezza canale
x2=[0:q:T(2,1)];
x3=[0:q:T(3,1)];
y1=[0:q:1]; % Vettore adimensionalizzato per larghezza canale
y2=[0:q:1];
y3=[0:q:1];
OUT1=zeros(length(y1),length(x1)); % Matrice delle uscite/soluzioni
OUT2=zeros(length(y2),length(x2));
OUT3=zeros(length(y3),length(x3));

```

```

% Calcoli per ottenere Cp ed lp
A=zeros(Z,1); % Costante da aggiungere ad OUT
Ak=zeros(M,Z); % Parametro da utilizzare per il calcolo di OUT
toc

% Calcolo C(1,1)
tic
for i=1:M
    OUT1=OUT1+(2/pi)*(sin(i*alfa*pi)/i)*cos(i*pi*y1)'*(exp(-
    2*i^2*pi^2/(Pe(p,1)+sqrt(Pe(p,1)^2+4*i^2*pi^2))*x1));
end
OUT1=OUT1+alfa; % Matrice della concentrazione lungo A1
C_fin1=OUT1(:,length(x1)); % Concentrazioni spillamento 1
media_1=mean(OUT1);
Cm(1,1)=mean(OUT1(1:(N(1+1,1)),length(x1))); % Vettore della media delle
%concentrazioni sulla larghezza di microcanale che continua il miscelamento [-]
Cs(1,1)=mean(OUT1((N(1+1,1)+1):128,length(x1))); % Vettore della media delle
%concentrazioni sulla larghezza di microcanale che viene spillata [-]
surf(OUT1) % Visualizzazione del profilo di concentrazione nel microcanale di
%miscelamento 1 fino al punto di spillamento
toc

% Calcolo C(2,1)
tic
% Definizione della costante A
for i=1:(N(2,1))
    A(2,1)=A(2,1)+(1/N(2,1))*(C_fin1(i,:)/max(C_fin1(1:(N(2-1,1)),:)));
end
% Calcolo della soluzione
for k=1:M
    for z=1:(N(2,1)-1)
        Ak(k,2)=Ak(k,2)+(sqrt(2)/(k*pi))*(C_fin1(z,:)-
        C_fin1(z+1,:))*sin(k*pi*z/N(2,1));
    end
end
for k=1:M
    OUT2=OUT2+sqrt(2)*Ak(k,2)*cos(k*pi*y2)'*(exp(-
    2*k^2*pi^2*x2/(Pe(2,1)+sqrt(Pe(2,1)^2+4*k^2*pi^2))));
end
OUT2=OUT2+A(2,1); % Matrice della concentrazione lungo A2
C_fin2=OUT2(:,length(x2)); % Concentrazioni spillamento 2
media_2=mean(OUT2);
Cm(2,1)=mean(OUT2(1:(N(2+1,1)),length(x2))); % Vettore della media delle
%concentrazioni sulla larghezza di microcanale che continua il miscelamento [-]
Cs(2,1)=mean(OUT2((N(2+1,1)+1):128,length(x2))); % Vettore della media delle
%concentrazioni sulla larghezza di microcanale che viene spillata [-]
surf(OUT2) % Visualizzazione del profilo di concentrazione nel microcanale di
%miscelamento 2 fino al punto di spillamento
toc

% Calcolo C(3,1)
tic
% Definizione della costante A
for i=1:(N(3,1))
    A(3,1)=A(3,1)+(1/N(3,1))*(C_fin2(i,:)/max(C_fin2(1:(N(3-1,1)),:)));
end
% Calcolo della soluzione
for k=1:M
    for z=1:(N(3,1)-1)

```

```

Ak(k,3)=Ak(k,3)+(sqrt(2)/(k*pi))*(C_fin2(z,:)-C_fin2(z+1,:))*sin(k*pi*z/N(3,1));
    end
end
for k=1:M
    OUT3=OUT3+sqrt(2)*Ak(k,3)*cos(k*pi*y3')*(exp(-
2*k^2*pi^2*x3/(Pe(3,1)+sqrt(Pe(3,1)^2+4*k^2*pi^2))));
end
OUT3=OUT3+A(3,1); % Matrice della concentrazione lungo A3
media_3=mean(OUT3); % Media delle concentrazioni nella zona di spillamento
%(ultimo canale)
C_fin3=OUT3(:,length(x3)); % Concentrazioni spillamento 3
Cm(3,1)=mean(OUT3(:,length(x3)));
Cs(3,1)=mean(OUT3(:,length(x3)));
hold on
surf(OUT3) % Visualizzazione del profilo di concentrazione nel microcanale di
%miscelamento 3 fino al punto di spillamento
toc

```

Bibliografia

Abgrall P, Guè AM, *Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem — a review*, J. Micromech. Microeng., 2007, 17: R15-R49.

Abhyankar VV et al., *Characterization of a membrane-based gradient generator for use in cell-signaling studies*, Lab Chip, 2006, 6(3): 389-393.

Abidi SL, *Detection of diethylnitrosamine in nitrite-rich water following treatment with rhodamine flow tracers*, Water Res., 1982, 16: 199-204.

Amarie D, Glazier JA, Jacobson SC, *Compact microfluidic structures for generating spatial and temporal gradients*, Anal. Chem., 2007, 79: 9471-9477.

Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG, *Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner*, PNAS, 2002, 99(20): 12600-12605.

Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P, *Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro*, Bone, 2008, 42: 129-138.

Bono CM, Einhorn TA, *Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength*, Eur Spine J, 2003, 12 (Suppl. 2): S90-S96.

Burdick JA, Khademhosseini A, Langer R, *Fabrication of gradient hydrogels using a microfluidics/photopolymerization process*, Langmuir, 2004, 20(13): 5153-5156.

Campbell K, Groisman A, *Generation of complex concentration profiles in microchannels in a logarithmically small number of steps*, Lab Chip, 2007, 7: 264-272.

Chudy M, Grabowska I, Ciosek P, Filipowicz-Szymanska A, Stadnik D, Wyzkiewicz I, Jedrych E, Juchniewicz M, Skolimowski M, Ziolkowska K, Kwapiszewski R, *Miniaturized tools and devices for bioanalytical applications: an overview*, Anal. Bioanal. Chem., 2009, 395: 647-668.

Chung BG, Flanagan LA, Rhee SW, Schwartz PH, Lee AP, Monuki ES, Jeon NL, *Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device*, Lab Chip, 2005, 5: 401-406.

Chung BG, Lin F, Jeon NL, *A microfluidic multi-injector for gradient generation*, Lab Chip, 2006, 6: 764-768.

Delamarche E, Schmid H, Biebuyck HA, Michel B, *Stability of molded microstructures in polydimethylsiloxane*, Adv. Mater., 1997, 9: 741-746.

Delamarche E, Bernard A, Schmid H, Bietsch A, Michel B, Biebuyck H, *Microfluidic networks for chemical patterning of substrate: design and applications to bioassays*, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120(3): 500-508.

Del Zoppo, *Dispense del corso di Nanomateriali*, 2008.

Diao J, Young L, Kim S, Fogarty EA, Heilman SM, Zhou P, Shuler ML, Wu M, DeLisa MP, *A three-channel microfluidic device for generating static linear gradients and its application to the quantitative analysis of bacterial chemotaxis*, Lab Chip, 2006, 6: 381-388.

Dittrich PS, Manz A, *Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery*, Nature Rev. Drug Discov., 2006, 5: 210-218.

Du Y, Shim J, Vidula M, Hancock MJ, Lo E, Chung BG, Borenstein JT, Khabiry M, Cropek DM, Khademhosseini A, *Rapid generation of spatially and temporally controllable long-range concentration gradients in a microfluidic device*, Lab Chip, 2009, 9: 761-767.

Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJA, Whitesides GM, *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*, Anal. Chem., 1998, 70: 4974-4984.

El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF, *Cells on chips*, Nature, 2006, 442: 403-411.

Frevert CW et al., *Measurement of cell migration in response to an evolving radial chemokine gradient triggered by a microvalve*, Lab Chip, 2006, 6(7): 849-856.

Fujii SI, Uematsu M, Yabuki S, Abo M, Yoshimura E, Sato K, *Microbioassay system for an anti-cancer agent test using animal cells on a microfluidic gradient mixer*, Analytical Sciences, 2006, 22: 87-90.

Ganan-Calvo AM, Gordillo JM, *Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing*, Phys. Rev. Lett., 2001, 87.

Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Arlot ME, Delmas PD, *Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss, and bone mass in postmenopausal women: the OFELY study*, J. Bone Miner. Res., 1996, 11: 827-834.

Gorman BR, Wikswo JP, *Characterization of transport in microfluidic gradient generators*, Microfluid Nanofluid, 2008, 4: 273-285.

Gunawan RC, Silvestre J, Gaskins HR, Kenis PJA, Leckband DE, *Cell migration and polarity on microfabricated gradients of extracellular matrix proteins*, Langmuir, 2006, 22: 4250-4258.

Hansen CL, Skordalakes E, Berger JM, Quake SR, *A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 16531-16536.

Hattori K, Sugiura S, Kanamori T, *Generation of arbitrary monotonic concentration profiles by a serial dilution microfluidic network composed of microchannels with a high fluidic-resistance ratio*, Lab Chip, 2009, 9: 1763-1772.

Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P, *An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients*, J. Cell Biol., 2002, 159(1): 91-102.

Hofstraat JW, Steendijk M, Vriezokolk G, Schreurs W, Broer GJAA, Wijnstok N, *Determination of rhodamine WT in surface water by solid-phase extraction and HPLC with fluorescence detection*, Water Res., 1991, 25(7): 883-890.

Holden MA, Kumar S, Castellana ET, Beskok A, Cremer PS, *Generating fixed concentration arrays in a microfluidic device*, Sens. Actuators B: Chem., 2003, 92(1-2): 199-207.

Hong J, Edel JB, deMello AJ, *Micro - and nanofluidic systems for high-throughput biological screening*, Drug Discovery Today, 2009, 14: 134-146.

Hung PJ, Lee PJ, Sabounchi P, Lin R, Lee LP, *Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays*, Biotechnol. Bioeng., 2005, 89: 1-8.

Irimia D, Geba DA, Toner M, *Universal microfluidic gradient generator*, Anal. Chem., 2006, 78(10): 3472-3477.

Jang K, Sato K, Igawa K, Chung U, Kitamori T, *Development of an osteoblast-based 3D continuous-perfusion microfluidic system for drug screening*, Anal. Bioanal. Chem., 2008, 390: 825-832.

Jeon NL, Dertinger SKW, Chiu DT, Choi IS, Stroock AD, Whitesides GM, *Generation of solution and surface gradients using microfluidics systems*, Langmuir, 2000, 16(22): 8311-8316.

Jeon NL, Baskaran H, Dertinger SK, Whitesides GM, Van de Water L, Toner M, *Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device*, Nat. Biotechnol., 2002, 20(8): 826-830.

Kang L, Chung BG, Langer R, Khademhosseini A, *Microfluidics for drug discovery and development: From target selection to product lifecycle management*, Drug Discovery Today, 2008, 13(1/2): 1-13.

Keenan TM, Folch A, *Biomolecular gradients in cell culture systems*, Lab on a Chip, 2008, 8: 34-57.

- Kim C, Lee K, Kim JH, Shin KS, Lee KJ, Kim TS, Kang JY, *A serial dilution microfluidic device using a ladder network generating logarithmic or linear concentrations*, Lab Chip, 2008, 8: 473-479.
- Kuswandia B, Nuriman, Huskens J, Verboom W, *Optical sensing systems for microfluidic devices: a review*, Analytica Chimica Acta, 2007, 601: 141-155.
- Leclerc E, David B, Griscom L, Lepioufle B, Fujii T, Layrolle P, Legallais C, *Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment*, Biomaterials, 2006, 27: 586-595.
- Lee PJ, Hung PJ, Rao VM, Lee LP, *Nanoliter scale microbioreactor array for quantitative cell biology*, Biotechnol. Bioeng., 2006, 94: 6-14.
- Lee K, Kim C, Ahn B, Panchapakesan R, Full AR, Nordee L, Kang JY, Oh KW, *Generalized serial dilution module for monotonic and arbitrary microfluidic gradient generators*, Lab Chip, 2009, 9:709-717.
- Li CW, Yang J, Yang M, *Dose-dependent cell-based assays in V-shaped microfluidic channels*, Lab Chip, 2006, 6: 921-929.
- Li CW, Chen R, Yang M, *Generation of linear and non-linear concentration gradients along microfluidic channel by microtunnel controlled stepwise addition of sample solution*, Lab Chip, 2007, 7(10): 1371-1373.
- Lin F, Nguyen CMC, Wang SJ, Saadi W, Gross SP, Jeon NL, *Effective neutrophil chemotaxis is strongly influenced by mean IL-8 concentration*, Biochemical and Biophysical Research, 2004, 319: 576-581.
- Lin F, Saadi W, Rhee SW, Wang SJ, Mittal S, Jeon NL, *Generation of dynamic temporal and spatial concentration gradients using microfluidic devices*, Lab Chip, 2004, 4: 164-167.

- Lin F, Nguyen CMC, Wang SJ, Saadi W, Gross SP, Jeon NL, *Neutrophil migration in opposing chemoattractant gradients using microfluidic chemotaxis devices*, *Annals of Biomedical Engineering*, 2005, 33: 475-482.
- Liu D, Wang L, Zhong R, Li B, Ye N, Liu X, Lin B, *Parallel microfluidic networks for studying cellular response to chemical modulation*, *Journal of Biotechnology*, 2007, 131: 286-292.
- Liu L, Cao W, Wu J, Wen W, Chang DC, Sheng P, *Design and integration of an all-in-one biomicrofluidic chip*, *Biomicrofluidics*, 2008, 2: 034103 1-034103 8.
- Mahto SK, Yoon TH, Shin H, Rhee SW, *Multicompartmented microfluidic device for characterization of dose-dependent cadmium cytotoxicity in BALB/3T3 fibroblast cells*, *Biomed Microdevices*, 2009, 11: 401-411.
- Manuale utente di *Ansys Fluent 12.0*, 2009; *Ansys Inc. - Canonsburg, PA, USA*.
- Mao H, Cremer PS, Manson MD, *A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100(9): 5449-5454.
- Meinhart CD, Wereley ST, Santiago JG, *PIV measurements of a microchannel flow*, *Exp. Fluids*, 1999, 27: 414-419.
- Migliavacca F, *Dispense del corso di Biomeccanica*, 2008.
- Morra M, Occhiello E, Marola R, Garbassi F, Humphrey P, Johnson D, *On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces*, *J. Colloid Interface Sci.*, 1990, 137: 11-24.
- Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA, *Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles*, *Nature*, 1994, 367: 284-287.
- Mundy GR, *Pathogenesis of osteoporosis and challenges for drug delivery*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 42: 165-173.

- O'Donnell S, Cranney A, Wells GA, Adachi J, Reginster JY, *Strontium ranelate for preventing and treating postmenopausal osteoporosis (Review)*, The Cochrane Library, 2008, 4: 1-49.
- Paguirigan AL, Beebe DJ, *Microfluidics meet cell biology: bridging the gap by validation and application of microscale techniques for cell biological assays*, BioEssays, 2008, 30: 811-821.
- Paliwal S, Iglesias PA, Campbell K, Hilioti Z, Groisman A, Levchenko A, *MAPK-mediated bimodal gene expression and adaptive gradient sensing in yeast*, Nature, 2007, 446(7131): 46-51.
- Pihl J, Sinclair J, Sahlin S, Karlsson M, Petterson F, Olofsson J, Orwar O, *Microfluidic gradient-generating device for pharmacological profiling*, Anal. Chem., 2005, 77: 3897-3903.
- Raffel M, Willert C, Wereley S, Kompenhans J, *Particle Image Velocimetry: A Practical Guide*, Second Edition, Springer.
- Ramsey RS, Ramsey JM, *Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping*, Anal. Chem., 1997, 69: 1174-1178.
- Redaelli, Montecvecchi, *Biomeccanica. Analisi multiscala di tessuti biologici*, Patron Editore.
- Saadi W, Wang SJ, Lin F, Jeon NL, *A parallel-gradient microfluidic chamber for quantitative analysis of breast cancer cell chemotaxis*, Biomed Microdevices, 2006, 8: 109-118.
- Santiago JG, *Electroosmotic flows in microchannels with finite inertial and pressure forces*, Anal. Chem., 2001, 73: 2353-2365.
- Seeman E, Boonen S, Borgstrom F, Vellas B, Aquino JP, Semler J, Benhamou CL, Kaufman JM, Reginster JY, *Five years treatment with strontium ranelate reduces vertebral and non-vertebral fractures and increases the number and quality of remaining life-years in women over 80 years of age*, Bone, 2010, 46(4): 1038-1042.
- Sordan, *Dispense del corso di Micro-Nano Fabbricazione*, 2009.

Squires TM, Quake SR, *Microfluidics: fluid physics at the nanoliter scale*, Rev. Mod. Phys., 2005, 77: 977-1026.

Sugiura S, Edahiro JI, Kikuchi K, Sumaru K, Kanamori T, *Pressure-driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay*, Biotechnology and Bioengineering, 2008, 100: 1156-1165.

Sutton DJ, Kabala ZJ, *Rhodamine WT as a reactive tracer: laboratory study and field consequences*, Tracers and Modelling in Hydrogeology, 2000, 262: 201-205.

Tanzi MC, *Fondamenti di bioingegneria chimica: non solo biomateriali*, 2006, Pitagora Editrice Bologna.

Thorsen T, Roberts RW, Arnold FH, Quake SR, *Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device*, Phys. Rev. Lett., 2001, 86: 4163-4166.

Tirella A, Marano M, Vozzi F, Ahluwalia A, *A microfluidic gradient maker for toxicity testing of bupivacaine and lidocaine*, Toxicology in vitro, 2008, 22(8): 1957-1964.

Walker GM, Ozers MS, Beebe DJ, *Cell infection within a microfluidic device using virus gradients*, Sens. Actuators B: Chem., 2004, 98(2-3): 347-355.

Walker GM, Monteiro-Riviere N, Rouse J, O'Neill AT, *A linear dilution microfluidic device for cytotoxicity assays*, Lab Chip, 2007, 7: 226-232.

Wang SJ, Saadi W, Lin F, Nguyen CMC, Jeon NL, *Differential effects of EGF gradient profiles on MDA-MB-231 breast cancer cell chemotaxis*, Experimental Cell Research, 2004, 300: 180-189.

Wang Z, Kim MC, Marquez M, Thorsen T, *High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis*, Lab Chip, 2007, 7: 740-745.

Weibel DB, Whitesides GM, *Applications of microfluidics in chemical biology*, Current Opinion in Chemical Biology, 2006, 10: 584-591.

Wheeler AR, Thronset WR, Whelan RJ, Leach AM, Zare RN, Liao YH, Farrell K, Manger ID, Daridon A, *Microfluidic device for single-cell analysis*, Anal. Chem., 2003, 75: 3581-3586.

Whitesides GM, Stroock AD, *Flexible methods for microfluidics*, Phys. Today, 2001, 54: 42-48.

Whitesides GM, Sia SK, *Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies*, Electrophoresis, 2003, 24: 3563-3576.

Whitesides GM, *The origins and the future of microfluidics*, Nature, 2006, 442: 368-373.

Wong AP, Perez-Castillejos R, Love JC, Whitesides GM, *Partitioning microfluidic channels with hydrogel to construct tunable 3-D cellular microenvironments*, Biomaterials, 2008, 29: 1853-1861.

Wu Z, Nguyen NT, *Convective-diffusive transport in parallel lamination micromixers*, Microfluid Nanofluid, 2005, 1: 208-217.

Xia Y, Whitesides GM, *Soft Lithography*, Annu. Rev. Mater. Sci., 1998, 28:153-184.

Yager P, Edwards T, Fu E, Helton K, Nelson K, Tam MR, Weigl BH, *Microfluidic diagnostic technologies for global public health*, Nature, 2006, 442: 412-418.

Yamada M, Hirano T, Yasuda M, Seki M, *A microfluidic flow distributor generating stepwise concentrations for high-throughput biochemical processing*, Lab Chip, 2006, 6: 179-184.

Ye N, Qin J, Shi W, Liu X, Lin B, *Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device*, Lab Chip, 2007, 7: 1696-1704.

You L, Temiyasathit S, Tao E, Prinz F, Jacobs CR, *3D microfluidic approach to mechanical stimulation of osteocyte processes*, Cellular and Molecular Bioengineering, 2008, 1(1): 103-107.

Yusuf HA, Baldock SJ, Barber RW, Fielden PR, Goddard NJ, Treves Brown BJ, *Novel microsystems for concentration gradient generation through computer optimization with validation using optical instrumentation*, Microelectronic Engineering, 2008, 85: 1265-1268.

Yusuf HA, Baldock SJ, Barber RW, Fielden PR, Goddard NJ, Mohr S, Treves Brown BJ, *Optimization and analysis of microreactor designs for microfluidic gradient generation using a purpose built optical detection system for entire chip imaging*, Lab Chip, 2009, 9: 1882-1889.

Zaari N, Rajagopalan P, Kim SK, Engler AJ, Wong JY, *Photopolymerization in microfluidic gradient generators: microscale control of substrate compliance to manipulate cell response*, Adv. Mater., 2004, 16(23-24): 2133.

Zhou Y, Wang Y, Mukherjee T, Lin Q, *Generation of complex concentration profiles by partial diffusive mixing in multi-stream laminar flow*, Lab Chip, 2009, 9: 1439-1448.