

Dr. Ing. Juan Martín Cabaleiro

Investigador a cargo de la línea de investigación Micro y Nanofluídica, Secretaría de Investigación, Facultad de Ingeniería de la UdeMM, jmcabaleiro@udemmm.edu.ar

Microfluídica y biotecnología. Descripción de los objetivos y de las capacidades del laboratorio de Micro y Nanofluídica y Plasma de la Facultad de Ingeniería de la UdeMM

La Microfluídica —o la manipulación y análisis de pequeñas cantidades de fluidos— se ha transformado en una tecnología poderosa con muchas aplicaciones relevantes en ciencias biológicas. Más de tres décadas de investigación han permitido un sin número de técnicas que mejoran ensayos biológicos, tanto mediante la miniaturización de métodos existentes, como mediante el desarrollo de nuevos métodos analíticos. La microfluídica es utilizada hoy en día en química, biología, genómica, proteómica, farmacéutica, y biodefensa.

Desde principios de los años 80, se han hecho avances espectaculares como el análisis de la secuencia del genoma del ADN humano, mientras que aparecieron cambios dramáticos en el campo de la proteómica, y se esperan más aún en el del análisis celular. El campo de investigaciones de la biotecnología aumenta constantemente, desde los primeros biochips desarrollados para analizar secuencias de ADN e investigar sus mutaciones, hasta el análisis de proteínas y estudiar su rol en la vida humana, y hacia la comprensión de los comple-

jos mecanismos que tienen lugar dentro de las células.

El área central de la biotecnología es el control, desplazamiento y guiado de distintos micro-objetos presentes en los buffers biológicos.

Hay dos tipos de micro-objetos. Por un lado los de tipo biológico, es decir ADN, proteínas, anticuerpos, células, bacterias, etc., que constituyen la mayoría de las veces el objeto de estudio. Sus tamaños van de 20 nm (cadenas cortas de ADN) hasta 100 um (las células más grandes). Por otro lado están los que se pueden considerar “artificiales”, es decir micro y nanopartículas que son usadas como herramientas para llevar a cabo una cierta tarea. Podemos encontrar en esta área partículas magnéticas, fluorescentes, quantum dots, surfactantes, micro-partículas de oro, entre otras. Estos objetos tienen dimensiones que van de los 10 nm hasta 2 um. Algunos objetos biológicos también pueden ser utilizados como herramientas, especialmente para procesos de bio-reconocimiento: una cadena de ADN puede utilizarse para inmovilizar una cadena complementaria de ADN. Los

biotecnólogos estudian el comportamiento mecánico de estos objetos, mientras que los biólogos estudian el su comportamiento funcional.

La biotecnología es una ciencia no solo dedicada a asistir a los biólogos, sino que tiene muchas aplicaciones prácticas, especialmente en bioanálisis y biodetección. Por ejemplo, el progreso en la rapidez de detección de virus ha sido espectacular, y se espera que dentro de no mucho tiempo el análisis directo de virus pueda llevarse a cabo en pocos minutos en el consultorio de un doctor.

Se espera que los biochips, o bio-mems permitan mejores sensibilidades que los sistemas macroscópicos habituales. Se ha demostrado también que las reacciones químicas son más completas en microsistemas.

Ventajas de la miniaturización

Desde el punto de vista biológico, la microfluidica es especialmente relevante considerando que la mayoría de los procesos biológicos incluyen transporte de fluidos a pequeña escala en algún punto. Ejemplos de esto van

desde la transferencia molecular a través de membranas celulares, hasta la difusión de oxígeno en los pulmones, o el flujo de sangre en redes de arterias microscópicas.

La biotecnología no solo se dedica al análisis *in vitro*, se está transformando para el tratamiento médico *in vivo*. El impacto en este campo de estas nuevas tecnologías tiene muchas ramificaciones: el monitoreo de órganos vitales en pacientes en riesgo será posible, las técnicas de miniaturización disminuirán las intervenciones dentro del cuerpo humano, micro y nano-partículas funcionales podrán ayudar al guiado de drogas hacia sus objetivos dentro del cuerpo.

Las intervenciones *in vivo* se facilitan por la reducción del tamaño de los dispositivos, reduciendo a su vez la invasión de los sistemas de dosificación de drogas.

Uno de las ventajas más obvias del uso de canales más pequeños es el menor consumo de reactivos, lo que conduce a disminuir los desperdicios y a un análisis más eficiente. Esto es de particular importancia cuando los reactivos son caros (i.e. anticuerpos), y cuando los volúmenes de las muestras son limitados. En los estudios de separación de muestras, la microfluídica permite mejorar la eficiencia dado que esta es proporcional a la relación de aspecto (longitud/diámetro) de los canales, que es muy grande.

Por otro lado, se ha descubierto que el riesgo al trabajar con bacterias tóxicas, o inclusive sustancias explosivas, se reduce drásticamente mediante la miniaturización de la escala de la reacción.

Además, en estos canales de pequeño diámetro el flujo que se establece es laminar. La difusión juega un rol muy importante en dichas escalas. Por otro lado estos canales angostos disipan calor más eficientemente por lo que

se pueden utilizar mayores campos eléctricos disminuyendo el efecto adverso del calentamiento por efecto Joule. Por ello, los ensayos requieren menos tiempo.

Además, en los dispositivos microfluídicos en general se puede lograr el transporte con muy pocas o ninguna parte móvil (transporte electrocinético), lo que puede reducir significativamente la complejidad de un ensayo y el consumo comparándolo con su contraparte macroscópica.

Finalmente, es posible integrar todos los pasos del análisis en un solo chip (cargado de la muestra, lavado, reacciones, separación, detección, etc.). Esta integración reduce el contacto humano, contaminación ambiental, tiempo de análisis. En estos dispositivos (LOC: *lab on a chip*), esta integración reduce enormemente el costo por análisis, permitiendo además la paralelización de los estudios. También pueden integrarse a dispositivos de mano, permitiendo los análisis en zonas de difícil acceso.

Otra ventaja de los microsistemas biotecnológicos reside en la automatización y “streamlining” de los procesos biológicos, como fue demostrado en el biochip de ADN: el uso de microchips con miles de micro-reservorios (Wells) —cada una para el análisis de una secuencia específica de ADN— reduce considerablemente el tiempo necesario para el proceso de reconocimiento. Un chip como tal realiza muchas operaciones en serie. De otro modo se necesitarían diferentes manipulaciones y mucho tiempo para obtener el mismo resultado.

Objetivos principales del laboratorio

Como su nombre lo indica, el laboratorio de Micro y Nanofluídica y

Plasmas de la UdeMM se encuadra dentro de la microfluídica, y no dentro de la biotecnología. Sin embargo, esto no quita que dentro del laboratorio se colabore con biotecnólogos para el desarrollo de dispositivos específicos. Dentro de la microfluídica, aparecen dos líneas de investigación.

Por un lado el control del movimiento de fluidos —y/o de partículas en suspensión— mediante campos eléctricos (fenómenos electrocinéticos).

Por otro lado el estudio de fenómenos de interfase: la Doble Capa Eléctrica (DCE), estudio del deslizamiento en la pared (determinación de la velocidad de deslizamiento) en función de la hidrofobicidad (o hidrofiliidad) de la superficie, etc.

Principales trabajos realizados

Desde su fundación, en el año 2009, se vino trabajando fundamentalmente en la resolución de problemas mediante simulación numérica, mientras se fue equipando el laboratorio. La mayor parte del equipamiento se adquirió en 2011. En la actualidad contamos con computadoras de alta performance, osciloscopios digitales, generadores de funciones programables, fuentes de alta y media tensión. Contamos también con un microscopio invertido para fluorescencia, con su correspondiente sistema de adquisición de imágenes que permite la toma pares de imágenes con un intervalo de tiempo variable, cuya finalidad es la determinación del campo de velocidades del fluido mediante una técnica conocida como PIV, o en este caso, micro-PIV. También contamos con equipamiento que permite la elaboración de los chips microfluídicos, fabricados en PDMS (polidimetilsiloxane).

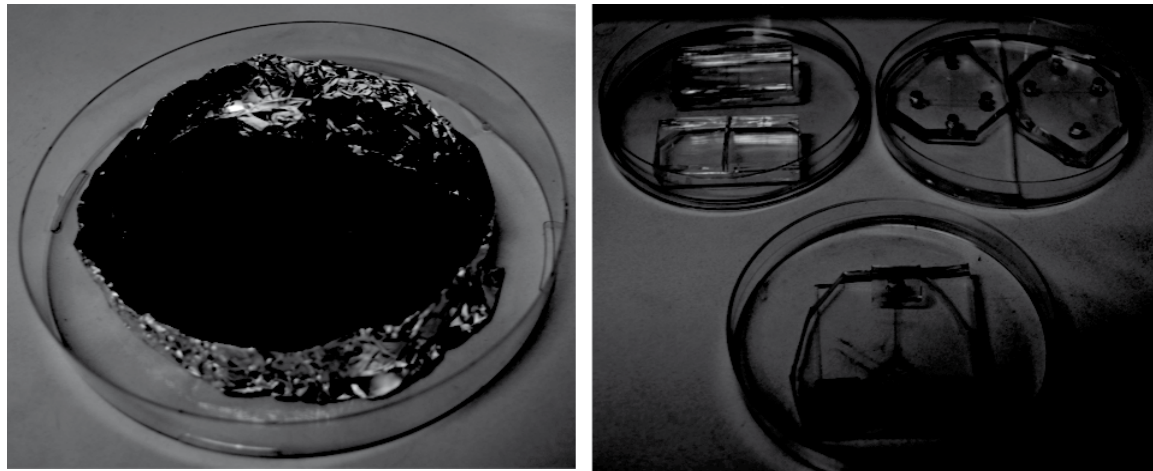


Figura 1. Izq.: oblea con fotolitografía realizada. Der.: microcanales en PDMS.

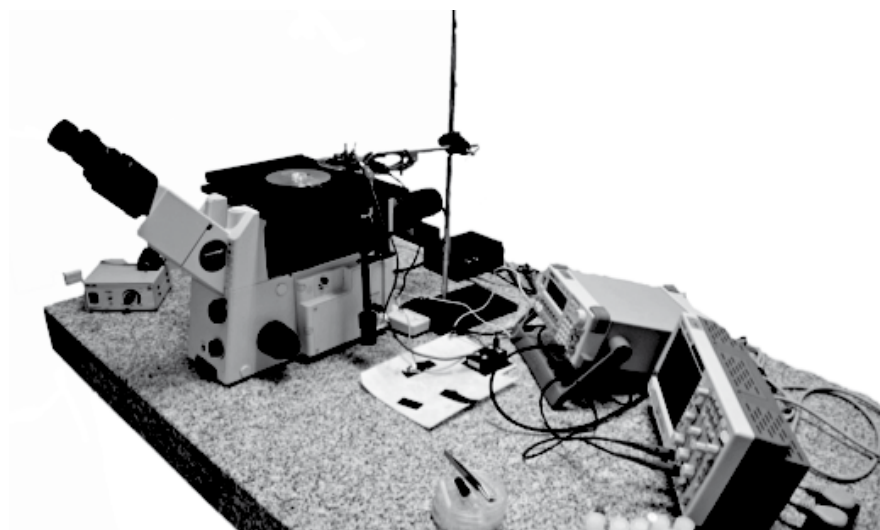
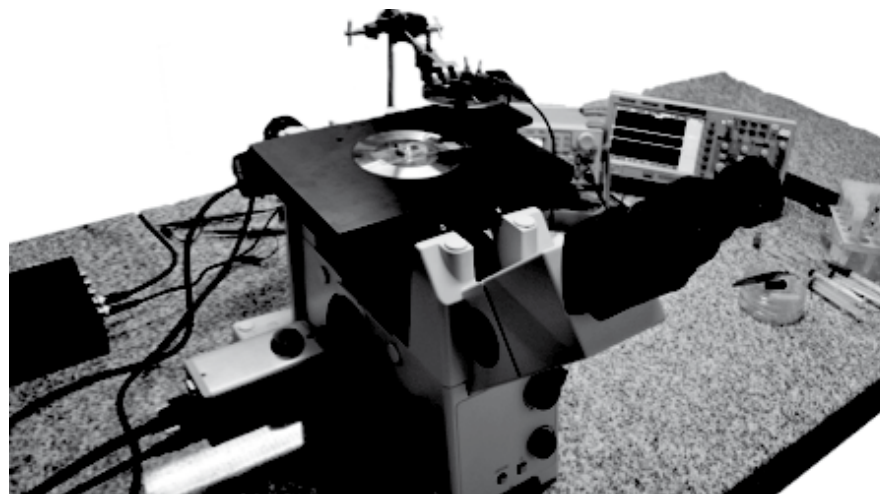


Figura 2. Dos vistas del Setup experimental.

Para la fabricación de los chips, es necesario contar con moldes sobre los que se realiza el colado del PDMS. Desde fines del año 2011 se está colaborando con el “Área de Microsistemas”, del Centro en Electrónica e Informática. Este Centro dispone de una Sala Limpia que permite la construcción de los moldes de los microcanales por fotolitografía.

Este conjunto de acciones hacen que, hoy en día, contemos con toda la cadena, desde el diseño y simulación de microcanales, hasta la fabricación, y posterior ensayo en la UdeMM.

Las imágenes de la figura 1 muestran la oblea con la fotolitografía realizada (es decir el molde de los microcanales) y el microcanal fabricado en PDMS.

A continuación se muestra un microcanal en el microscopio invertido de fluorescencia, y se puede observar también el resto del setup experimental.

En la figura 3 se muestra una imagen que corresponde a al seguimiento de agua con fluoresceína mezclándose con agua en el canal de rama en Y. Se le ha superpuesto una línea blanca en el centro para indicar que a lo largo de esa línea se mide el valor de la intensidad a lo largo del tiempo.

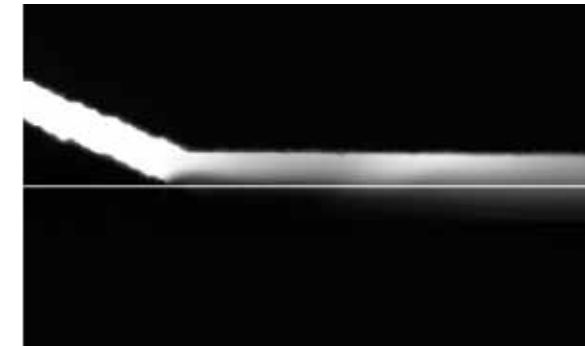


Figura 3. Seguimiento de agua con fluoresceína en un canal Y. Tensión pulsada en una de las ramas y continua en la otra.

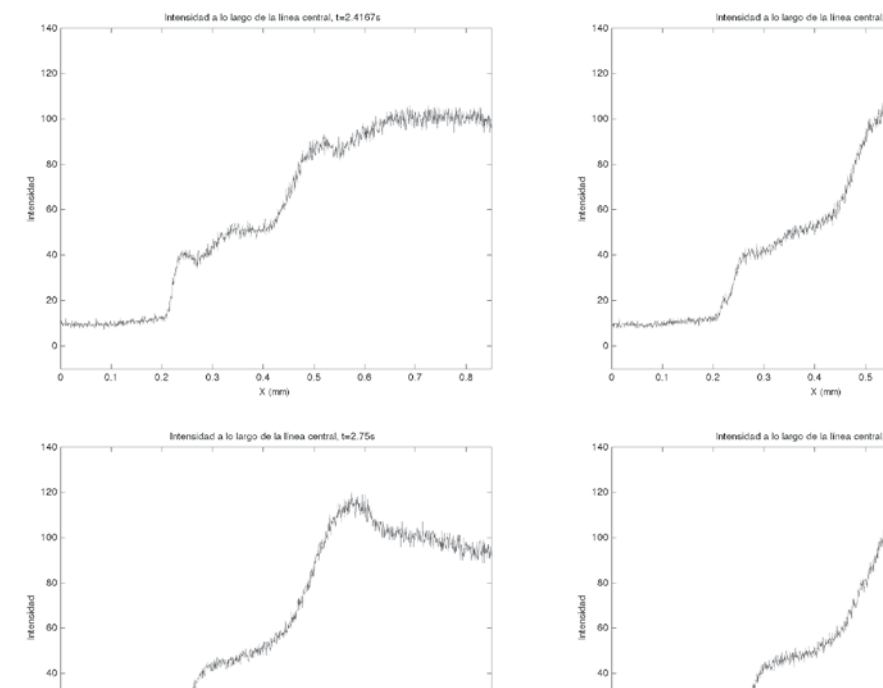


Figura 4. Intensidad en el centro del canal Y. 4 instantes de tiempo.

El resultado de estas mediciones es presentado para 4 instantes de tiempo en la figura 4. Siguiendo por ejemplo la posición del máximo de la curva se puede determinar la velocidad media en el canal.

Esta técnica es importante ya que cuando se utilizan micropartículas, como se muestra a continuación, estas podrían no seguir al fluido cuando se realiza control mediante campos eléctricos: si las partículas están

cargadas (suelen estarlo para evitar su aglomeración), están sujetas a la acción del campo eléctrico y su movimiento viene dado por el arrastre que el fluido produce sobre ellas y también por las fuerzas eléctricas. La comparación con la técnica escalar permite determinar que grado de seguimiento del flujo presentan las partículas.

A continuación se presentan, a modo de ejemplo, dos imágenes tomadas mediante el microscopio de fluorescencia en las que se pueden observar micropartículas (500 nanómetros de diámetro, fluorescentes) en una solución acuosa. La primera (figura 5) se trata de una canal. En el caso del canal Y, la rama inferior estaba sujeta a un gradiente de presión constante, y la superior sujeta a una diferencia de potencial pulsada. Se muestran dos campos de velocidades: con y sin el campo eléctrico aplicado a la rama superior.

Por último, la figura 6 corresponde a un reservorio que desemboca en un microcanal. En este caso, el flujo es debido simplemente a un gradiente de presión.

Bibliografía recomendada

“Microflows and Nanoflows, Fundamentals and Simulation”, George Karniadakis, Ali Beskok y Narayan Aluru, Springer, 2005.

“Microfluidics for biotechnology”, Jean Berthier y Pascal Silberzan, Artech House microelectromechanical systems series, 2006.

“Microfluidics for biological applications”, Wei-Cheng Tian y Erin Finehout, Springer, 2008.



Alejandro Gronskis

Departamento de Ingeniería Mecánica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Buenos Aires
Unidad de Investigación de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Marina Mercante

Generación de condiciones frontera en simulaciones numéricas de flujos turbulentos con desenvolvimiento espacial

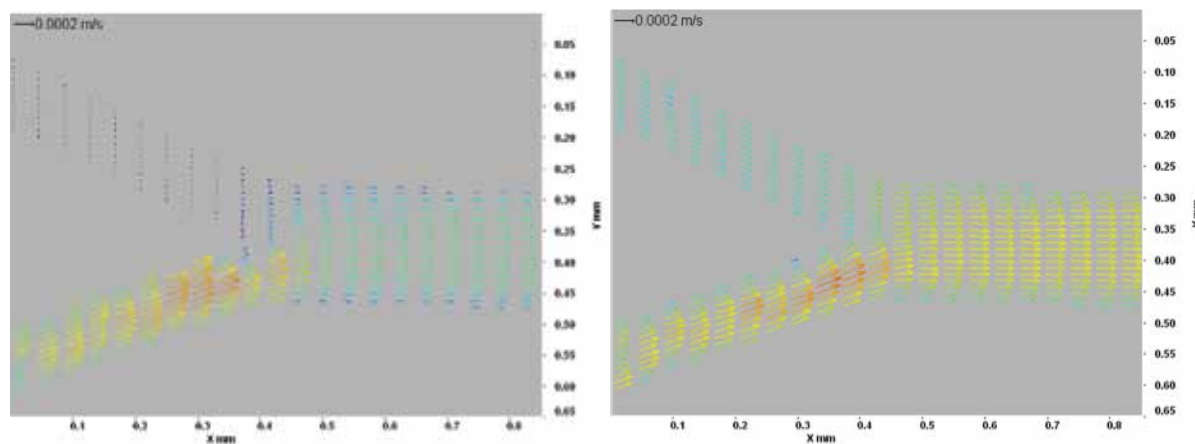
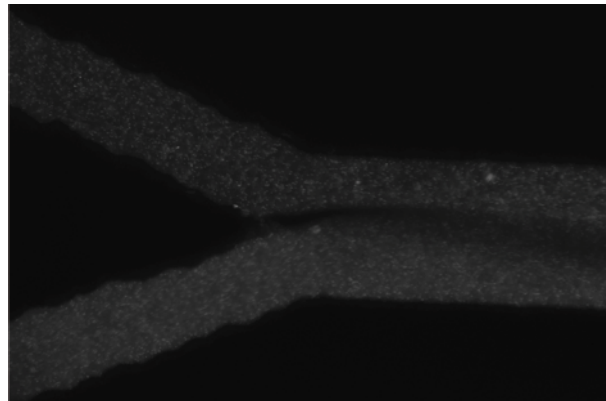


Figura 5. Seguimiento de micropartículas en un canal Y. Arriba, imagen del flujo. Abajo, izq.: sin campo eléctrico en la rama superior. Der.: con campo eléctrico.

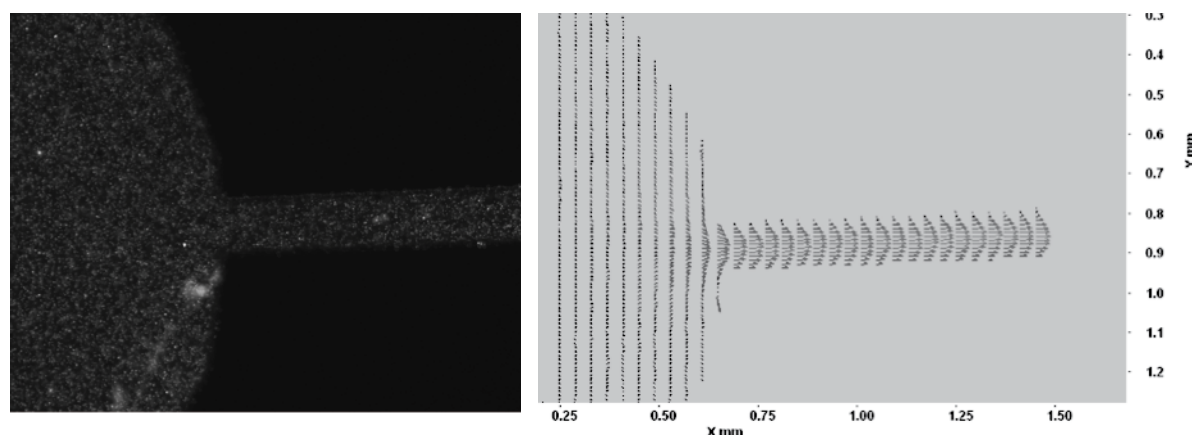


Figura 6. Flujo en la unión de un reservorio y un microcanal debido a un gradiente de presión.

Marco de referencia

En problemas de simulación numérica de flujos externos, a menudo se introducen condiciones frontera artificiales debido a la falta de datos disponibles en las fronteras libres. Se espera que la imposición de tales fronteras artificiales afecte la solución del problema en estudio de forma tal que las mismas se aproximen a situaciones de espacio libre las cuales existirían en ausencia de estas fronteras, pero a menudo esta imposición introduce reflexiones espurias que contaminan la solución del campo global. La solución más sencilla es utilizar un dominio de cálculo mucho mayor al área de estudio para que las reflexiones de los bordes no alcancen la zona de interés en el tiempo de simulación, desperdiciando de este modo recursos computacionales. Por consiguiente, resulta de fundamental importancia en la simulación numérica de flujos utilizar una condición de frontera efectiva y estable de bajo costo computacional.

A pesar del gran número de desarrollos significativos en métodos computacionales efectuados durante las

últimas décadas, un gran número de flujos industriales permanece aun con un alto grado de dificultad para adaptarse a una simulación numérica precisa debido a complejas y a menudo desconocidas condiciones frontera. Tales condiciones de borde requieren de una formalización apropiada en el campo computacional a fin de reproducir con fidelidad las principales características del flujo. Su adecuada determinación resulta de fundamental importancia cuando se procuran efectuar cálculos computacionales de flujos turbulentos no estacionarios. En el caso de la simulación de un flujo con desenvolvimiento espacial, la especificación del campo de velocidades en la región de entrada del dominio computacional condiciona en gran medida el desenvolvimiento del flujo aguas abajo.

A fin de limitar el costo computacional asociado a las simulaciones numéricas directas (DNS) o simulaciones de gran escala (LES) de flujos con desenvolvimiento espacial, en los últimos años se han desarrollado algunas estrategias que tienen como objetivo simular únicamente la región de interés del flujo en cuestión. Surge como

consecuencia directa la necesidad de especificar correctamente en el dominio computacional todas las condiciones frontera, las cuales en la mayoría de los casos son no estacionarias. Este proceso requiere la generación apropiada de campos vectoriales que evolucionen temporalmente en concordancia con la dinámica del flujo.

Objetivos

Hasta el presente, las estrategias propuestas en la bibliografía proceden en dos etapas consecutivas. En la primera etapa, la condición de entrada se construye a partir de datos numéricos o experimentales. A continuación, se conduce la simulación del flujo aguas abajo haciendo uso de esta información. Como consecuencia, esta segunda etapa resulta fuertemente dependiente de la primera. De esta forma, condiciones de entrada que presenten un alto nivel de ruido o se encuentren insuficientemente resueltas en tiempo o espacio pueden conducir a una incongruencia numérica o a la obtención de campos de velocidades apartados de la realidad. A fin de aliviar