

Nitrite Colorimetric Detection in Saliva using Optimal Mixing

E. Mollaei¹, S. Asiaei², M. Moghimi^{2*}, A. Zadehkafi³

¹M.Sc Student, Mechanical Engineering Department, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Mechanical Engineering Department, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran

³PhD Student, Mechanical Engineering Department, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran

Receipt in the Online Submission System: 20 July 2018, Received in Revised Form: 28 September 2018, Accepted: 2 November 2018

Abstract

Microfluidic analytical/diagnostic tools, especially microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) have attracted considerable attention due to their numerous advantages including their low operational costs, small analyte consumption, and limited required skills for use, and easy disposal/recycling. μ PADs have been successful in detection of various diseases with no external deriving units. The aim of this study is to develop a micromixer for colorimetric detection of nitrite in saliva using Griess reaction and widening the limit of detection (LOD) by mixing improvement. Micromixers were fabricated using laser cut after a simple design. Five different geometries were examined and compared including straight, curved, zigzag, square wave and hexagonal, by numerical simulation and experimental tests for mixing part in micromixer. Simulations were performed in ANSYS CFX with homogeneous two-phase flow model in a porous media. As the result inclined hexagonal micromixer showed the best performance (in comparison with the straight one) exhibiting 44.24% of improvement which leads to a detection range and LOD of 0 – 1000 μmolL^{-1} and 5.7 μmolL^{-1} , respectively. Considering the significant impact of micromixers in microfluidics, the quality of mixing and therefore the accuracy of the devices was improved by simple geometrical modifications.

Keywords: *Nitrite, Saliva, Griess Method, Microfluidics Analytical Devices, Paper-based Micromixers*

*Corresponding Author

Address: Mechanical Engineering Department, Iran University of Science and Technology, P. O. Box: 1684613114, Tehran, Iran

Tel: +98-21-77240182

Fax: +98-21-77240182

E-mail: moghimi@iust.ac.ir

شناسایی کالری متری نیتريت در بزاق با بهره‌گیری از اختلاط بهینه

الهام ملایی^۱، ساسان آسیایی^۲، مهدی مقیمی^{۲*}، علی زاده‌کافی^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده‌ی مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران

^۲ استادیار، دانشکده‌ی مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران

^۳ دانشجوی دکتری، دانشکده‌ی مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران

تاریخ ثبت در سامانه: ۱۳۹۷/۴/۲۹، بازنگری: ۱۳۹۷/۷/۶، پذیرش قطعی: ۱۳۹۷/۸/۱۱

چکیده

تولید و استفاده از وسایل تشخیصی-تحلیلی میکروسیالی، به ویژه وسایل تحلیلی میکروسیالی کاغذی (میکروپدها)، به دلیل مزایای فراوان آن‌ها، از جمله هزینه‌ی عملیاتی پایین، مصرف کم نمونه و عدم نیاز به مهارتی خاص برای استفاده و بازیافت یا دفع آسان، مورد استقبال زیادی قرار گرفته است. میکروپدها بدون نیاز به نیروی محرک خارجی، توانسته‌اند در تشخیص بسیاری از بیماری‌ها موفق ظاهر شوند. هدف این مقاله، توسعه‌ی یک میکرومیکسر برای تشخیص بر مبنای رنگ‌سنجی نیتريت موجود در بزاق به کمک واکنش گریس و افزایش بازه‌ی حد تشخیص دستگاه به کمک بهبود اختلاط می‌باشد. میکرومیکسرها پس از یک طراحی ساده، با برش لیزر ساخته شدند. در این کار، پنج هندسه‌ی متفاوت، شامل ساده، مارپیچ، زیگ‌زاگ، شکسته‌ی قائم و شکسته‌ی مایل، برای بخش اختلاط میکرومیکسر، به دو صورت تجربی و شبیه‌سازی، آزمایش و مقایسه شده‌اند. شبیه‌سازی با مدل جریان دوفازی همگن در محیط متخلخل، در نرم‌افزار انسیس سی‌افاکس صورت گرفته است. نتایج نشان دادند که میکرومیکسر شکسته‌ی مایل نسبت به میکرومیکسر ساده، با بهبود $44/24$ درصدی، بهترین عمل‌کرد را در آزمایش داشته، که حاصل آن محدوده‌ی خطی تشخیص صفر تا $1000 \mu\text{molL}^{-1}$ و حد تشخیص $5/7 \mu\text{molL}^{-1}$ شده است. بدین ترتیب، با توجه به تاثیر فراوان میکرومیکسرها در میکروسیالات، به کمک اصلاحات هندسی ساده، کیفیت اختلاط و در نتیجه دقت وسیله‌ی اندازه‌گیری افزایش داده شد.

کلیدواژه‌ها: نیتريت، بزاق، واکنش گریس، وسایل تحلیلی میکروسیالی، میکرومیکسر کاغذی

*نویسنده مسئول

نشانی: دانشکده‌ی مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران، کد پستی: ۱۶۸۴۶۱۳۱۱۴

تلفن: ۷۷۲۴۰۱۸۲ (۲۱) ۹۸+

دورنگار: ۷۷۲۴۰۱۸۲ (۲۱) ۹۸+

پست الکترونیکی: moghimi@iust.ac.ir

۱- مقدمه

اکثر این روش‌ها به هزینه‌ی بالا و کاربرد آموزش‌دیده نیاز دارند [۷]، در صورتی که روش کالری‌متری، مخصوصاً روش واکنش گریس، به دلیل سادگی و محدوده‌ی تشخیص دل‌خواه و نسبتاً وسیع خطی غلظت [۱۹]، بسیار مورد استقبال قرار گرفته است. هدف این مقاله، مطالعه و بهبود فرایند تشخیص نیتريت موجود در بزاق، به روش واکنش گریس اصلاح شده^۷ در میکرومیکسرهای کاغذی است. در این راستا، با استفاده از دو روش آزمایشگاهی و شبیه‌سازی، یک هندسه‌ی مناسب برای افزایش بازده میکسرهای کاغذی در این واکنش و همچنین واکنش‌های فراوان دیگر، پیشنهاد شده است. میکرومیکسرهای طراحی شده در این مقاله، با روش ساخت آسان و کم‌هزینه‌ی برش لیزر ساخته شده‌اند، به طوری که در ابعاد بسیار کوچک، می‌توانند با بهبود میزان اختلاط معرف‌ها و نمونه، حساسیت تشخیص را هم‌زمان با بازه‌ی خطی تشخیص، افزایش دهند.

۲- روش انجام کار

همان‌گونه که در بخش مقدمه اشاره شد، مطالعات زیادی در زمینه‌ی تشخیص نیتريت توسط روش واکنش گریس در میکروپدهای کاغذی انجام شده است، که از آن جمله می‌توان به بررسی تاثیرات دمایی، تغییر شرایط محیطی و بررسی پایداری اشاره کرد. از آن‌جا که میکسرهای کاغذی از نوع میکسرهای غیرفعال هستند، بازده اختلاط در آن‌ها به شدت به طراحی ساختار کانال، وابسته است [۲۰]. با وجود مطالعات متعددی که انجام شده، بررسی اثرات تغییر شکل هندسی میکرومیکسر بر میزان اختلاط، به منظور تشخیص نیتريت، تا کنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. به این منظور، ۵ میکرومیکسر با هندسه‌های متفاوت و با یک غلظت مشخص نیتريت (10 mmolL^{-1})، در نظر گرفته شده (شکل ۱) و میکرومیکسری که بهترین عمل‌کرد را در میان سایر میکرومیکسرها داشته، انتخاب شده است. سپس در این میکرومیکسر، غلظت‌های مختلف نیتريت مورد آزمایش قرار گرفته است تا دقت میکرومیکسر و محدوده‌ی تشخیص آن مشخص شود.

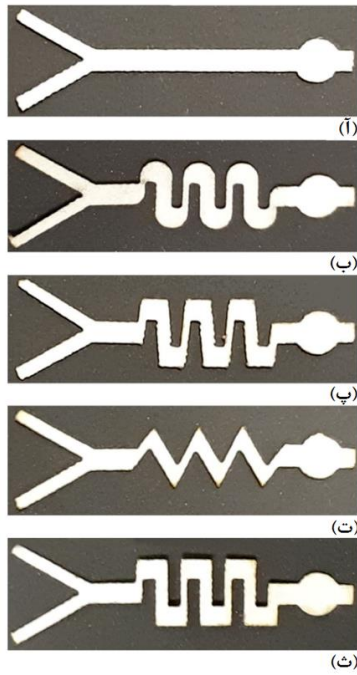
مساله‌ی تعریف شده، ابتدا به صورت آزمایشگاهی به روش واکنش گریس اصلاح‌شده، که یکی از روش‌های طیف‌سنجی جرمی است، صورت گرفته و سپس با اندازه‌گیری دقیق

در دهه‌های اخیر، میکروسیالات کاغذی به دلیل ویژگی‌هایی از جمله هزینه‌ی کم، عدم نیاز به نیروی خارجی [۱]، قابلیت انجام آزمایش‌های مختلف به صورت هم‌زمان و با حجم کم نمونه [۲]، ساده بودن نحوه‌ی استفاده و قابلیت اعتماد با بازده و سرعت بالا [۳]، بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته [۴] و به دلیل نیاز به تجهیزات ساخت ساده‌تر و ارزان‌تر [۵، ۶] و حذف آسان پسماندها [۴]، نسبت به نوع غیر کاغذی آن کاربردهای فراوانی در کنترل محیط، کیفیت غذا و مخصوصاً تشخیص ترکیبات مختلف در راستای سلامتی [۷، ۸] پیدا کرده است.

اختلاط، یکی از کارایی‌های مهم وسایل میکروسیالی است که در بسیاری از عمل‌کردهای شیمیایی مورد نیاز می‌باشد [۱]. افزایش چشم‌گیر مینیاتوری کردن وسایل میکروسیالی، اهمیت اختلاط را پررنگ‌تر می‌کند [۹]. در وسایل کاغذی، با توجه به بافت متخلخل کاغذ، می‌توان عملیات اختلاط در سیال را، که به صورت غیرفعال تحت نیروی موینگی کانال‌ها صورت می‌گیرد [۱۰]، کنترل نمود. بهبود فرایند اختلاط، منجر به افزایش کارایی در کاربردهای مختلف، مانند شناساگرها و زیست‌حس‌گرهای بیولوژیکی/پزشکی می‌شود. برای مثال، تست‌های جواب‌دهی سریع و ایمونواسی‌ها^۱ که در حس‌گر نشان‌گرهای حیاتی مانند قند، چربی و یا نیتريت کاربرد دارند. به طور کلی، نیتريت در علوم کلینیکی، غذایی و محیطی ترکیب بسیار مهمی بوده [۱۱] و وجود بیش از حد مجاز آن در سیالات بیولوژیکی بدن، می‌تواند نشانه‌ای از یک بیماری باشد. بزاق، یکی از این سیالات بیولوژیکی است که حضور نیتريت در آن می‌تواند بیان‌گر نوعی از عفونت لثه [۱۲] و یا نشانه‌ای از نیاز به شروع درمان دیالیز باشد [۱۱]. سندرم بچه‌ی آبی^۲، که در آن هموگلوبین^۳ به مت‌هموگلوبین^۴ تبدیل می‌شود، ناشی از وجود غیرطبیعی نیتريت و نیتريت می‌باشد. همچنین، وجود غیرطبیعی نیتريت، در مواردی می‌تواند منجر به سرطان معده شود [۱۳، ۷]. بررسی میزان نیتريت در بزاق، می‌تواند نشان دهنده‌ی روند همودیالیز در بیماران کلیوی باشد [۱۴]. بنابراین، تشخیص نیتريت از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است.

نیتريت توسط روش‌های مختلفی از جمله رنگ‌سنجی (کالری‌متری^۵) [۱۵]، رنگ‌نگاری (کروماتوگرافی^۶) [۱۶، ۱۷]، الکتروشیمیایی [۱۸] و روش‌های دیگر قابل اندازه‌گیری است.

^۵ Colorimetric Method^۶ Chromatography^۷ Modified Griess Reaction method^۱ Immunoassay^۲ Blue Baby Syndrome^۳ Hemoglobin^۴ Methemoglobinemia

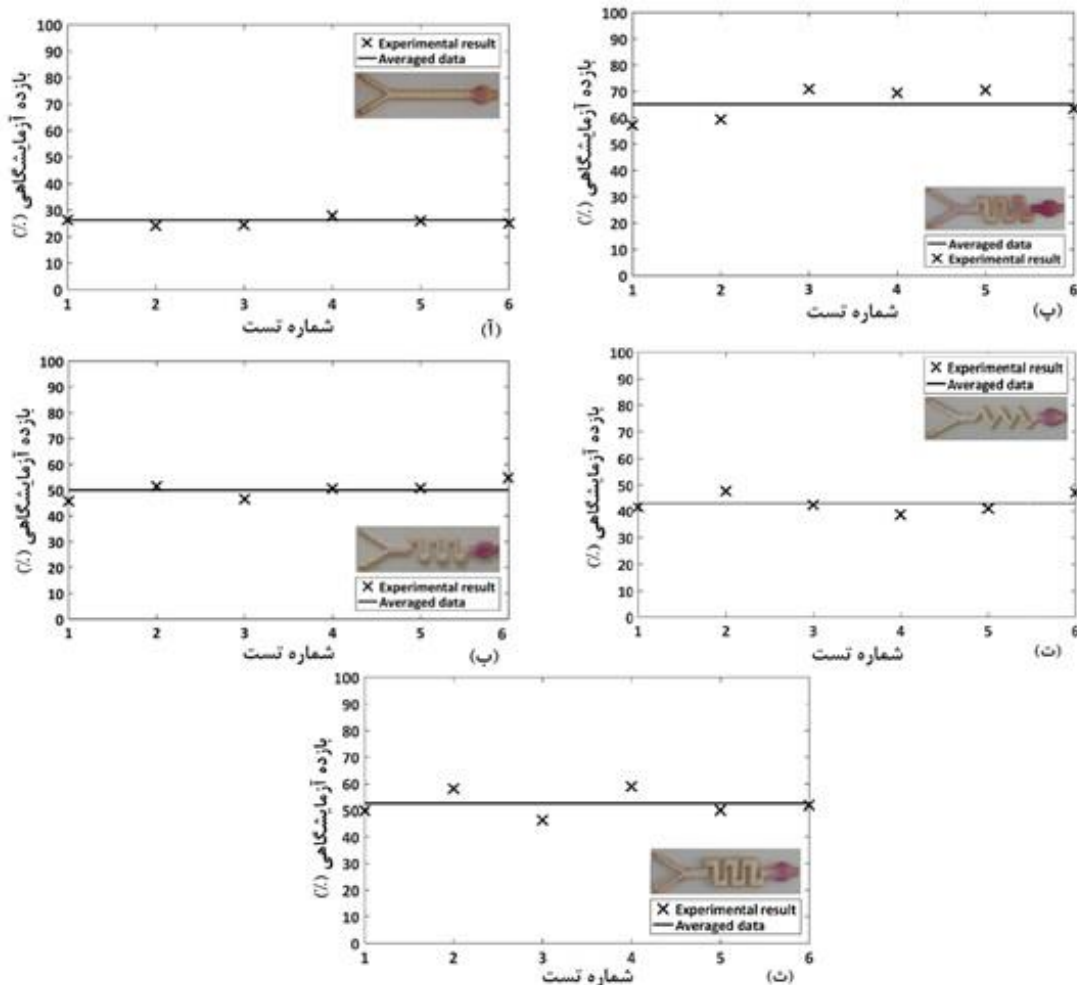


شکل (۱) - میکرومیکسرهای ساخته شده با برش لیزر، (آ) مستقیم، (ب) مارپیچ، (پ) شکسته‌ی مایل، (ت) زیگ‌زاگ، (ث) شکسته‌ی قائم

مشخصات سیالات استفاده شده، به صورت عددی شبیه‌سازی شده است. در مرحله‌ی بعد، با تعریف معیاری برای اختلاط، این دو روش با یکدیگر مقایسه شده و در نهایت اعتبارسنجی شده‌اند.

۲-۱- مطالعه‌ی آزمایشگاهی

بررسی آزمایشگاهی مساله، شامل سه مرحله‌ی ساخت و آماده‌سازی میکرومیکسرها، انجام آزمایش گریس و تحلیل تصاویر به دست آمده، می‌باشد. هر میکرومیکسر، ابتدا به روش برش لیزر آماده شده، سپس مورد تست گریس قرار گرفته و در نهایت، تصاویر مربوط به منطقه‌ی تشخیص آن، در نرم‌افزار متلب تحلیل شده است. به منظور بررسی صحت نتایج به دست آمده، ۶ آزمایش برای هر هندسه انجام شده و میانگین آن‌ها در تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. تکرارپذیری آزمایش، به عنوان نمونه برای سه میکرومیکسر، در شکل (۲) نمایش داده شده است. انحراف معیار برای این هندسه‌ها، در بازه‌ی ۰/۲۴۲ تا ۰/۹۱۲ است.



شکل (۲) - تکرارپذیری بازده عملی در میکرومیکسر (آ) مستقیم (ب) مارپیچ (پ) شکسته‌ی مایل (ت) زیگ‌زاگ (ث) شکسته‌ی قائم

۱-۱-۲- واکنش گریس

روش شناسایی نیتريت، بر مبنای واکنش گریس، که یک واکنش دیازونیزه^۱ می باشد، انجام گرفته است [۲۱]. به این صورت که نیتريت در یک محیط اسیدی توسط یک معرف مبدل (سولفانیل آمید^۲) تحت عمل قرار گرفته، تا یک نمک دیازونیم^۳ تولید شود. در مرحله ی بعد، نمک دیازونیم با یک معرف متصل کننده، مانند ان-نفتیل-اتیلن دی آمین^۴، به یک ترکیب پایدار AZO^۵ تبدیل می شود (شکل ۳)، که این ترکیب صورتی رنگ است [۲۲].

ابتدا معرف های گریس با نسبت وزنی یک به یک با هم ترکیب می شوند. به طوری که سولفانیل آمید ۱٪ محلول در هیدروکلریک اسید ۱۰٪، با ان-نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۱/۱٪ محلول در آب، با نسبت وزنی مساوی با هم ترکیب می شوند [۱۹]. در مرحله ی بعد، بزاق مصنوعی طبق دستورالعمل ایلدیرماز^۶ و هم کارانش [۲۳] (۰/۴ mg/ml سدیم کلرید، ۰/۴ mg/ml پتاسیم کلرید، ۰/۸ mg/ml کلسیم کلرید، ۰/۶۹ mg/ml سدیم دی هیدروژن فسفات و ۰/۱۶۳ mg/ml سدیم سولفید، در محلول پایه ی ۱۰ mmolL⁻¹ سدیم نیتريت) تهیه شده است.

قبل از شروع آزمایش، میکرومیکسر به مدت ۳۰ دقیقه در محلول پروتئینی BSA قرار داده می شود. این کار باعث می شود که حفره های بزرگ کاغذ، پر شده و محلول ها بتوانند به راحتی در بستر آب دوست آن به حرکت در آیند^۷. پس از خشک شدن کاغذ، یک قطره ی ۵ میکرولیتری از محلول گریس در یک ورودی و سپس قطره ای با همین حجم از نمونه ی بزاق مصنوعی در ورودی دیگر قرار داده می شود. قطره ها به واسطه ی خاصیت موینگی، در طول کانال پیش می روند و پس از گذشت زمانی مشخص، تقریباً در منطقه ی تشخیص، با ایجاد رنگ صورتی وجود نیتريت در بزاق نشان داده می شود.

۱-۲- ساخت میکروپد

روش های مختلفی برای ساخت میکروپدهای کاغذی ارائه شده است، که از آن جمله می توان به روش های فتولیتوگرافی^۸، حکاکی جوهرافشانی^۹، حکاکی پلاسما^{۱۰}، برش با لیزر و چاپ با

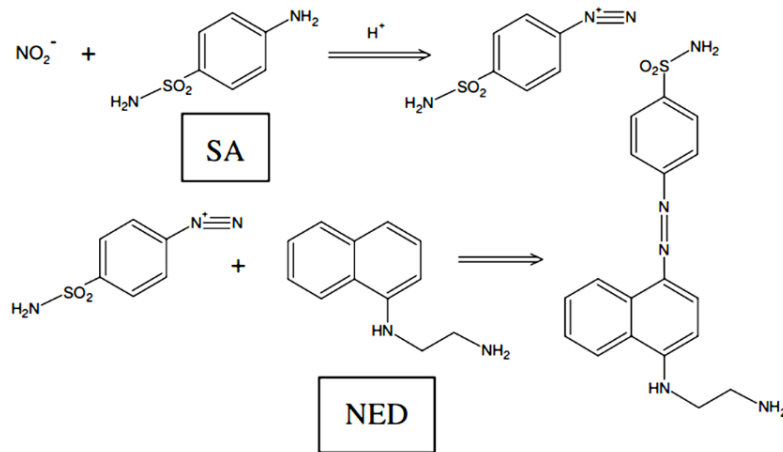
استفاده از وکس، اشاره کرد. اگرچه هر فناوری ساخت، مزیت های خاص خود را دارد، اما امروزه به روش ساختی نیاز است که با استفاده از ساده ترین روش، بتواند میکروپد را در مقیاس انبوه تولید کرده و در عین حال قابلیت اطمینان بالا و هزینه ی پایینی داشته باشد. به علاوه، دستگاه باید بیشترین حجم ممکن از سیال را به منطقه ی هدف برساند. روش برش کاغذ توسط لیزر، از دقت مناسب، هزینه ی بسیار پایین، سادگی فرایند ساخت، سرعت بالا و قابلیت انبوه سازی برخوردار است.

میکرومیکسر طراحی شده در این مقاله، از چهار بخش مجزا، شامل ورودی، میکسر، منطقه ی تشخیص و منطقه ی جاذب تشکیل شده است. از آن جا که هدف اصلی، بهینه سازی اختلاط برای دستیابی به بیشترین میزان تشخیص نیتريت در بزاق است، برای بخش میکسر، پنج هندسه ی متفاوت (ساده^{۱۱}، مارپیچ^{۱۲}، زیگزاگ^{۱۳}، شکسته ی قائم^{۱۴} و شکسته ی مایل^{۱۵}) طراحی شده است.

برای انجام مقایسه ی دقیق و با شرایط یکسان، این اشکال هندسی با ثابت نگه داشتن پارامترهایی از قبیل طول کلی منطقه ی اختلاط، عرض کانال و طول یکسان ورودی و خروجی منطقه ی اختلاط، طراحی شده اند. طبق این فرضیات، زوایای موجود در شکل هندسی شکسته ی مایل و زیگزاگ، به ترتیب برابر با ۸۵ و ۶۲ درجه در نظر گرفته شده است.

هندسه ی میکرومیکسرها در نرم افزار سالیدورکز^{۱۶} طراحی شده و با برش لیزر تولید شده است. بدین منظور، فایل طراحی با پسوند DWG ذخیره شده و به عنوان ورودی به دستگاه لیزر داده شده است. در این کار از کاغذ واتمن^{۱۷} شماره ی ۱ استفاده شده است، که با توجه به ظرافت کاغذ، فرایند برش باید بسیار آرام و با توان پایین انجام شود. دو ورودی (با طول ۳/۵۳ میلی متر و عرض ۷۰۰ میکرومتر)، نسبت به یکدیگر زاویه ی ۶۰ درجه دارند. منطقه ی اختلاط، کانالی با ۵ هندسه ی متفاوت، عرض ثابت ۱ و طول ۸/۴۳ میلی متر می باشد. همچنین منطقه ی تشخیص، دایره ای به قطر ۲ میلی متر است.

^۹ Inkjet Printing^{۱۰} Plasma Oxidation^{۱۱} Straight^{۱۲} Curved^{۱۳} Zigzag^{۱۴} Square Wave^{۱۵} Hexagonal^{۱۶} Solid Works^{۱۷} Whatman® (VWR; Radnor, PA)^۱ تبدیل آمین به یک ترکیب diazo با فرمول $R_2C = N^+ = N^-$ ^۲ Sulfanilamide^۳ Diazonium Salt^۴ N-Naphtyl-Ethilenediamine (NEDD)^۵ $\dot{R} - N = N - R$ ^۶ Yildirmaz^۷ Blocking Process^۸ Photolithography



شکل (۳) - مراحل تشخیص نیتريت توسط واکنش گريس در يك محيط اسیدی [۲۲]

که شرایط عکس برداری همواره یکسان نیست، تمامی تحلیل‌ها با در نظر گرفتن یک مساحت به عنوان مرجع، کالیبره شده‌اند. بدین ترتیب، تاثیر نور و یا تفاوت کیفیت عکس‌ها، تا حد ممکن اصلاح شده است.

۲-۲- مطالعه‌ی عددی

برای تحلیل عددی مساله، از نرم‌افزار انسیس سی‌افاکس استفاده شده است. از آن‌جا که تحلیل تصاویر آزمایشگاهی، پس از پایدار شدن رنگ منطقه‌ی تشخیص میکروپد، انجام شده است، در تحلیل عددی نیز برای رسیدن به جواب پایدار، مساله به صورت پایا بررسی شده است.

برای مدل‌سازی اختلاط دو سیال با خواص ترمودینامیکی و انتقالی متفاوت، جریان از نوع دوفازی با رویکرد اویلر-اویلر همگن و با توجه به بستر کاغذی میکرومیکسر، در محیط متخلخل با ضریب تخلخل 0.6 (مطابق با تخلخل کاغذ واتمن شماره ۱) انتخاب شده است. هم‌چنین برای شبیه‌سازی جریان در محیط متخلخل، از مدل دارسی-بریکمن-فريکهايمر استفاده شده است. روابط (۱) و (۲) معادلات حاکم بر جریان (به ترتیب معادله‌ی پیوستگی و معادله‌ی اندازه‌ی حرکت) را نشان می‌دهند، که با فرض جریان دائم، آرام، تراکم‌ناپذیر و سیال نیوتنی، به صورت زیر می‌باشند:

$$\nabla \cdot (V_\alpha) = 0 \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \nabla \cdot \left(\frac{r_\alpha \rho_\alpha}{\varepsilon} V_\alpha \times V_\alpha \right) &= \frac{-r_\alpha}{\varepsilon} \nabla P_\alpha \\ &+ \nabla \cdot \left[\frac{r_\alpha \mu_\alpha}{\varepsilon} (\nabla (V_\alpha + V_\alpha^T)) \right] \\ &+ \sum (M_{\alpha\beta}) + F \end{aligned} \quad (2)$$

۳-۱-۲- فناوری تشخیص

شدت رنگ حاصل از واکنش گريس در یک نمونه، به غلظت يون نیتريت موجود در آن بستگی دارد. انتظار می‌رود که واکنش برای نیتريت موجود در نمونه‌های محیطی، به اندازه‌ی کافی حساس باشد. از آن‌جا که در وسایل کاغذی، طول مسیر بسیار کوتاه بوده، حجم معرف‌ها نیز بسیار کم‌تر است. این حس‌گرها در صورت وجود نیتريت در نمونه‌ی تحلیل شده، در مدت چند دقیقه پاسخ می‌دهند. رنگ صورتی ایجاد شده به راحتی با چشم قابل مشاهده است. با استفاده از کارت‌های مرجع، که مطابق با رنگ‌های تشکیل شده توسط محلول‌های استاندارد هستند، می‌توان به تحلیل‌های کمی هم‌زمان دست پیدا کرد. به منظور کمی‌سازی، پس از انجام آزمایش، یک عکس از وسیله گرفته شده و شدت رنگ تصویر اسکن شده، بر اساس کد رنگی RGB (قرمز، سبز و آبی) اندازه‌گیری می‌شود [۲۱].

پس از خشک شدن میکروپد و در نتیجه تثبیت رنگ آن (حدود ۱۰ دقیقه)، با یک گوشی هوشمند عکسی از منطقه‌ی تشخیص گرفته می‌شود. این زمان برای تکرارپذیری بیش‌تر در آنالیز کمی مناسب‌تر است [۱۱]. با گذشت زمان، شدت رنگ تشکیل شده روی میکرومیکسرها رفته رفته افزایش می‌یابد، تا جایی که به مقدار ثابتی همگرا گردد. البته به منظور اطمینان بیش‌تر، در هر دقیقه یک عکس از میکروپد گرفته شده، تا روند پایداری رنگ ایجاد شده نیز مشخص شود. پس از گذشت این زمان، عکس‌های پایدار میکروپد به عنوان معیار تحلیل تراکم غلظت نیتريت از روی مقدار RGB در نظر گرفته می‌شوند. سپس منطقه‌ی تشخیص در میکرومیکسرها به کمک پردازش تصویر در نرم‌افزار متلب، تحلیل می‌شود. مطابق با کد تحلیلی، میانگین RGB تمام نقاط منطقه‌ی تشخیص محاسبه می‌شود. از آن‌جا

مشخص کرده و در نهایت میکرومیکسرها را به صورت کمی با یکدیگر مقایسه کرد.

جدول (۲) - بررسی استقلال از شبکه در حل عددی

تعداد گره	نسبت حجمی متوسط بزاق (x)
۲۷۶۸	۰/۴۳۱۲
۴۱۲۲	۰/۴۶۲۳
۵۷۲۲	۰/۴۸۵۷
۱۰۶۴۶	۰/۵۰۲۷
۱۸۷۶۱	۰/۵۱۱۶

در این بخش، پس از انجام تست تشخیص نیتريت، تحلیل تصاویر به دست آمده توسط کد پردازش تصویر در نرم افزار متلب و مقایسه‌ی آن با نتایج حاصل از شبیه‌سازی، بازده اختلاط در پنج هندسه‌ی میکرومیکسر، محاسبه و با هم مقایسه شده‌اند. به منظور تحلیل نتایج برای محاسبه‌ی بازده اختلاط، طبق رابطه‌ی (۶) از معیار اختلاط بر مبنای انحراف غلظت استفاده شده است [۲۴].

$$\eta = \left[1 - 2 * \sqrt{\frac{\int (\bar{c}_s - \bar{c}_s^*)^2 dA}{\int dA}} \right] \quad (6)$$

متغیرهای \bar{c}_s و \bar{c}_s^* ، به ترتیب غلظت موضعی مقیاس شده و غلظت مقیاس شده در هر نقطه از محلول کاملاً مخلوط را نشان می‌دهند و A ، مساحت سطح مقطع عرضی، در محل محاسبه‌ی معیار اختلاط می‌باشد.

در ادامه، مطابق با تحلیل‌های انجام شده و معیار اختلاط تعریف شده، مقایسه‌ای از بازده میکرومیکسرها در دو حالت تست و شبیه‌سازی انجام شده است.

۳- نتایج

هدف از به کارگیری اختلاط در تشخیص نیتريت، دستیابی به میکروپدی است که با حجم اندکی از نمونه، در شرایط مشابه، دقت بالاتری نسبت به سایر میکروپدهای موجود داشته باشد. بنابراین در این قسمت، ابتدا هندسه‌های طراحی شده برای بخش اختلاط میکرومیکسر، با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفته و بازده اختلاط به دو صورت عددی و آزمایشگاهی محاسبه می‌شود. در ادامه، به منظور تعیین دقت، میکرومیکسری که بهترین عمل کرد را داشته مورد تست قرار گرفته، تا بهبود دقت در تشخیص نیتريت، به کمک اختلاط در میکروپد، نشان داده شود.

در روابط (۱) و (۲)، پارامترهای α و β معرف دو فاز مختلف هستند. در معادله‌ی (۲)، ρ ، μ و V ، به ترتیب بیان‌گر چگالی، لزجت دینامیکی و سرعت بالک سیال، ε ضریب تخلخل محیط (که برابر با ۰/۶ در نظر گرفته شده است)، r_α کسر حجمی، P فشار و $\sum(M_{\alpha\beta})$ مقدار ممنوم انتقالی بین دو فاز سیال هستند. همچنین، F مقدار نیروی درگ ناشی از محیط متخلخل است که طبق رابطه‌ی (۳) محاسبه می‌شود:

$$F_{x,\alpha} = AV_{x,\alpha} + B(V_{x,\alpha}^2 + V_{y,\alpha}^2)^{\frac{1}{2}}V_{x,\alpha} \quad (3)$$

ضرایب A و B در رابطه‌ی (۳)، مطابق روابط (۴) و (۵) محاسبه می‌شوند:

$$A = 150 \frac{(1 - \varepsilon)^2 \mu_\alpha}{\varepsilon^3 D_p^2} \quad (4)$$

$$B = 1.75 \frac{(1 - \varepsilon) \mu_\alpha}{\varepsilon^3 D_p} \quad (5)$$

همچنین در روابط (۴) و (۵)، D_p قطر دانه‌بندی محیط متخلخل بوده، که برای کاغذ واتمن شماره‌ی ۱، برابر با ۱۱ میکرومتر است.

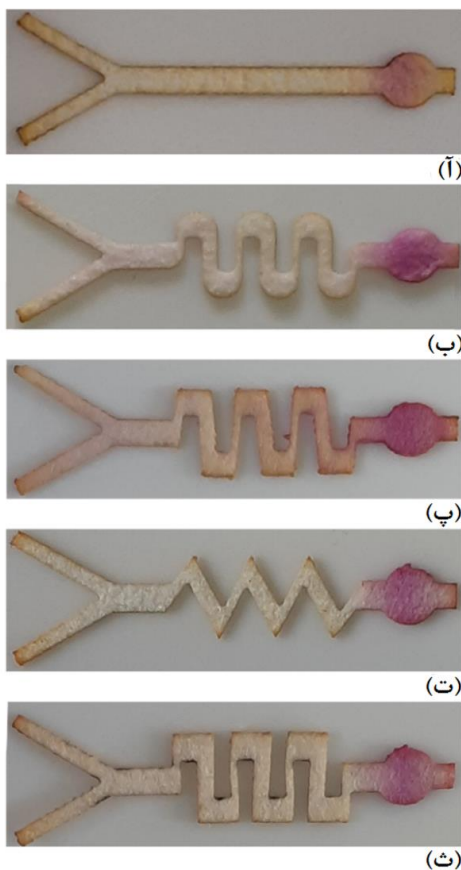
در تحلیل انجام شده، فاز α و β به ترتیب معرف گریس و بزاق مصنوعی هستند. مشخصات آن‌ها که به صورت آزمایشگاهی محاسبه شده‌اند، در جدول (۱) ارائه شده است.

جدول (۱) - مشخصات دو فاز به کار رفته در تحلیل عددی

پارامتر (واحد)	مقدار
چگالی معرف گریس ($gr.cm^{-3}$)	۰/۹۸۰۵۲
چگالی بزاق مصنوعی ($gr.cm^{-3}$)	۱
لزجت معرف گریس ($N.s.m^{-2}$)	۰/۰۰۰۹۴۵۹۷
لزجت بزاق مصنوعی ($N.s.m^{-2}$)	۰/۰۰۱۴

حوزه‌ی محاسباتی برای تمام میکرومیکسرها، توسط روش حجم‌محدود و المان‌های چهاروجهی، گسسته‌سازی شده است. همچنین استقلال نتایج به دست آمده از شبکه نیز مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج استقلال از شبکه برای میکرومیکسر شکسته‌ی مایل، در جدول (۲) ارائه شده است. بر این اساس، جواب شبکه‌های دارای تعداد ۱۰۶۴۶ و ۱۸۷۶۱ سلول، تنها به میزان ۱/۱۷۶٪ با هم اختلاف دارند. بدین ترتیب، شبکه‌ی دارای ۱۰۶۴۶ سلول انتخاب گردید.

به منظور مقایسه‌ی نتایج عددی و آزمایشگاهی با یکدیگر، به تعریف یک معیار برای سنجش اختلاط، نیاز است تا بتوان مطابق با این معیار، میزان مخلوط شدن دو سیال را با یک عدد

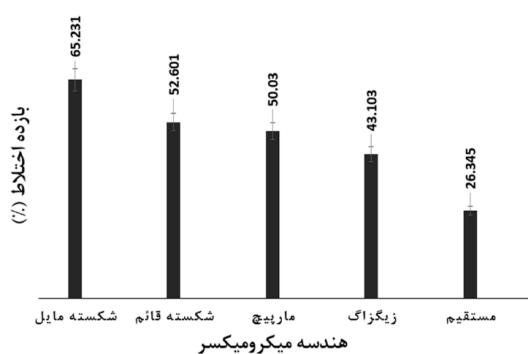


شکل (۴) - تشخیص نیتريت 10 mmolL^{-1} در بزاق

(آ) میکرومیکسر مستقیم، (ب) میکرومیکسر مارپیچ،
(پ) میکرومیکسر شکسته‌ی مایل، (ت) میکرومیکسر زیگ‌زاگ،
(ث) میکرومیکسر شکسته‌ی قائم

به منظور مقایسه‌ی کمی و دقیق‌تر این ۵ هندسه، از تحلیل تصاویر در نرم‌افزار متلب کمک گرفته می‌شود. بدین منظور، پس از میانگین‌گیری از مقدار RGB در هر شش آزمایش، برای هر هندسه، یک عدد با استفاده از کاتالوگ‌های کالیبره‌ی تشخیص نیتريت، گزارش شده و در نهایت با یکدیگر مورد مقایسه قرار می‌گیرند.

شکل (۵)، مقایسه‌ی بازده آزمایشگاهی را در منطقه‌ی تشخیص برای میکرومیکسرهای نمایش می‌دهد.



شکل (۵) - نمودار مقایسه‌ی بازده آزمایشگاهی میکرومیکسرهای

با توجه به این که پس از گذشت زمان (حدود ۷ دقیقه)، شدت رنگ روی میکروپد به مقدار ثابتی می‌رسد، میانگین مقادیر RGB در بازه‌ی زمانی ۷ تا ۱۰ دقیقه، به عنوان غلظت نیتريت در نظر گرفته شده و با استفاده از معیار تحلیل تراکم، غلظت نیتريت از روی مقدار RGB محاسبه می‌گردد.

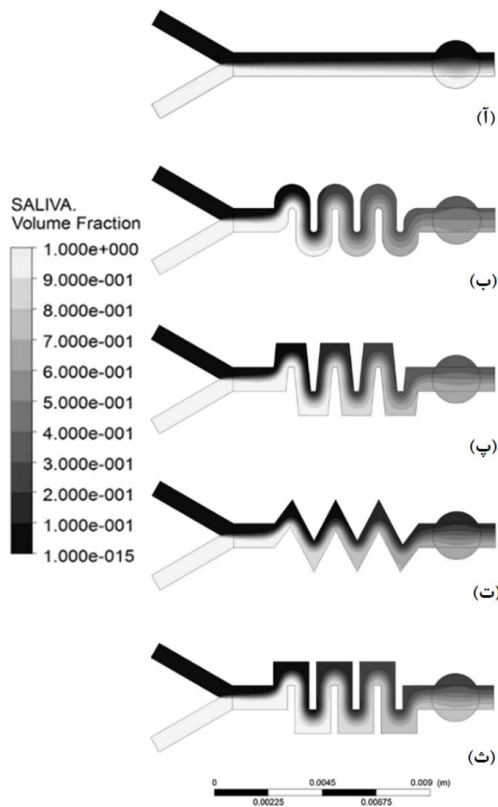
۳-۱- مقایسه‌ی بازده میکرومیکسرهای

با توجه به این که در غیاب جریان آشفته، اختلاط به آرامی در ابعاد میکرو و توسط پدیده‌ی پخش، صورت گرفته و سیال به طور غیرفعال و تحت نیروی موینگی جریان می‌یابد، باید به نحوی با تغییر در هندسه، این بی‌نظمی را پدید آورد. بدین منظور، می‌توان طول اختلاط را با ایجاد پیچیدگی‌هایی زیاد کرد تا علاوه بر افزایش زمان تماس، بی‌نظمی در جریان نیز افزایش یابد [۹].

هم‌چنین، با تغییر شکل مسیر، مقاومت جریان نیز تغییر می‌کند. به طوری که هرچه مقدار مقاومت مسیر جریان افزایش پیدا کند، سرعت جریان کاهش یافته و دو سیال زمان بیشتری را برای مخلوط شدن در اختیار داشته و در نتیجه، بازده اختلاط افزایش پیدا می‌کند.

از این‌رو، شناسایی نیتريت در میکرومیکسرهای مورد بررسی قرار گرفته و چهار طراحی مارپیچ، زیگ‌زاگ، شکسته‌ی قائم و شکسته‌ی مایل، در کنار کانال ساده، برای بخش اختلاط با هم مقایسه شده‌اند، تا پس از تحلیل، مشخص شود که کدام هندسه میزان اختلاط بیش‌تری را ایجاد کرده است. شکل (۴) نتیجه‌ی این مقایسه را که حاصل آزمایش گریس با غلظت مشخصی از نیتريت است، نشان می‌دهد. در این شکل، تغییر رنگ منطقه‌ی تشخیص به دلیل حضور نیتريت در میکرومیکسرهای پس از ده دقیقه نمایش داده شده است. برای هر میکرومیکسر، یک تصویر به عنوان نمونه انتخاب شده است.

نتیجه‌ی واکنش گریس در ۵ هندسه، در شکل (۴) قابل مشاهده است. با توجه به این شکل، از روی شدت رنگ مناطق تشخیص، می‌توان به عمل کرد ضعیف میکرومیکسر ساده و عمل کرد بسیار خوب میکرومیکسر شکسته‌ی مایل در تشخیص نیتريت پی برد. آزمایش گریس به گونه‌ای برای هندسه‌ها صورت گرفته است، که در تمامی آن‌ها، غلظت نیتريت موجود در نمونه‌ی بزاق مصنوعی، ثابت و برابر با 10 mmolL^{-1} در نظر گرفته شده است. با توجه به غلظت ثابت نیتريت، تفاوت شدت رنگ در منطقه‌ی تشخیص هر میکرومیکسر، ناشی از هندسه‌های متفاوت بخش اختلاط می‌باشد.



شکل (۶) - کانتور نسبت حجمی بزاق مصنوعی در میکرومیکسر با کانال: (آ) مستقیم، (ب) ماریج، (پ) شکسته‌ی مایل، (ت) زیگ‌زاگ و (ث) شکسته‌ی قائم

در شکل (۷)، بازده عددی میکرومیکسرها، که بر مبنای انحراف از غلظت تعیین شده‌اند، با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفته است. مطابق شکل (۷) نیز میکرومیکسر شکسته‌ی مایل بهترین عمل کرد را نسبت به سایر میکرومیکسرها ارائه داده است. ترتیب عمل کرد میکرومیکسرها در دو حالت آزمایشگاهی (شکل ۵) و عددی (شکل ۷) کاملاً یکسان می‌باشد.



شکل (۷) - نمودار مقایسه‌ی بازده عددی میکرومیکسرها

مقایسه‌ی دقیق‌تر دو شکل (۵) و (۷)، وجود اختلافی اندک و در برخی میکرومیکسرها اندکی بیش‌تر را بین مقدار کمی نتایج

از نمودار شکل (۵) مشخص می‌شود که بازده میکرومیکسر مستقیم، کم‌تر از ۳۰٪ بوده و سایر هندسه‌ها (صرف‌نظر از شکل هندسی) بازده بیش‌تری نسبت به هندسه‌ی مستقیم دارند. این بدین معنا است که استفاده از میکسر و ایجاد پیچیدگی در هندسه، موجب دستیابی به بازده بیش‌تر شده و از آن‌جا که بازده عملی، به صورت مستقیم و بر حسب مقدار RGB متوسط، از شدت رنگ منطقه‌ی تشخیص هر میکرومیکسر حاصل می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که با به کارگیری اختلاط، میزان نیتريت بیش‌تری از مقدار موجود در نمونه، تشخیص داده شده است. نکته‌ی دیگری که از نمودار شکل (۵) مشخص می‌شود این است که میکرومیکسر شکسته‌ی مایل دارای بیش‌ترین مقدار بازده (حدود ۶۵٪) می‌باشد. به همین دلیل، این هندسه برای بخش اختلاط میکرومیکسر انتخاب شده تا با توجه به تاثیر هندسه‌ی آن بر جریان، بتوان به دقت بالاتری از تشخیص نیتريت دست یافت. میکرومیکسر شکسته‌ی مایل، با داشتن پیچیدگی (گوشه‌های تیز و با شیب ملایم)، اختلاط بهتری نسبت به سایر هندسه‌ها فراهم کرده و میزان اختلاط را نسبت به میکرومیکسر ساده به میزان ۳۸/۹۹٪ افزایش داده است.

علاوه بر تحلیل آزمایشگاهی، نتیجه‌ی عمل کرد هر هندسه در حل عددی نیز با توجه به معیار اختلاط بر مبنای انحراف غلظت مورد تحلیل و مقایسه قرار گرفته، که نتیجه در شکل (۶) قابل مشاهده است.

در میکرومیکسرها، ماریج، شکسته‌ی مایل، شکسته‌ی قائم و زیگ‌زاگ، جریان دو سیال در منطقه‌ی اختلاط میکرومیکسرها، از مسیر مستقیم منحرف شده و در مسیر طولانی‌تری به حرکت در آمده است، که این مسیر طولانی، مدت زمان تماس دو سیال را افزایش می‌دهد. هم‌چنین، علاوه بر طولانی شدن مسیر، این هندسه‌های پیچیده، سرعت سیال را کاهش می‌دهند. بنابراین دو عامل سرعت و زمان، به صورت موافق در راستای افزایش زمان تماس عمل کرده و بدین ترتیب دو سیال برای مدت زمان بیش‌تری با یکدیگر در تماس بوده و در نتیجه بهتر با هم مخلوط می‌شوند.

شکل (۶)، کانتور نسبت حجمی دو سیال نمونه‌ی بزاق و معرف گریس در میکرومیکسرها را نمایش می‌دهد، که بهبود چشم‌گیر اختلاط در چهار هندسه‌ی طراحی شده نسبت به میکروکانال ساده، در آن قابل مشاهده است. هرچه رنگ منطقه‌ی تشخیص یک‌نواخت‌تر باشد، اختلاط بهتری صورت گرفته است. به منظور مقایسه‌ی کمی میزان اختلاط در هندسه‌های مختلف، از معیار اختلاط بر مبنای انحراف از غلظت استفاده می‌شود.

(۸) نمودار مقدار RGB متوسط بر حسب غلظت نیتريت در محدوده‌ی وسیع ۵ تا $1000 \mu\text{molL}^{-1}$ را نمایش می‌دهد، که اگر غلظت نیتريت بر حسب مقادیر لگاریتمی رسم شود، با تقریب بسیار خوبی، خطی می‌باشد (شکل ۸). این بازه‌ی وسیع، تشخیص و کمی‌سازی مقادیر متفاوت‌تری از غلظت نیتريت، به کمک میکروپد را ممکن می‌سازد.

همان‌طور که در شکل (۸) قابل مشاهده است، با افزایش غلظت نیتريت، به تدریج بر شدت رنگ صورتی افزوده می‌شود. طبق شکل، شیب نمودار در غلظت $115 \mu\text{M}$ شروع به کاهش یافتن می‌کند. این امر ممکن است دلایلی از جمله مصرف کامل معرف رنگ‌دهنده، تبخیر بزاق مصنوعی (خشک شدن کاغذ قبل از تشکیل محصولات رنگی) و کاهش حساسیت در پردازش تصویر داشته باشد [۱۴]. در صورتی که مقادیر RGB بر حسب لگاریتم غلظت نیتريت رسم شوند، یک نمودار خطی مانند شکل (۸-ا) به دست می‌آید. همان‌طور که از نمودار مشخص است، مقادیر RGB بر حسب غلظت لگاریتمی در محدوده‌ی صفر تا $1000 \mu\text{molL}^{-1}$ بازه‌ی تشخیص وسیع‌تر باشد، نمونه‌ها با غلظت‌های متفاوت و وسیع‌تری، از روی نمودار به دست آمده قابل اندازه‌گیری هستند. در مورد تشخیص نیتريت از روی نمودار شدت بر حسب غلظت نیتريت، غلظت‌های مختلف نیتريت از بزاق‌های مختلف قابل تشخیص و کمی‌سازی می‌باشند.

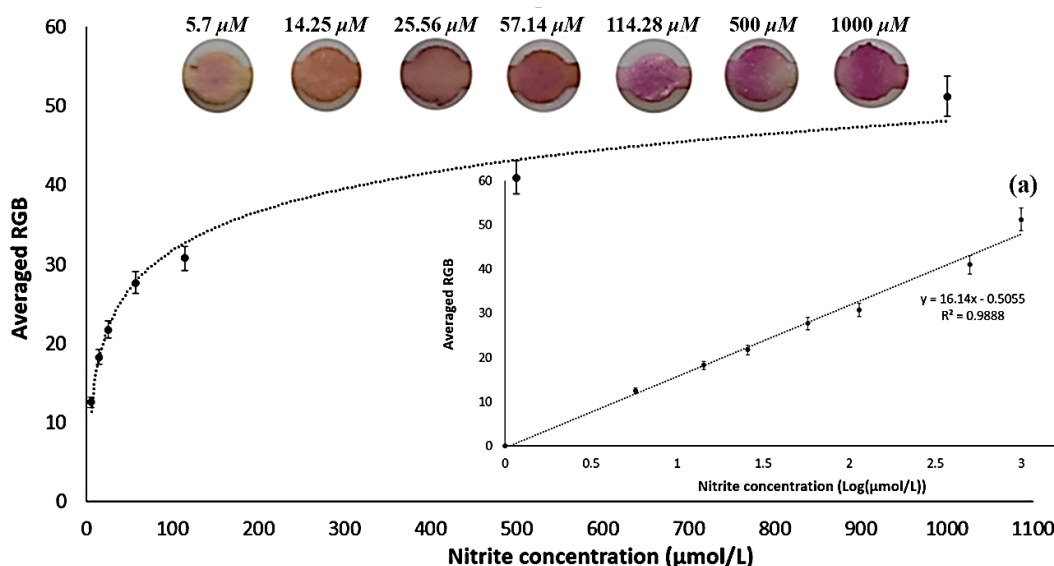
آزمایشگاهی و عددی نشان می‌دهد. این تفاوت‌ها در کارهای آزمایشگاهی با بستر کاغذ، امری طبیعی به حساب آمده که از مهم‌ترین دلایل آن، می‌توان به نوین بودن کارهای عددی در این زمینه اشاره کرد. این تفاوت‌ها به وجود خطاهایی در ساخت میکروپد، آماده‌سازی مواد واکنش و همچنین تصویربرداری از منطقه‌ی تشخیص، مربوط می‌شود.

۳-۲- تعیین دقت میکرومیکسر منتخب

در ادامه، نمونه‌های بزاق مصنوعی با غلظت‌های متفاوت نیتريت در محدوده‌ی ۵ تا $1000 \mu\text{molL}^{-1}$ در میکرومیکسر شکسته‌ی مایل مورد آزمایش قرار گرفته تا بدین ترتیب دقت و محدوده‌ی اندازه‌گیری نیتريت، افزایش یابد.

بدین منظور، بزاق مصنوعی مطابق دستورالعمل ایلدیرماز تهیه شده است، با این تفاوت که غلظت نیتريت به تدریج از صفر تا $1000 \mu\text{molL}^{-1}$ افزایش یافته و در هر مرتبه افزایش غلظت، یک آزمایش انجام می‌شود. پس از گذشت زمان ۱۰ دقیقه، تصویربرداری و تحلیل تصاویر، شدت تصاویر بر حسب مقدار میانگین RGB محاسبه می‌شود.

تا رسیدن به غلظت $5/7 \mu\text{molL}^{-1}$ ، تغییر رنگی در منطقه‌ی تشخیص دیده نمی‌شود. در این غلظت، رنگ صورتی با شدت کمی ایجاد می‌شود. بنابراین، دقت تشخیص با میکرومیکسر شکسته‌ی مایل، به غلظت $5/7 \mu\text{molL}^{-1}$ رسیده است. شکل



شکل (۸) - نمودار مقدار RGB متوسط برای غلظت‌های مختلف نیتريت (ا) نمودار مقدار RGB بر حسب مقادیر لگاریتمی غلظت نیتريت

بدین ترتیب میزان اختلاط افزایش یابد [۱۰]. داشتن گوشه‌های تیز می‌تواند بی‌نظمی را تشدید کند، اما از طرفی، ساده و کم‌هزینه بودن فرایند ساخت نیز باید مد نظر قرار داده شود.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

هدف از طراحی ساختار کانال‌ها این است که با ایجاد پیچیدگی در هندسه، سیال دچار بی‌نظمی و آشفتگی بیش‌تری گشته و

- [9] L. Capretto, W. Cheng, M. Hill, and X. Zhang, "Micromixing within microfluidic devices," *Top. Curr. Chem.*, 2011.
- [10] A. R. Rezk, A. Qi, J. R. Friend, W. H. Li, and L. Y. Yeo, "Uniform mixing in paper-based microfluidic systems using surface acoustic waves," *Lab Chip*, 2012.
- [11] T. M. G. Cardoso, P. T. Garcia, and W. K. T. Coltro, "Colorimetric determination of nitrite in clinical, food and environmental samples using microfluidic devices stamped in paper platforms," *Anal. Methods*, 2015.
- [12] World Health Organisation, "Oral health," 2012.
- [13] P. I. Reed, K. Haines, P. L. R. Smith, F. R. House, and C. L. Walters, "Gastric Juice N-Nitrosamines in Health and Gastrointestinal Disease," *Lancet*, 1981.
- [14] S. A. Klasner, A. K. Price, K. W. Hoeman, R. S. Wilson, K. J. Bell, and C. T. Culbertson, "Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva," *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010.
- [15] D. Rupert, "Standard methods for the examination of water and wastewater," no. December, 1912.
- [16] M. C. Barciela Alonso and R. Prego, "Determination of silicate, simultaneously with other nutrients (nitrite, nitrate and phosphate), in river waters by capillary electrophoresis," *Anal. Chim. Acta*, 2000.
- [17] W. S. Jobgen, S. C. Jobgen, H. Li, C. J. Meininger, and G. Wu, "Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2007.
- [18] M. Badea, A. Amine, G. Palleschi, D. Moscone, G. Volpe, and A. Curulli, "New electrochemical sensors for detection of nitrites and nitrates," *J. Electroanal. Chem.*, 2001.
- [19] S. A. Bhakta, R. Borba, M. Taba, C. D. Garcia, and E. Carrilho, "Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices," *Anal. Chim. Acta*, 2014.
- [20] L. Li, "Design Of Micromixer and Microfluidic Control System," Florida Atlantic University, 2013.
- [21] J. G. R. Ummadi, "Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite with a Paper-Based Microfluidic Device," Tennessee Technological University, 2012.
- [22] J. Sun, X. Zhang, M. Broderick, and H. Fein, "Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay," *Sensors*, 2003.
- [23] S. Akgo, M. Y. Arica, H. So, and A. Denizli, "Composite Membranes for Fluoride Release," *Polymer (Guildf)*, vol. 87, pp. 976-981, 2002.
- [24] M. Jain, A. Rao, and K. Nandakumar, "Numerical study on shape optimization of groove micromixers," *Microfluid. Nanofluidics*, 2013.

در این مقاله، تشخیص نیتريت روی کاغذ به روش کالری متری انجام شده و به منظور دستیابی به دقت بالاتر، از مزایای میکسرها بهره گرفته شده است. به این ترتیب، از آنجا که اختلاط از نوع غیرفعال است، با ایجاد پیچیدگی در کانال و به وجود آوردن بی‌نظمی در جریان، میزان اختلاط نیتريت موجود در نمونه‌ی بزاق مصنوعی با معرف گریس، بهبود یافته، در نتیجه، ترکیب رنگی بیش‌تری ایجاد شده و رنگ مشاهده شده از شدت بیش‌تری برخوردار می‌شود. در نهایت، با مقایسه‌ی هندسه‌ها و با بهینه‌سازی هندسه‌ی میکسر به صورت شکسته‌ی مایل، این اختلاط بیش‌تر از سایر هندسه‌ها بهبود یافته است. بدین ترتیب، هندسه‌ی شکسته‌ی مایل برای بخش اختلاط میکرومیکسر، بیش‌ترین افزایش بازده را به دنبال داشته است. دقت سنجش میزان نیتريت موجود در بزاق، با این هندسه، به تشخیص نیتريت با غلظت $5/7 \mu\text{molL}^{-1}$ رسیده است. با توجه به کاربرد وسیع اختلاط در میکروسیالات، از این هندسه‌ی بهینه‌سازی شده (شکسته‌ی مایل) در بخش اختلاط وسایل آزمایشگاه-روی-تراشه^۱، برای انجام هر واکنش و هر نوع تشخیص دیگری نیز می‌توان بهره برد.

۵- مراجع

- [1] J. L. Osborn, B. Lutz, E. Fu, P. Kauffman, D. Y. Stevens, and P. Yager, "Microfluidics without pumps: reinventing the T-sensor and H-filter in paper networks," *Lab Chip*, 2010.
- [2] P. Gravesen, J. Branebjerg, and O. S. Jensen, "Microfluidics-a review," *J. Micromechanics Microengineering*, 1993.
- [3] N. Lopez-Ruiz *et al.*, "Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices," *Anal. Chem.*, 2014.
- [4] A. K. Yetisen, M. S. Akram, and C. R. Lowe, "Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices," *Lab Chip*, 2013.
- [5] A. W. Martinez *et al.*, "Programmable diagnostic devices made from paper and tape," *Lab Chip*, 2010.
- [6] E. Carrilho, A. W. Martinez, and G. M. Whitesides, "Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics," *Anal. Chem.*, 2009.
- [7] B. M. Jayawardane, S. Wei, I. D. McKelvie, and S. D. Kolev, "Microfluidic paper-based analytical device for the determination of nitrite and nitrate," *Anal. Chem.*, 2014.
- [8] X. Li, D. R. Ballerini, and W. Shen, "A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends," *Biomicrofluidics*, 2012.

^۱ Lab-on-Chip

- [26] M. Hadigol, R. Nosrati, A. Nourbakhsh, and M. Raisee, "Numerical study of electroosmotic micromixing of non-Newtonian fluids," *J. Nonnewton. Fluid Mech.*, 2011.
- [25] J. M. Miranda, H. Oliveira, J. A. Teixeira, A. A. Vicente, J. H. Correia, and G. Minas, "Numerical study of micromixing combining alternate flow and obstacles," *Int. Commun. Heat Mass Transf.*, 2010.