

## SEPARACIÓN HIDRODINÁMICA DE MACROMOLÉCULAS, PARTÍCULAS Y CÉLULAS

### Hydrodynamic Separation of Macromolecules, Particles and Cells

MAURICIO HOYOS

Laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes

UMR7636 CNRS

Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles

10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, Francia

Revisión invitada, junio 2003

#### RESUMEN

La separación de especies químicas de gran tamaño como las proteínas, el ADN, los polisacáridos, las células, está tomando una importancia indiscutible tanto en el campo de las aplicaciones industriales, como en el campo de la investigación fundamental. La fuerza de la biotecnología y de las ciencias biomédicas está centrada en su capacidad de innovación, en la cual, las técnicas de análisis, de separación y de purificación juegan un papel capital. A pesar del enorme progreso de la cromatografía de alto rendimiento y de sus diferentes subtécnicas en materia de separación de pequeñas y medianas moléculas, dichas técnicas resultan inadecuadas para la separación y el análisis de grandes especies químicas, justamente por el tamaño de estas últimas. Presentamos aquí los fenómenos más importante inherentes al análisis y a la separación de macromoléculas, partículas y células. Dichos fenómenos deben ser estudiados principalmente desde el punto de vista de la mecánica de fluidos, de la fisicoquímica y de la química analítica. Hacemos particular énfasis en la separación de objetos más grandes que una micrómetro, a través de la presentación de dos técnicas poco conocidas, pero de gran potencial: el Fraccionamiento Campo-Flujo, FFF, y el *Split-Flow Thin Cell Fractionation*, SPLITT.

**Palabras clave:** hidrodinámica, separación, FFF, SPLITT, macromoléculas.

#### ABSTRACT

Separation of big chemical species, like proteins, DNA, polysaccharides, biological cells, is ubiquitous in industrial applications and fundamental research. Progress in biotechnology and biomedical engineering need to make appeal to separation sciences for developing new products. Although big progress have been made by the chromatography and its related techniques concerning the separation of small and intermediate molecules, those techniques are nevertheless inadequate for fraction-ating and analyzing big species. In this paper we present the main phenomena implied in the separation process of macromolecules, particles and biological cells. Those phenomena have to be investigated by means of the fluid mechanics, the physical-chemistry end the analytical chemistry. We emphasize on separation of species bigger than one micrometer, by consider-

ing two not still very well known techniques, but with high developing potential: the Field\_Flow Fractionation, FFF, and the Split-flow Thin cell fractionation, SPLITT.

**Key words:** hydrodynamics, separation, FFF, SPLITT, macromolecules.

## INTRODUCCIÓN

La separación y la caracterización de especies químicas es fundamental en procesos de producción tecnológica tan variados como la industria farmacéutica, agroalimentaria, biotecnológica y biomédica. Las ciencias de la separación engloban un gran número de procesos que han sido desarrollados principalmente dentro del marco de la química analítica. Así, la cromatografía, la electroforesis y otros procesos de separación y de caracterización de especies químicas, han tenido un desarrollo impresionante en los últimos cincuenta años. Actualmente ninguna industria química puede eludir el análisis cromatográfico. Cada producto que existe debe ser analizado. Además, una multitud de análisis son necesarios cotidianamente, ya sea en el estudio del dopaje de deportistas, en el control *in situ* de productos susceptibles de pasar por los aeropuertos como explosivos, drogas, etc. La cromatografía es una técnica capaz de separar y analizar especies químicas de pequeña masa molecular. Esto es debido a que la separación se lleva a cabo en una columna llena de pequeñas partículas de silicio compactadas, llamada *fase estacionaria*, que dejan muy poco espacio para que grandes moléculas, transportadas por un solvente llamado fase móvil, puedan atravesarla. En este medio poroso, o más exactamente, de doble porosidad ya que las partículas son, ellas mismas, porosas, las moléculas sufren esfuerzos elongacionales que las rompen cuando son muy grandes. Entonces, la caracterización de polímeros, de grandes proteínas, de partículas coloidales, de células, en fin, de grandes especies químicas, no puede beneficiarse de la cromatografía, llamada ahora, de alto rendimiento (HPLC, *high performance liquid chromatography*). La electroforesis, la cromatografía de exclusión estérica o *size exclusion chromatography*, SEC, la cromatografía sobre gel o *gel permeation chromatography*, GPC, permiten ir más lejos en masa molecular que la cromatografía en fase líquida tradicional. Sin embargo, más allá de masas moleculares del orden de un millón de daltons, cualquier fase estacionaria, por ejemplo, un gel de la GPC u otros tipos de fases en electroforesis, puede romper las macromoléculas o no deja pasar las partículas. Entramos entonces en otro dominio de las ciencias de la separación donde la fisicoquímica de la materia coloidal y la hidrodinámica juegan un papel fundamental. Es en este dominio de tallas de objetos nos situaremos, es decir, trataremos de mostrar los elementos que forman la base de la separación de macromoléculas, coloides y partículas de talla microscópica, haremos más énfasis en los objetos cuyo tamaño es mayor que un micrómetro. En esta categoría se sitúan las partículas rígidas como las de silicio, látex, almidón, polen, metálicas; partículas deformables como gotas de una emulsión no coloidal y células de todo tipo. La necesidad es separar, caracterizar y preparar suspensiones y emulsiones lo más monodispersas posible, es decir, de una sola talla. Por ejemplo, es indiscutible y los métodos de separación eficientes, poco costosos y fáciles de utilizar son aún muy escasos. Actualmente un gran reto en el área de la biomedicina es poder diagnosticar en forma precoz el cáncer y el de separar células cancerosas de una muestra

de sangre que tiene muy pocas de estas células malignas; otro ejemplo es el de poder separar fácilmente *in situ* los dos tipos principales de la bacteria *Escherichia coli*. Hay muchos ejemplos de la necesidad de separar bacterias, ADNs, células infectadas con parásitos, que justifican una investigación profunda y una inversión económica y humana en este campo.

La separación de grandes especies químicas es además, un vasto campo multidisciplinario por excelencia. Así, la química, la física, la mecánica, la hidrodinámica y la biología se encuentran estrechamente relacionadas. Por esta razón el desarrollo es aún lento pues no es fácil encontrar los laboratorios adaptados ni suficientes especialistas para desarrollar este difícil pero fascinante campo de la investigación. Esta revisión pretende dar pistas que permitan apreciar la intervención de uno de los campos que necesitan ser desarrollados en materia de separación: la mecánica de fluidos. El objetivo principal de esta revisión es mostrar el rol de la mecánica de fluidos en los procesos de separación, es decir lo enfocaremos desde el punto de vista de la física buscando sensibilizar al mismo tiempo a los biólogos. Trataremos por un lado los aspectos de la separación analítica, o sea la separación con fines de análisis de muestras, y por otro lado, los aspectos ligados a la separación en continuo de tipo preparativo o sea aquella utilizada para preparar productos derivados de la biotecnología. Entre los métodos más usados en materia de aislamiento y separación de especies biológicas podemos mencionar (ciertos métodos están desarrollados en García *et al.*, 1999, y Recktenwald y Radbruch, 1998): la centrifugación, la elutriación, la citometría de flujo, la filtración con membranas y otras variantes de las primeras que tienen que ver con la filtración tangencial, gradientes de Percoll. Para completar la lista podemos mencionar las separaciones que utilizan campos eléctricos como la electroforesis que separa proteínas y ADNs y la dielectroforesis para las células; campos magnéticos como la magnetoforesis empleada en la separación de células sanguíneas; campos acústicos o acustoforesis que comienza a dar resultados en separación celular, también acoplamientos diversos pueden establecerse entre todos los métodos mencionados y de hecho, las técnicas de separación se desarrollan enormemente alrededor de dichos acoplamientos entre campos y flujos. El objetivo de esta revisión no es el de exponer las diferentes técnicas sino el de presentar los principales conceptos de base de la separación de grandes especies químicas a través de la introducción de dos técnicas de separación poco conocidas pero con enorme potencial: el Fraccionamiento Campo-Flujo (FFF) y la técnica de *Split-flow fractionation*, SPLITT. También pasaremos en revista los efectos hidrodinámicos ligados a la separación analítica y preparativa de grandes especies químicas.

#### FENÓMENOS LIGADOS A LA SEPARACIÓN DE GRANDES ESPECIES QUÍMICAS

Llamamos grandes especies químicas a las macromoléculas de masa molecular superior a 50.000 daltons, y los objetos rígidos o deformables cuya talla comienza a nivel del nanómetro ( $10^7$  cm). La figura 1, que muestra un tablero de tallas de diferentes compuestos biológicos nos da una idea de donde nos podemos situar desde el punto de vista del tamaño de grandes especies químicas. Dentro de la categoría de las macromoléculas, encontramos los polímeros como de poliestireno o de policloruro de vinilo, el ADN, las proteínas, los polisacáridos. Las partículas coloidales son en general más

pequeñas que un micrómetro ( $10^{-4}$  cm). Dentro de esta categoría podemos citar las partículas de látex de poliestireno, de silicio coloidal, las partículas magnéticas que componen los ferrofluidos, las microemulsiones, las llamadas micropartículas que son expulsadas por algunas células sanguíneas como signo de ciertas patologías, etc. Estas dos categorías de objetos supermoleculares tienen en común que están animadas del movimiento Browniano que caracteriza el fenómeno llamado *difusión*. Los objetos de talla superior al micrómetro como las células, las vesículas o las gotas de ciertas emulsiones, forman parte de la especie química de gran interés en materia de separación.

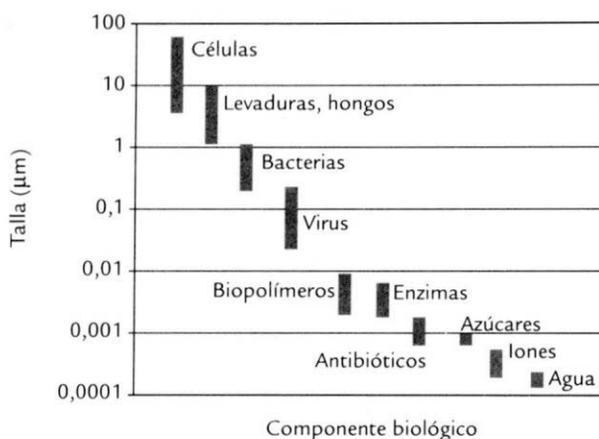


Figura 1. Tamaño de algunos componentes biológicos de interés.

**Fenómeno de difusión browniana y separación.** El movimiento Browniano es aquel que es transmitido por un líquido en reposo macroscópico, pero cuyas moléculas están en permanente agitación térmica, a partículas o macromoléculas que están suspendidas en él. Los choques aleatorios de las moléculas del líquido sobre la superficie de las partículas provocan en ellas, de igual forma, movimientos aleatorios. El desplazamiento neto de las partículas en suspensión está gobernado por una ley que establece que la distancia,  $l$ , llamada longitud de difusión; recorrida por la partícula es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo,  $t$ . Esta relación caracteriza todo proceso difusivo. Así, se define el coeficiente de difusión,  $D$ , a partir de la constante de proporcionalidad de la ecuación:

$$l = (2Dt)^{1/2} \quad (1)$$

El coeficiente de difusión  $D$ , está directamente relacionado con el tamaño de las macromoléculas y de las partículas por medio de la relación de Stokes-Einstein:

$$D = kT/3\pi\eta d \quad (2)$$

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura en grados Kelvin,  $\eta$  es la viscosidad del líquido y  $d$  el diámetro de las partículas. En el caso de partículas sólidas

y el factor  $3\pi$  es de carácter geométrico el cual cambia según la forma o la deformabilidad del objeto. En el caso de las macromoléculas dicho factor tiene otra forma que considera la masa molecular y el diámetro de giro propio a cada macromolécula en un solvente preciso. La difusión así presentada, llamada autodifusión, es válida para una partícula suspendida en un líquido en reposo. Pero la difusión puede también ser considerada en el caso de una suspensión de partículas de una solución de macromoléculas. En ese caso, las partículas en difusión interactúan por medio de choques o simplemente por interacción hidrodinámica o sea por medio de perturbaciones a través del fluido. La difusión como fenómeno colectivo tiende a homogeneizar una suspensión. Así, cuando en una suspensión existen zonas más concentradas que otras, las partículas tienden a migrar de las zonas más densas hacia la menos densas hasta homogeneizar la suspensión. Cuando el fenómeno es colectivo, la difusión se llama difusión de Fick. La ley de Fick nos describe este fenómeno bajo la forma de la ecuación de difusión:

$$J = D \text{ grad } C \quad (3)$$

Donde  $J$ , es el flujo o sea el volumen de partículas que pasan por unidad de tiempo a través de una superficie y  $\text{grad } C$ , el gradiente de concentración, estas son cantidades vectoriales. El coeficiente de difusión en este caso es el mismo que le precede solo en el caso de suspensiones diluidas, o sea,  $C \ll 1\%$  en fracción volumétrica. En el caso de suspensiones concentradas, el coeficiente de difusión es una función más o menos complicada de la concentración. La ecuación (2) nos dice también que  $D$  depende de la viscosidad del líquido y del tamaño de las partículas, esto hace que el coeficiente de difusión pueda considerarse como un parámetro fisicoquímico que caracteriza las especies químicas y pueda ser por consiguiente utilizado como parámetro selectivo de separación en el caso de especies brownianas. Esto quiere decir que un método de separación de coloides (que asociaremos aquí a las especies brownianas) debe poder diferenciar especies que tengan diferente coeficiente de difusión.

¿Cuándo entra en juego la mecánica de fluidos? Veamos más de cerca lo que significa la difusión en los líquidos a partir de la ecuación (2). El numerador es la energía de agitación térmica de las moléculas del líquido suspendente. Con esta energía la partícula debe abrirse paso en el fluido el cual ejerce una resistencia. El fenómeno disipativo provocado por esta resistencia está ligado a la viscosidad del líquido, por eso encontramos en el denominador la viscosidad, cuyas unidades en el sistema cgs son:  $[g \text{ cm}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ . Además, mientras más grande sea la partícula más fluido debe desplazar en su movimiento y la resistencia aumenta, vemos entonces que  $d$  se encuentra también en el denominador. Es útil recordar la fuerza de fricción  $F_f$  que ejerce un líquido al movimiento de una partícula desplazada por una fuerza  $F$ :

$$F_f = 3\pi\eta dU = dU/M \quad (3)$$

Donde  $U$  es la velocidad constante a la cual se desplaza la partícula.  $M$  es la movilidad de la partícula. Esta ecuación demostrada por G. Stokes, físico inglés de fines del siglo XIX, es válida para todo tipo de partículas brownianas o no. Cuando una par-

tícula se desplaza en un líquido en reposo o en movimiento y dicho líquido ejerce presiones y esfuerzos sobre la superficie de la partícula, la hidrodinámica entra en acción. Así, la separación de dos tipos de partícula es posible cuando dichos esfuerzos son diferentes para cada una. Un ejemplo conocido es la centrifugación. La velocidad de sedimentación  $U_s$  de una partícula en un líquido viscoso está dada por la ecuación:

$$U_s = \Delta\rho G d^2 / 18\eta \quad (4)$$

Donde  $\Delta\rho$  es la diferencia entre la densidad de la partícula o de una célula sanguínea, por ejemplo, y el líquido que la suspende.  $G$  es la aceleración del campo gravitacional, centrífugo, magnético, etc. Esta ecuación se obtiene considerando los esfuerzos sobre la partícula y el resultado muestra una función del cuadrado del diámetro de la misma. Dos partículas de tamaño diferente sedimentan a velocidad diferente y podrán ser separadas. En una suspensión bidispersa, es decir, compuesta de partículas de diferente diámetro o densidad, la separación se puede hacer por simple sedimentación o centrifugación. Este método es muy utilizado en biología; varios parámetros pueden ser modificados, por ejemplo, la densidad del medio creando gradientes de Percoll para separar en función de la densidad. El Percoll es una suspensión browniana concentrada en la cual un perfil de concentración creado por la competencia entre la convección (la sedimentación) y la difusión, crea gradientes de densidad en una columna. Las células en sedimentación en dicha suspensión coloidal se acumulan en los niveles donde su densidad coincide con la densidad local del Percoll, punto isopícnico. Este ejemplo muestra un acoplamiento entre la fisicoquímica, la difusión, y la mecánica de fluidos, la sedimentación con fines separativos. Veremos a continuación cómo separar especies acoplando un campo de fuerza.

#### HIDRODINÁMICA Y SEPARACIÓN

Tenemos que aclarar que cuando se trata de métodos analíticos, el concepto de separación parece bien claro ya que el método de "elución" empleado por la cromatografía muestra bien una mezcla inyectada en una columna y una serie de picos de absorción que salen o "eluyen" de la columna en tiempos diferentes. En general un detector ultravioleta o un refractómetro se usan en línea a la salida de la columna cromatográfica. Los picos son la manifestación de los componentes individuales bien separados que pasan por la ventana del detector y el tiempo de residencia o de elución; y está ligado a la naturaleza del componente. La solución molecular es considerada como monodispersa, es decir, que las pequeñas moléculas tienen la misma masa molecular y esto hace que los picos sean bastante angostos permitiendo definir así un tiempo preciso de elución para cada componente. Con la ayuda de tablas de calibración de las columnas cromatográficas se puede determinar el componente cuando solo se conoce el tiempo de elución. Aquí comenzamos nuestro análisis que diferencia la separación de pequeñas moléculas de la de grandes especies químicas. En realidad un pico de elución cromatográfico no es infinitamente fino sino que tiene un cierto ancho. El ensachamiento del pico obedece a un fenómeno llamado dispersión hidrodinámica. En canales de separación sin fase estacionaria donde un líquido vector transporta las especies que se pretenden separar, se presenta un fenómeno similar de dispersión hidrodinámica, pero a éste se le

suma un efecto de colisiones entre las partículas y un efecto de interacción hidrodinámica. Todo esto complica la tarea de separar, por ejemplo, células sanguíneas en continuo.

**Dispersión hidrodinámica (Dispersión de Taylor).** Ya hemos hablado del proceso de difusión browniana en el cual macromoléculas o partículas suspendidas en un líquido poseen un movimiento errático inducido únicamente por los innumerables choques de las moléculas del solvente en permanente agitación térmica. Se trata en este caso de la suspensión en reposo en un recipiente. ¿Qué pasará entonces, si la suspensión fluye en un canal, es decir, además del movimiento browniano las partículas en suspensión se encuentran en un campo de velocidades? La pregunta más concreta es: ¿cómo es el acoplamiento difusión-convección? El campo de velocidades de un fluido en movimiento bajo un gradiente de presión en un conducto de sección circular o rectangular es de tipo parabólico o “perfil de Poiseuille”. La característica es que la velocidad del líquido en las paredes del conducto es nula y dicha velocidad aumenta en forma parabólica hasta alcanzar la velocidad máxima en el centro del canal. La velocidad media en un canal de sección circular es la mitad de la velocidad máxima, mientras que la misma velocidad en un canal de sección rectangular es dos tercios de la velocidad máxima. Si en un separador inyectamos un pulso de suspensión (un pequeño volumen, por ejemplo, 25  $\mu\text{l}$  en un canal de volumen 500  $\mu\text{l}$ , pero de un espesor muy fino de 100  $\mu\text{m}$ ), las partículas tienden a seguir las líneas de corriente del flujo y así adoptar la forma del perfil de velocidades. Es evidente que este campo de velocidades crea inhomogeneidades transversales de concentración que van a generar un proceso de difusión cuya tendencia es de homogeneizar la zona, es decir, hacer que la concentración sea la misma en el espesor. La zona inicial que era muy angosta se ensancha y la distribución tenderá, al cabo de un tiempo, a adoptar una forma Gaussiana como lo indica la figura 2. El pico sufrirá entonces dos procesos, uno de difusión transversal al flujo, y un proceso de ensanchamiento axial producido por el perfil de velocidades. Este proceso conjunto es llamado “dispersión de Taylor”, descrito por primera vez por Charles Taylor, físico inglés, en los años 30. Este proceso es fundamental en separación, pues en función del ensanchamiento de la banda para diferentes especies, se podrán separar dos componentes de una mezcla.

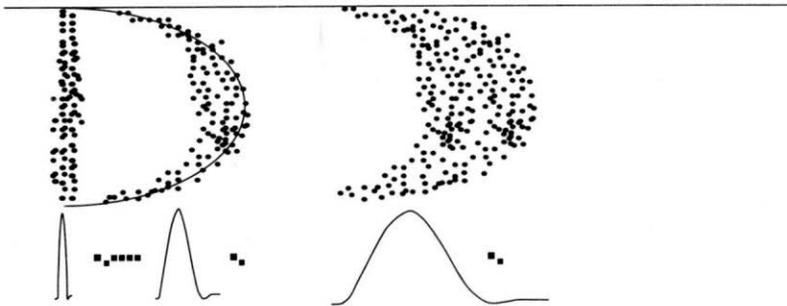


Figura 2. Dispersión de Taylor. Una nube de partículas ocupan un espacio angosto a la entrada del canal. El perfil de velocidades es parabólico. La nube de partículas se ensancha tendiendo a una concentración Gaussiana.

**Acoplamiento con un campo de fuerzas, técnica FFF.** Si las partículas o las macromoléculas tienen un coeficiente de difusión muy grande, es decir, que toda inhomogeneidad en concentración creada por el flujo parabólico es compensada rápidamente por la difusión, o en todo caso, rápidamente comparado con el tiempo característico del flujo, o si las especies están uniformemente distribuidas en el canal a la entrada, su velocidad va a coincidir con la velocidad media del flujo. En estas condiciones ninguna separación en función del coeficiente de difusión podrá hacerse puesto que todas las moléculas o partículas viajarán con la misma velocidad en el canal. La separación puede lograrse cuando un campo de fuerza transversal al flujo es aplicado. Se considera que la separación se realizará en un canal de tipo “Hele Shaw” es decir, una celda de sección transversal rectangular mucho más ancha y larga que gruesa. Las dimensiones típicas de canales existentes están comprendidas entre 1 y 4 cm de ancho, 5 y 100 cm de largo y 50 y 300  $\mu\text{m}$  de espesor. Aquí el tercer elemento de acoplamiento aparece y es el efecto convectivo del campo de fuerzas el cual puede ser centrífugo, eléctrico, magnético, etc., y que va a dirigir las especies hacia una de las paredes del canal llamada pared de acumulación, creando una inhomogeneidad transversal de concentración suplementaria. En este caso, será esa inhomogeneidad creada por el campo quien permitirá la separación. Cuando la fuerza termodinámica de difusión se equilibra con la fuerza convectiva del campo, un perfil de concentración de equilibrio, perfil de Boltzmann, se crea; es un perfil que decrece en forma exponencial a partir de la pared de acumulación. Una vez el equilibrio de sedimentación es alcanzado, la nube de partículas puede desplazarse a lo largo del canal a velocidad constante. La velocidad es función de la posición en el espesor del centro de gravedad de la nube. Aquí encontramos el acoplamiento con el perfil de velocidad: especies de tamaño diferente tienen coeficiente de difusión y velocidad de sedimentación diferente, por lo tanto, la distancia media a la pared de acumulación y la velocidad axial media van a ser diferentes, como lo indica la figura 3.

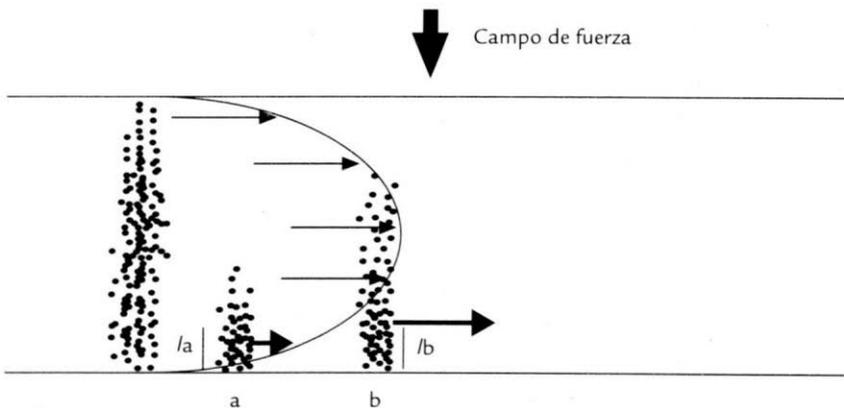


Figura 3. Esquema de la separación de especies brownianas en un canal de FFF. Las partículas a tiene un coeficiente de difusión menor que las especies b. El centro de gravedad de la nube b está más alejado de la pared de acumulación y debido al perfil de velocidad transitan más rápido en el canal que las partículas a.

La separación axial aparece entonces y las especies saldrán del canal en tiempos diferentes. El tiempo de residencia está ligado al coeficiente de difusión por medio de ciertas relaciones matemáticas simples que no serán enunciadas aquí. Esta técnica de separación es llamada *Field-Flow Fractionation*, FFF, que traduciremos como Fraccionamiento Campo-Flujo. La FFF es una familia de métodos analíticos de separación inventados por J. Calvin Giddings, Profesor de la Universidad de Utah, en los años 60 (Giddings, 1966). Los campos más utilizados son el gravitacional centrífugo o multigravitacional, el campo creado por un gradiente de temperatura que permite la determinación del coeficiente de difusión térmica y un campo hidráulico creado por un flujo transversal. Este método de separación es analítico ya que permite la identificación de especies como la cromatografía tradicional, inyectando una pequeña cantidad de soluto y observando a través de detectores ultravioleta los picos de retención. Vemos que este método no utiliza sino un canal sin fase estacionaria o sea que las especies, por grandes que sean, evidentemente dentro de los límites geométricos fijados por el separador, pasan sin ser degradadas. Dentro de la aplicaciones de la FFF podemos citar el análisis de contaminantes del agua, caracterizando las partículas coloidales que transportan microorganismos en los ríos (Contado *et al.*, 1997); el análisis de polímeros de masa molecular muy elevada (Martin *et al.*, 2002); el análisis de proteínas (Levin *et al.*, 1989); el análisis de macromoléculas del vino (Godoy, 2002).

**Caso del flujo de partículas no-brownianas.** La células están consideradas entre las especies no-brownianas a las cuales hacemos referencia aquí. Recordemos que los objetos no-brownianos son aquellos cuyo coeficiente de difusión es despreciable. ¿Qué entendemos por despreciable en este contexto? Miremos algunas magnitudes características: una molécula pequeña, por ejemplo la urea, (no es muy claro si se puede considerar a la molécula de urea como una molécula browniana, no podemos entrar en detalles por el momento), tiene un coeficiente de difusión alrededor de  $D \sim 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ , esto quiere decir que en un segundo, la molécula se desplaza de acuerdo con la ecuación (1) de una distancia  $l \sim 45 \text{ } \mu\text{m}$ ; para una proteína con un  $D \sim 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $l \sim 1.5 \text{ } \mu\text{m}$ ; para una partícula de látex de  $0.24 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $D \sim 2 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $l \sim 2 \text{ } \mu\text{m}$ ; finalmente, si calculamos  $D$  con la ecuación (2) para un glóbulo rojo tomando como diámetro medio  $5 \text{ } \mu\text{m}$ , obtenemos  $D \sim 5 \cdot 10^{-10}$ ,  $l \sim 0.3 \text{ } \mu\text{m}$  o sea de 1/15 de su propio diámetro. Esto quiere decir que, para ver desplazada una célula, gracias únicamente a su movimiento browniano, una distancia característica del diámetro de una pequeña arteria de  $200 \text{ } \mu\text{m}$ , se necesitan al rededor de 9 días. Esto implica un desplazamiento imperceptible a la escala de cualquier tiempo característico de separación. Las células no son por lo tanto consideradas como brownianas. Por consiguiente, la separación por medio de la técnica FFF no utiliza el mecanismo de difusión para separar dichas especies sino que utiliza otro principio hidrodinámico llamado mecanismo de focalización. Tenemos que señalar que este tipo de separaciones se realizan en flujos a bajo número de Reynolds. Este número sin dimensiones caracteriza los fluidos viscosos donde no existen flujos turbulentos. Los flujos viscosos son llamados laminares. El número de Reynolds está definido como:  $Re = \rho UL / \eta$ , donde  $\rho$  es la densidad del líquido,  $U$  la velocidad característica del líquido o de la partícula y  $L$  una dimensión característica del canal o de la partícula. El flujo es considerado como laminar cuando  $Re < 1$ . A la base de este mecanismo de focalización hidrodinámica se encuentra

un tipo muy particular de fuerza de origen hidrodinámico llamada fuerza de sustentación, más conocida como *lift force*. La fuerza de sustentación hidrodinámica a la que hacemos referencia es de origen inercial y es de naturaleza muy diferente de la fuerza de sustentación que hace volar los aviones. Ella actúa sobre partículas que se desplazan paralelamente en la vecindad de una pared. Así, una célula arrastrada por el flujo sanguíneo en una arteria, experimenta una fuerza que la repele de la pared; la célula seguirá una trayectoria que la conduce a una posición de equilibrio que se sitúa en un punto intermedio entre el centro del eje de la arteria y la pared. Este fenómeno es conocido en hemodinámica como efecto Fåhræus-Linqvist. El mecanismo de sustentación explica el por qué la sangre, siendo una suspensión concentrada, fluye tan fácilmente. Todos estos problemas que tienen que ver con el flujo sanguíneo son tratados por la rama de la mecánica de medios continuos llamada bioreología. La fuerza de sustentación  $F_S$ , es función del tamaño de la célula, de su distancia a la pared y de la velocidad media del flujo. La relación teórica, que necesita desarrollos matemáticos bastante elaborados (Ho y Leal, 1974, Vasseur y Cox, 1976), es la siguiente:  $F_S = d^4 \langle v \rangle^2 F(\delta) / w^2$ .  $F(\delta)$  es una función decreciente complicada de la distancia  $\delta$ , a la pared. La figura 3 muestra la trayectoria de una partícula de  $5 \mu\text{m}$  en un canal de FFF. La posición de equilibrio se ve claramente. En la figura se considera la partícula sin peso aparente. ¿Cómo se efectúa la separación? Pensemos en células que sedimentan en el canal y al mismo tiempo son llevadas por el flujo. La fuerza de sustentación se opone a la sedimentación y la partícula se equilibra en una posición en el espesor que depende de su tamaño como lo indica la ecuación (4), la sedimentación depende del tamaño al cuadrado. De esta forma, como la posición de equilibrio es diferente en el espesor para partículas diferentes, acoplada con el perfil de velocidad, la velocidad axial de cada especie es diferente y podrán ser separadas a lo largo del canal. La teoría de la fuerza de sustentación está bien establecida para una partícula rígida y esférica en un líquido viscoso, pero cuando se trata de una célula que no es esférica y además es deformable, no existe ninguna teoría que permita predecir la trayectoria análoga a la de la figura 4. Igualmente no existe teoría alguna que tenga en cuenta las fuerzas cuando se trata de una suspensión de partículas o de células en interacción. Los efectos hidrodinámicos colectivos los trataremos en la sección siguiente, consagrada a la separación en continuo de células y partículas.

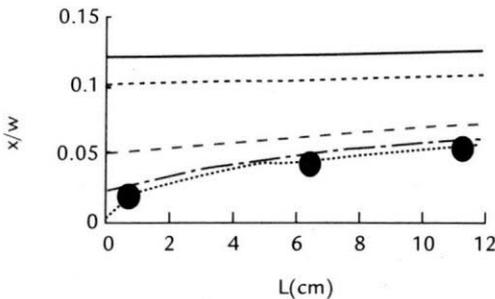


Figura 4. Trayectorias calculadas teóricamente de partículas que parten de diferentes posiciones en el espesor normalizado  $x/w$ , de un canal de FFF, provocadas por las fuerzas de sustentación.  $L$  es la longitud del canal. La partícula está a la escala de una partícula de  $10 \mu\text{m}$  en un canal de  $100 \mu\text{m}$ .

## SEPARACIÓN HODRODINÁMICA EN CONTINUO DE SUPERMOLÉCULAS, TÉCNICA SPLITT

Acabamos de ver en forma muy resumida la técnica de separación analítica FFF. Inspirados en dicha técnica, ¿cómo podríamos realizar en forma similar separaciones en continuo con el fin de preparar productos? Calvin Giddings siguiendo su misma visión de la separación de grandes especies químicas, propuso en los años 80 un método de separación en continuo que llamó *Split-flow Lateral Transport Thin Cell Fractionation*, SPLITT (Giddings, 1985). El separador es del mismo tipo que el de la FFF, es decir, un canal fino donde un flujo transporta axialmente una muestra. Igualmente, un campo de fuerza transversal actúa sobre las especies que componen la muestra. Pero con el fin de obtener un dispositivo que pueda trabajar en continuo, la celda posee dos entradas y dos salidas que permiten, gracias a un divisor de flujo tanto a la entrada como a la salida, inyectar de manera independiente y simultánea, el líquido vector y la muestra. En la figura 3 podemos observar un esquema del funcionamiento de este método de separación. Las suspensión de partículas o la solución de macromoléculas es inyectada por la entrada a' y el líquido vector por la entrada b'. La diferencia de los dos flujos lleva a una configuración tal que las partículas son obligadas a comenzar su migración axial en la vecindad de la pared del lado de la inyección. Una vez en el canal, la partículas comienzan a sedimentar en el espesor de la celda. Las partículas cuya velocidad de sedimentación es mayor, alcanzarán más fácilmente la salida marcada b, opuesta al punto de inyección. Con el fin de seleccionar adecuadamente la especie que deseamos evacuar por cada salida, debemos manipular en forma muy precisa los flujos. Así, si aspiramos líquido por la salida a con un caudal más grande que aquel con el que inyectamos la muestra en a', crearemos, como lo indica la figura, una zona virtual llamada zona de transporte, en la que las partículas que logren atravesar dicha zona antes de alcanzar el divisor de flujo de la salida, podrán ser evacuadas por la salida b. Este método de separación es de tipo binario ya que se tienen solo dos salidas. Así, si tenemos, por ejemplo, una muestra de células de tamaño diferente y deseamos eliminar las más grandes a partir de un cierto tamaño, se utiliza la relación matemática:

$$d_c = \{(Qa - Qa') / \Delta \rho g L B 18 \eta\}^{1/2} \quad (5)$$

Donde  $d_c$  es el diámetro hidrodinámico crítico a partir del cual las células serán colectadas por la salida b.  $B$  y  $L$  son respectivamente el ancho y el largo del canal. Por la evacuación a, saldrá la fracción compuesta de las células más pequeñas que el diámetro crítico. La técnica de SPLITT tiene una gran ventaja con respecto a las existentes ya que no utiliza membranas de filtración o de diálisis para efectuar la separación. La zona de transporte gobernada por los flujos juega el papel de una membrana y el espesor de la zona es análoga a la porosidad de una membrana virtual. Este método es eficientemente usado sobre todo en estudios relacionados con la contaminación (Contado *et al.*, 1997), mientras que en lo relacionado con separaciones de células, solo un dispositivo de tipo SPLITT que utiliza un campo magnético existe (Zborowski *et al.*, 1997, Hoyos *et al.*, 2002), aun cuando ciertas separaciones fueron logradas en un sistema de SPLITT gravitacional (Zhang *et al.*, 1994). El dispositivo de SPLITT magnético no es por el momento completamente operacional ya que las aplicaciones conllevan problemas hidrodinámicos suplementarios comparados con las aplicaciones al medio ambiente.

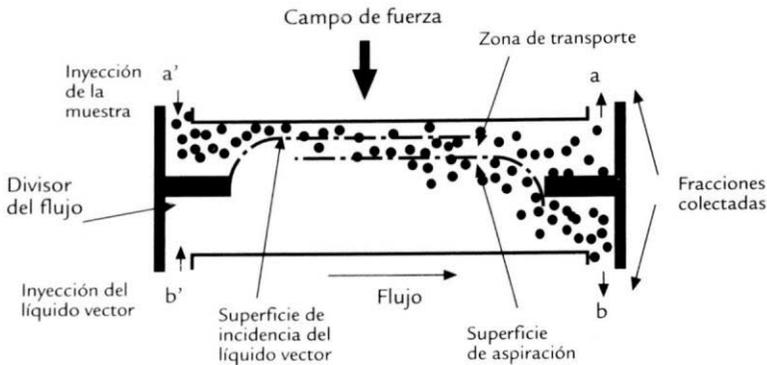


Figura 5. Esquema (escala no considerada) de la celda de SPLITT.

Tomando como ejemplo las separaciones magnéticas, podemos analizar la hidrodinámica que está implicada en el proceso de separación en continuo. La separación de células madres hematopoyéticas por medio de la técnica de SPLITT magnética, se realiza en un canal axi-simétrico compuesto por dos cilindros coaxiales. El campo magnético es aplicado de tal forma que las células magnetizadas son desviadas radialmente. Únicamente las células hematopoyéticas de la suspensión son marcadas con partículas superparamagnéticas gracias a una interacción específica antígeno-anticuerpo. En el separador, las células magnetizadas son desviadas hacia la salida opuesta a la inyección, mientras que las no marcadas no deben en principio ser desviadas. Las células hematopoyéticas pueden así ser aisladas y seleccionadas para ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. Este tipo de separación es llamada inmunomagnética. Dos efectos hidrodinámicos están implicados en este tipo de separación: la difusión inducida por el esfuerzo de corte y al arrastre o la tracción hidrodinámica. Los dos efectos son colectivos. Entendemos por colectivos, los efectos que implican muchas partículas en interacción. La difusión hidrodinámica inducida por el corte (Leighton y Acrivos, 1986 y 1987) está ligada al flujo de un grupo de partículas en un campo de velocidades. Las células cuando entran al canal son dirigidas por el líquido vector hacia una región vecina a una de las paredes donde las variaciones o gradientes de velocidad son importantes. Las partículas que se encuentran más lejos de la pared tendrán una velocidad más grande que las que son transportadas más cerca de la pared. Esta situación engendra choques o interacciones hidrodinámicas entre partículas generando desplazamientos perpendiculares a la dirección del flujo. Este transporte transversal es puramente hidrodinámico y es independiente del campo de fuerza aplicado. La consecuencia de esta migración no específica es que las especies que no están afectadas por el campo, pueden contaminar las fracciones que nos interesan. La migración es difusiva pero completamente diferente de una difusión browniana, y está caracterizada por un coeficiente específico a este tipo de difusión. Este efecto, ya conocido en mecánica de suspensiones, aplicado a la separación, es un tema de investigación actual (Hoyos *et al.*, 2004). El último efecto al cual haremos referencia es el de arrastre o tracción hidrodinámica. Este efecto está ligado al concepto que ya hemos mencionado: la "interacción hidrodinámica".

ca". Una partícula que se desplaza en un líquido crea una perturbación cuya magnitud decrece con la distancia. La atenuación de la perturbación es lenta y cuando otra partícula se encuentra al alcance de dicha perturbación, la velocidad de las dos es modificada. Esta interacción vehiculada por el líquido está bien determinada por las leyes de la hidrodinámica. Un ejemplo lo observamos fácilmente cuando vemos que dos partículas vecinas sedimentan en un líquido a una velocidad que es mayor que la de una partícula aislada. Volviendo a nuestro caso de separación inmunomagnética, las interacciones hidrodinámicas de arrastre hacen que la separación se dificulte ya que cuando las células magnetizadas son desviadas por el campo magnético, arrastran las no magnetizadas. El arrastre no es completo y por eso la manipulación de flujos tiene que hacerse en forma muy sutil. Los dos efectos son difíciles de controlar; otros dispositivos están siendo estudiados con ese fin y un dispositivo de focalización hidrodinámica está siendo desarrollado (Hoyos *et al.*, 2004). Debemos señalar para terminar, que en el caso de la separación y filtración de células sanguíneas, la sangre total es un medio complejo donde proteínas y células de varias clases cohabitan. El gran desafío consiste en poder extraer la clase de proteína o de célula de una muestra, sin necesidad de tratamiento previo, sin flitros y sin modificar las concentraciones toleradas.

## CONCLUSIONES

Los conceptos tratados en esta revisión, son bastante conocidos por los físicos y fisicoquímicos dedicados a la mecánica de fluidos. Lo nuevo es el uso de dichos conceptos por parte de la comunidad de ciencias separativas. La multiplicación de técnicas de separación y de caracterización de especies químicas hace que esta rama no sea más la exclusividad de la química analítica. Una rama multidisciplinaria aparece donde la colaboración de químicos, biólogos, físicos e ingenieros debe hacerse en forma útil y eficaz. Se hizo incapié en el papel que juega la mecánica de fluidos cuando se trata de la separación de grandes especies químicas y en particular de células. Las necesidades son inmensas en materia de fraccionamiento y purificación. Las técnicas presentadas, la FFF y la SPLITT, son particularmente adaptadas para la separación de dichas especies. Hay que mencionar los avances de la micro y nano tecnologías en materia de separación gracias al desarrollo de la microfluídica y los MEMS (*Micro ElectroMechanical Systems*), tema que abordaremos en una publicación futura.

## AGRADECIMIENTOS

A Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles y a la DIB, Universidad Nacional de Colombia por el apoyo como Profesor Visitante a Mauricio Hoyos, julio de 2003.

## BIBLIOGRAFÍA

CONTADO, C., DONDI, F., BECKETT, R., GIDDINGS, J. C. 1997. Separation of Particulate Environmental Samples by SPLITT Fractionation Using Different Operating Modes. *Anal. Chem.* 345 (99-110).

- GARCÍA A. A., BONEN M. R., RAMÍREZ-VICK J., SADAKA M., VUPPU A. 1999. *Bioseparation Science*. Blackwell Science.
- GIDDINGS J. C. 1966. New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities *Sep. Science*, vol.1 (1) (123-125).
- \_\_\_\_\_. 1985. A System Based on Split-Flow Lateral-Transport (SPLITT) Separation Cells for Rapid and Continuous Particle Fractionation. *Sep. Sci. Technol.* vol. 20 (749-768).
- GODOY J. A. 2002. Fraccionamiento Campo-Flujo por filtración de polisacáridos, Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- HO P., LEAL G. 1974. Inertial Migration of Rigid Spheres in Two-Dimensional Unidirectional Flows. *J. Fluid Mech.* 65 (365-400).
- HOYOS M., MC CLOSKEY K., MOORE L., NAKAMURA M., BOWELL B., CHALMERS J., ZBOROWSKI M. 2002. Pulse Injection Studies of Blood Progenitor Cells in Quadrupole Magnetic Flow Sorter. *Sep. Sci. Technol.* 37 (4) (745-767).
- \_\_\_\_\_, KUROWSKI P., SALHI D., MOORE L., MILIRON S., ZBOROWSKI M. 2004. Characterization of the Non-Specific Crossover in SPLITT Fractionation. Aceptado en *J. Chromatography A*.
- LEIGHTON D., ACRIVOS A. 1986. Viscous Resuspension. *Chem. Eng. Sci.* 41 (6) (1377-1384).
- \_\_\_\_\_, ACRIVOS A. 1987. The Shear-Induced Migration of Particles in Concentrated Suspensions. *J. Fluid Mech.* 181 (415-439).
- LEVIN S., MYERS M., GIDDINGS J. C. 1989. Continuous Separation of Proteins in Electrical Split-Flow Thin (SPLITT) Cell with Equilibrium Operation. *Sep. Sc. Tech.*, vol.24 (14) (1245-1259).
- MARTIN M., VAN BATTEN C., HOYOS M. 2002. Determination of Thermodiffusion Parameters from Thermal Field-Flow Fractionation Retention Data. *Lecture Notes in Physics*, Springer-Verlag, W. Köler and Wiegand (eds.): LNP 584 (250-284).
- RECKTENWALD D., RADBRUCH A. (eds.) 1998. *Cell Separation Methods and Applications*. Marcel Dekker.
- SALHI D., HOYOS M., KUROWSKI P. 2004. Séparation de particules microniques par focalisation hydrodynamique. Aceptado en la *Revue de Mécanique Appliquée*.
- VASSEUR P., COX G. 1976. The Lateral Migration of a Spherical Particle in Two Dimensional Shear Flow, *J. Fluid Mech.* 78 (385-413).
- ZBOROWSKI M., WILLIAMS P. S., SUN L., MOORE L., CHALMERS J. J. 1997. Cylindrical SPLITT and Quadrupole Magnetic Field in Application to Continuous-Flow Magnetic Cell Sorting. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology*, 20 (2887-2905).
- ZHANG U., WILLIAMS S., MYERS M., GIDDINGS J. C. 1994. Separation of Cells and Cell-Sized Particles by Continuous SPLITT Fractionation Using Hydrodynamic Lift Forces, *Sep. Sci. Technol.* 29(18) (2493-2522).