

# Capítulo 1

## Introducción

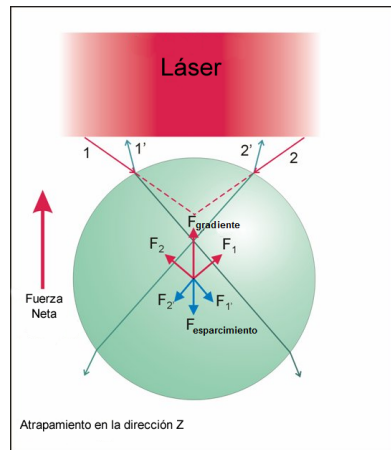
Las herramientas para manipular partículas de tamaños nanométricos y micrométricos se han vuelto de suma importancia para diferentes disciplinas dentro de la ciencia como lo son la biología, medicina, coloides entre otros. Estos métodos han permitido el desarrollo de nuevas áreas de investigación que tarde o temprano traen grandes beneficios a la sociedad. Como ejemplo tenemos el estudio de los motores biológicos. Las proteínas motoras como la *miosina* tienen la habilidad de trasladarse a lo largo de filamentos proteicos (*filamentos de actina*). A pesar de que se sabe que este movimiento es alimentado por el ATP, el entendimiento de cómo sucede esto aún es un reto. Algunos científicos han propuesto modelos teóricos que explicarían este tipo de movimiento por un proceso de rectificación[1].

Se han aplicado desde hace tiempo diversos mecanismos para separar, ordenar, transportar y atrapar partículas en los campos antes mencionados, incluyendo *pinzas ópticas*, *electroforesis*, *dielectroforesis*, *pinzas magnéticas*, *fuerzas acústicas e hidrodinámicas*[2], sin embargo, existe un interés especial por desarrollar dispositivos capaces de manipular y separar partículas de una manera eficiente y económica, pues actualmente no existen dispositivos que tengan ambas características. En las siguientes secciones se presentan algunos de los diferentes métodos existentes.

## 1.1. Manipulación de Partículas

### 1.1.1. Pinzas Ópticas

En 1986 Arthur Ashkin [3], científico de los laboratorios Bell, descubrió que cuando se hace incidir un haz de luz coherente altamente enfocado sobre una partícula dieléctrica transparente, éste era capaz de atraparla y a partir de esto dicho objeto se podía mover a voluntad en cualquier dirección. Él decidió llamar a este dispositivo *pinzas ópticas*. Desde entonces, las pinzas ópticas han sido utilizadas alrededor del globo en experimentos de todo tipo, ya que los componentes necesarios son comunes y el sistema es relativamente fácil de armar.



**Figura 1.1:** Fuerzas actuando sobre una partícula dieléctrica

Algunas de las aplicaciones que se encuentran dentro de la biología son el estudio de movilidad de los espermias, las *tijeras ópticas* con las cuales se pueden hacer disecciones microscópicas en cromosomas entre otras. Este método de manipulación se basa en la transferencia del momento lineal de la luz.

Cuando hacemos incidir un haz de luz enfocado sobre una partícula, dos fuerzas se ejercen sobre ella. La primera se deriva de la *presión de radiación* y se conoce como

*fuerza de esparcimiento*, la cual empuja a la partícula en la dirección de propagación del haz. La segunda es la *fuerza de gradiente*, la cual atrae a la partícula en la dirección de la mayor intensidad del gradiente. Para lograr que la partícula quede confinada en la región de atrapamiento, es necesario que la fuerza de gradiente supere a la fuerza de esparcimiento. Típicamente esto se logra a través de enfocar el láser con un objetivo de microscopio de apertura numérica alta ( $N.A. \gtrsim 1$ ). Si la partícula se aleja del foco, la fuerza de gradiente la obligará a regresar ya que la resultante de la fuerza será en la dirección del foco (Figura 1.1). La fuerza de la trampa óptica puede ser expresada como [2]

$$F = Q \frac{nP}{c} \quad (1.1)$$

donde  $c/n$  es la velocidad de la luz en el medio,  $P$  es la potencia óptica y  $Q$  es la eficiencia de la trampa. La eficiencia  $Q$  es un factor adimensional que describe la fracción del momento lineal transferido a la partícula desde el láser. Valores típicos de  $F$  están en el rango de  $0,1 - 100pN$ , dependiendo de la potencia y la configuración experimental.

La principal ventaja de las pinzas ópticas es su gran precisión, sin embargo existen varias limitaciones. La primera es que puede causar un daño irreversible en sistemas biológicos si la longitud de onda de la luz es absorbida por el sistema, ya que la intensidad en el foco puede ser tan alta como  $MW/mm^2$ . Además si se quieren atrapar varias partículas a la vez, la potencia requerida es proporcional al número de partículas a atrapar, requiriendo una gran intensidad. La segunda es que el área efectiva de manipulación es muy limitada ya que si por ejemplo se utiliza un objetivo de microscopio de 100 X, el área efectiva es menor que  $100 \times 100 \mu m^2$ .

### 1.1.2. Fuerzas Magnéticas

Esta forma de manipulación de partículas es especialmente usada en células biológicas ya que los posibles daños sobre ellas son casi nulos, permitiendo el estudio de diversos procesos sin verse dañados. Esta técnica se basa en la utilización de esferas microscópicas de polímeros las cuales contienen nanopartículas supermagnéticas. Posteriormente las esferas se recubren con anticuerpos, péptidos o lectinas específicas para el tipo de célula que se interesa manipular. Por último, sólo queda aplicar un campo magnético y sólo aquellas células que contienen a las esferas supermagnéticas serán atraídas por el campo.

La fuerza ejercida por el campo magnético es[4]

$$F = m \cdot \nabla B \quad (1.2)$$

donde  $m$  es el momento magnético y  $B$  es el flujo magnético. Para una partícula súper magnética, el momento magnético esta dado por

$$m = V\chi B/\mu_0 \quad (1.3)$$

donde  $V$  es el volumen de la partícula magnética,  $\chi$  es la susceptibilidad de la partícula y  $\mu_0$  es la permeabilidad del vacío.

El problema con esta técnica radica en la dificultad de crear un tipo específico de *bio-marcadores* para cada tipo de célula. Además al estar agregando un agente externo a la célula, las propiedades intrínsecas pueden afectarse y no permite observar las reacciones “normales” que tendría dicha célula.

### 1.1.3. Fuerzas Electromecánicas

Las técnicas que usan fuerzas electromecánicas son las más comunes en la manipulación de partículas ya que son relativamente fáciles de fabricar gracias a los grandes

avances en las técnicas de micromaquinado y litografía. Existen dos formas principales de fuerzas electromecánicas: *electroforesis* y *dielectroforesis*.

La primera se refiere a la manipulación de partículas con carga neta  $q \neq 0$  con la aplicación de un campo eléctrico DC [4]. La fuerza que sentirán las partículas esta dada por la *Ley de Coulomb*

$$F = qE \quad (1.4)$$

donde  $q$  es la carga neta de la partícula y  $E$  es el campo eléctrico.

Dielectroforesis (DEP por sus siglas en inglés) es la manipulación de partículas sin carga neta ( $q = 0$ ) usando un campo eléctrico AC, el cual induce a la vez un dipolo eléctrico en la partícula[5]. La magnitud de la fuerza ejercida sobre la partícula es proporcional al volumen de ella y al gradiente del cuadrado de la intensidad del campo eléctrico ( $\nabla E_0^2$ ).

La principal ventaja de estos dos métodos como ya se mencionó anteriormente es la facilidad de fabricar dispositivos con formas complejas para generar la distribución de campo eléctrico deseado; además estos dispositivos pueden ser tan pequeños como unos cuantos  $mm^2$  permitiendo la creación de los dispositivos llamados *lab-on-a-chip*. Sin embargo como en todos los casos anteriores también existen desventajas. La principal es que es muy difícil manipular partículas individualmente.

## 1.2. Separación de Partículas

### 1.2.1. Centrifugación

En este método de separación se utilizan unas máquinas llamados *centrifugadoras*. Su funcionamiento se basa en someter la muestra a una velocidad angular extremadamente alta lo cual ocasiona la separación de los diferentes compuestos de la muestra

debido a sus diferencias en tamaño y densidad.

Cuando se le aplica una fuerza a una partícula, esta acelerará hasta alcanzar su velocidad terminal  $v_{term}$  que es cuando la fuerza aplicada es igualada por una fuerza de arrastre. Para partículas de tamaño pequeño para las cuales el *número de Reynolds* es bajo, la fuerza de arrastre varía linealmente con la velocidad terminal, es decir,  $F_{drag} = -bv$ , donde  $b$  es la constante de arrastre que depende solamente de las propiedades de la partícula y del fluido que la rodea y está definida según la ley de Stokes como [6]  $b = 6\pi\eta r$ , donde  $\eta$  es la viscosidad del fluido donde se mueve la partícula y  $r$  es el radio de la partícula. Cuando el movimiento de las partículas está limitado por una barrera sólida (el contenedor), las partículas comienzan a conglomerarse formando un sedimento. Esta sedimentación está descrita por la ecuación de Lamm[7]

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[ \left( \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} \right) + \frac{1}{r} \left( \frac{\partial c}{\partial r} \right) \right] - s\omega^2 \left[ r \left( \frac{\partial c}{\partial r} \right) + 2c \right] \quad (1.5)$$

donde  $c$  es la concentración del soluto,  $t$  y  $r$  son el tiempo y el radio de la partícula, los parámetros  $D$ ,  $s$ , y  $\omega$  representan la difusión del soluto, el coeficiente de sedimentación y la velocidad angular del rotor respectivamente.

Una vez que se ha completado el proceso de sedimentación, las muestras deseadas pueden ser separadas mecánicamente del resto. Las claras ventajas de este proceso son la sencillez del proceso y el gran volumen que puede ser procesado en corto tiempo. Sin embargo, un serio inconveniente de la centrifugación son los posibles daños que se pueden causar debido a las presiones tan intensas que se producen. Otra desventaja es que el método se basa en diferencias de tamaño o de densidad entre los componentes. Si estas diferencias son muy pequeñas, la separación será muy difícil. Por último, las centrifugadoras por lo regular son voluminosas, descartando este método como una forma para un dispositivo del tipo *lab-on-a-chip*.

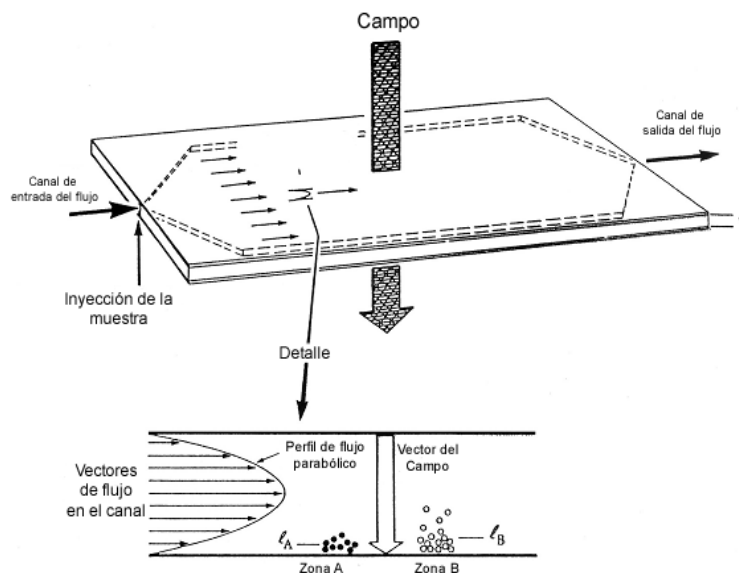
### 1.2.2. Activación Magnética

Este método también llamado *MACS* (Magnetic Activated Cell Sorting) fue patentado en 1976 por Iar Giaever y es propiedad de Miltenyi Biotec. Como ya se explicó en la Sección 1.1.2, la idea básica detrás de este método es la adición de anticuerpos específicos con nanopartículas supermagnéticas para después aplicar un campo magnético y separar las células deseadas. Este método se beneficia de un volumen extremadamente alto de salida, capaces de producir hasta 10 millones de células por segundo. Sin embargo, la mayor desventaja es la necesidad de desarrollar un recubrimiento específico para cada tipo de célula además de un proceso posterior para retirar dichos recubrimientos.

### 1.2.3. Fraccionamiento de Campo-Flujo

El fraccionamiento de campo-flujo es una técnica de separación en la cual se aplica un campo perpendicular al flujo de la mezcla. Este campo ocasiona que se separe la mezcla debido a las diferencias de movilidades de los diferentes componentes en ella. El campo aplicado puede ser gravitacional, centrífugo, magnético, eléctrico, térmico o flujo de fluidos perpendiculares al flujo de la mezcla.

La mayor parte de la separación se debe a diferencias en el movimiento Browniano y difusión de los componentes una vez que se ha aplicado el campo. Para cada componente existirá una región en la cual la fuerza aplicada proveniente del campo y la fuerza de arrastre junto con la difusión se compensen. Esto ocasiona que cada tipo de partículas se mueva en una región diferente del flujo, i.e., a diferente altura. Por ejemplo, imaginemos un flujo de agua con partículas cargadas de diferentes tamaños (Figura 1.2). Si aplicamos un campo eléctrico perpendicular al flujo, se ejercerá una fuerza sobre las partículas y se desplazarán en dirección perpendicular al flujo de agua hasta que esta fuerza se compense con la fuerza de arrastre. Como existe un perfil parabólico de velocidades, las



**Figura 1.2:** Esquema del método de separación por fraccionamiento de Campo-Flujo

partículas que se encuentran más cercanas al centro del canal se moverán más rápido que las que se encuentran cerca de los bordes. Es así como se logra la separación.

La principal ventaja de este método es que se basa en las propiedades intrínseca de las partículas y no requiere de agentes externos como en el MACS. La principal desventaja es que no es un proceso continuo.

#### 1.2.4. Citometría de Flujo

También conocida como *FACS* (Fluorescence Activated Cell Sorting), el método de citometría de flujo fue desarrollado por Leonard Herzenberg de la Universidad de Stanford en 1972. El método consiste en el análisis individual de cada partícula analizando su fluorescencia con la ayuda de luz láser y diversos sensores. Primero, el fluido que contiene los diferentes tipos de partículas se hace pasar por un conducto estrecho y posteriormente se rompe el fluido con la ayuda de vibraciones de tal forma que en cada gota resultante exista sólo un partícula. Luego la gota es analizada según la fluo-



rescencia de la partícula contenida y se le coloca una carga la cual depende de que tipo de partícula sea. Finalmente se le aplica un campo eléctrico calibrado para que cada gota sea desviada según su carga a un contenedor diferente. Este sistema es capaz de procesar hasta 25,000 células por segundo pero igual que en el método descrito en la Sección 1.1.2 se necesita desarrollar un compuesto distinto para cada tipo de célula o partícula. Además estos sistemas son tan complejos que requieren de operadores altamente entrenados y los equipos llegan a costar más de £200,000.[8]

En los siguientes capítulos, el trabajo se enfoca sobre todo en el uso de la fuerza dielectroforética para la manipulación de las micropartículas. En el capítulo 2 se expondrá de una forma breve la teoría básica para la comprensión de este fenómeno con la finalidad de poder aplicar sus principios en un dispositivo experimental capaz de rectificar el movimiento Browniano. La intención del dispositivo es sentar las bases para el desarrollo de un método que pueda separar micropartículas de diferentes tamaños utilizando sólo los elementos presentados en esta tesis.