

OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE SEPARACIÓN EN MUESTRAS DE INTERÉS  
BIOTECNOLÓGICO EN MICRODISPOSITIVOS

ALAIN MARTIN MAYOR

Director de Tesis:

M. MOUNIR BOU ALI



Tesis dirigida a la obtención del título de

Doctor por Mondragon Unibertsitatea

Departamento de Mecánica y Producción Industrial

Mondragon Unibertsitatea

Noviembre 2012



# AGRADECIMIENTOS

Antes de nada, me gustaría disculparme de los que seguro me olvidaré en estos agradecimientos y han ayudado en la elaboración de esta tesis doctoral, espero sepáis disculparme.

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a la persona sin la cual esta tesis doctoral no se hubiera llevado a cabo. No sé cómo agradecerle el haberme impulsado a realizar esta tesis doctoral, el haber creído en mí desde el primer momento y el haberme dedicado tanto tiempo y esfuerzo. Mi más sincero agradecimiento, Mounir.

Además, agradezco infinitamente el apoyo, comprensión y cariño que me ha dado desde incluso antes de comenzar esta tesis y a la que considero persona más importante de mi vida, Idoia. Millesker Bihotz-Bihotzetik.

Así mismo, me gustaría agradecer especialmente a mis padres, por haberme enseñado los valores de la vida y a ser mejor persona, y abrirme el camino para haber llegado hasta aquí. Por ello, me siento profundamente afortunado. También agradezco, tanto a mi hermano, como a mi cuñada el apoyo moral y afectuoso que me han dado, así como a mi cuñado y suegros.

Es imposible olvidarme en estos agradecimientos de David, compañero de trabajo que tanto me ha ayudado todos estos años y con el que tanto tiempo he pasado. Muchas gracias por tu compañerismo, honradez y por ser tan buena persona. También me gustaría agradecer a Aitziber, Estela, Andoni, Jon y Veci, el tiempo y esfuerzo dedicados en esta tesis, sin los cuales hubiera sido mucho más complicada su finalización.

A los demás doctorandos también tengo mucho que agradecer, por la ayuda que me han dado, tanto para solucionar problemas de todo tipo, así como por los buenos momentos que hemos pasado juntos, Jokin, Haritz, Joanes, David, Trini, Ione, Alaitz, Kintana, Nuria, Nagore, Ainara, Tena, Christian, Pitzo, Luis, etc.

Gracias a Endika y Patxi, por el tiempo dedicado en el diseño y construcción de dispositivos, así como a los del taller de mecanizado, sin los cuales hubiera sido inviable esta tesis.

Me gustaría agradecer enormemente, el compañerismo y la cercanía que me han mostrado todos y cada uno del departamento de mecánica de fluidos y la inestimable ayuda que me han brindado, Karmele, Mounir, Haritz, Peru, Marije, Tutar, Zarrabe, Joshe, Pedro, Manex y Josemi, así como Joanes, Miren, David, Torrano, Estela, Jon, Veci, Iker, Izaro, Elias, Aitziber y Andoni.

Así mismo, también me gustaría agradecer a las personas ajenas a MGEP con las cuales he tenido la oportunidad de trabajar en diferentes proyectos nacionales como internacionales; grupo de Jülich, grupo de CSIC, grupo de Ikerlan y grupo del Hospital de Elche.

Antes de finalizar, me gustaría realizar una mención especial a los Zubipetarrak, gracias a los cuales me he podido desconectar en los momentos más difíciles.





## RESUMEN

El trabajo de esta tesis doctoral, se ha centrado en el análisis numérico, experimental sobre la optimización de los procesos de separación en fluidos de interés micro-nano-biotecnológico. En concreto, se han determinado las propiedades termofísicas y de transporte en mezclas biológicas y nanofluídicas. Los resultados obtenidos han sido utilizados para optimizar el proceso de separación hacia la aplicación de la extracción del DMSO utilizado como crioprotector de células previamente criogenizadas, mediante la aplicación de gradientes de temperatura. Por otro lado, se ha desarrollado un microdispositivo para la extracción selectiva, mediante la tecnología ultrasónica de células tumorales circundantes en sangre periférica. El análisis numérico ha permitido identificar los parámetros geométricos y las condiciones de contorno idóneas para lograr una eficiencia de separación apta para la aplicación clínica. Finalmente, se ha diseñado, construido y validado una nueva instalación termogravitacional formada por una microcolumna con el fin de analizar fluidos biológicos. El sistema de análisis elaborado para determinar las propiedades de transporte en la nueva microcolumna, ha sido puramente óptico.



## LABURPENA

Doktoretza tesi honetan aurrera eramandako lana, interes mikro-nano-bioteknologikoa duten fluidoen banaketa prozesuaren analisi numeriko eta esperimentalean oinarritu da. Zehatzago azalduz, nahaste biologiko eta nanofluidikoen ezaugarri termofisikoak eta garraiarritasuna zehaztu dira. Ikerketa honetatik lortutako emaitzak, aldez aurretik kriogenizatutako zelulen krioprotektore moduan erabilitako DMSOaren erauzketari dagokion banaketa prozesuaren optimizaziorako erabili dira, temperatura gradientek aplikatuz. Bestalde, teknologia ultrasonikoaz baliatuz, odol periferikoko zelula tumoral zirkundateen erauzketa selektiborako mikrodispositibo bat garatu da. Analisi numerikoaren bitartez, aplikazio klinikorako egokia den banaketa eraginkorra lortzeko parametro geometriko eta inguruneko baldintza aproposak identifikatu dira. Azkenik, mikrokolumna batez osatutako instalazio termograbitazional berri bat diseinatu, eraiki eta balioztatu da fluido biologikoak aztertzeko helburuarekin. Mikrokolumnan berriaz garraiarritasuna propietateak zehazteko sortutako analisi sistema, guztiz optikoa izan da.



## **ABSTRACT**

The work of this doctoral thesis, has focused on the numerical, experimental analysis of the separation processes optimization in micro-nano-biotechnology interest fluids. Specifically, we have determined the thermophysical and transport properties of biological and nanofluidic mixtures. The results obtained have been used to optimize the separation process for extraction application of the DMSO employed as cryoprotectant from previously cryopreserved cells through the application of temperature gradients. On the other hand, a microdevice for selective extraction of peripheral blood surrounding tumor cells by means of ultrasonic technology it has developed. Using numerical analysis, the geometric parameters and the ideal boundary conditions to achieve a separation efficiency suitable for clinical application have been identified. Finally, we have designed, built and validated a new termogravitacional installation formed by a microcolumn with the aim of analyzing biological fluids. The analysis system developed, to determine the transport properties in the new microcolumn, has been purely optic.



# INDICE

LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABLAS .....	XVII
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1.-PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE EN FLUIDOS .....	7
1.2.-COMPORTAMIENTO HIDRODINÁMICO EN MICRODISPOSITIVOS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.....	8
1.3.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	9
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE EN MUESTRAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.....</b>	<b>17</b>
3.1.-TÉCNICA TERMOGRAVITACIONAL.....	22
3.1.1.- Procedimiento experimental .....	25
<i>Preparación de muestras.....</i>	25
<i>Obtención de las propiedades termofísicas.....</i>	26
<i>Obtención del coeficiente de termodifusión.....</i>	27
<i>Obtención del coeficiente de difusión molecular .....</i>	28
3.2.-RESULTADOS.....	29
3.2.1.- DMSO-Glucosa y DMSO-Sacarosa.....	29
3.2.2.- DMSO-PBS.....	31
3.2.3.- Tolueno-Fullereno C <sub>60</sub> .....	32
3.3.-OBSERVACIONES.....	34
3.4.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
<b>4. DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA MICROCOLUMNA TERMOGRAVITACIONAL .....</b>	<b>45</b>
4.1.-DISPOSITIVOS DE ANÁLISIS DE TERMODIFUSIÓN MEDIANTE SISTEMAS ÓPTICOS.....	46
4.1.1.- Deflexión de rayo láser (BD) .....	46
4.1.2.- Thermal diffusion forced Rayleigh scattering (TDFRS) .....	48
4.1.3.- Seguimiento de los coloides por fluorescencia .....	49
4.1.4.- Termofóresis a micro escala (MST) .....	50
4.2.-MICROCOLUMNA TERMOGRAVITACIONAL (μCT).....	50
4.3.-RELACIÓN DE ASPECTO .....	51

4.4.-DISEÑO DE LA $\mu$ CT .....	52
4.4.1.- Elección del material .....	52
4.4.2.- Descripción de los componentes de construcción.....	53
<i>Gap</i> .....	53
<i>Ventana de medición</i> .....	54
<i>Elemento de sellado</i> .....	54
<i>Tapa exterior</i> .....	55
<i>Montaje completo</i> .....	55
4.5.-DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS DIMENSIONES DEL GAP .....	56
4.6.-VALIDACIÓN NUMÉRICA .....	58
4.6.1.- Resultados numéricos .....	58
4.7.-VALIDACIÓN DE LA MICROCOLUMNA (EN JÜLICH).....	61
4.7.1.- Ecuaciones de trabajo .....	62
<i>Determinación del cambio de fase</i> .....	62
<i>Determinación del cambio de concentración</i> .....	63
4.7.2.- Resultados experimentales en Jülich.....	64
4.8.-CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE MEDICIÓN ÓPTICO EN MGEP .....	67
4.8.1.- Construcción del sistema óptico .....	68
4.9.-VALIDACIÓN DE LA NUEVA INSTALACIÓN TERMOGRAVITACIONAL EN MGEP.....	70
4.9.1.- Sistema de aplicación del gradiente térmico.....	71
4.9.2.- Estudio térmico .....	72
4.9.3.- Procedimiento experimental .....	74
4.9.4.- Resultados experimentales en MGEP .....	78
4.10.- CONCLUSIONES.....	79
4.11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
<b>5. DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA MICROCÉLULA DE SEPARACIÓN .....</b>	<b>87</b>
5.1.-MODELO NUMÉRICO.....	89
5.1.1.- Validación del modelo numérico.....	90
5.2.-DISPOSITIVO EXPERIMENTAL .....	92
5.2.1.- El dispositivo .....	92
5.2.2.- Control de flujo .....	93
5.3.-VALIDACIÓN NUMÉRICA Y EXPERIMENTAL DEL DISPOSITIVO .....	94
5.4.-RESULTADOS EXPERIMENTALES .....	96
5.5.-CONCLUSIONES .....	100
5.6.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103



<b>6. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO HIDRODINÁMICO SOBRE LA SEPARACIÓN SELECTIVA DE CÉLULAS TUMORALES .....</b>	<b>109</b>
6.1.-DESCRIPCIÓN DEL MICRODISPOSITIVO .....	111
6.2.-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	113
6.2.1.- Ensayos con el chip de separación selectiva .....	113
6.3.-PROPIEDADES TERMOFÍSICAS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CELULARES .....	119
6.4.-ESTUDIO NUMÉRICO .....	119
6.4.1.- Análisis hidrodinámico de la geometría.....	119
<i>Entrada al canal de separación .....</i>	<i>120</i>
<i>Salida del canal de separación.....</i>	<i>123</i>
6.5.-NUEVO CHIP CON GEOMETRÍA OPTIMIZADA .....	124
6.5.1.- Estudio inercial de las muestras .....	125
<i>Análisis del efecto de las fuerzas inerciales sobre el nuevo chip.....</i>	<i>127</i>
6.5.2.- Estudio numérico - experimental de las fuerzas hidrodinámicas con la geometría optimizada del microdispositivo .....	129
<i>Partículas de 6 micras .....</i>	<i>131</i>
<i>Partículas de 20 micras .....</i>	<i>135</i>
<i>Condiciones de trabajo optimizadas con el nuevo chip .....</i>	<i>137</i>
6.6.-CONCLUSIONES .....	139
6.7.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	141
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>147</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>153</b>



# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: EVOLUCIÓN DE LA ESPERANZA DE VIDA EN ESPAÑA A DISTINTAS EDADES (1900-1998).....	3
FIGURA 1.2: INVERSIÓN REALIZADA POR CADA PAÍS EN BIOTECNOLOGÍA (2010) [5]. .....	4
FIGURA 1.3: EJEMPLO DE UN LAB-ON-CHIP INTEGRADO DONDE SE APRECIAN LAS DIFERENTES PARTES.5	
FIGURA 1.4: EVOLUCIÓN DE LA ESPERANZA DE VIDA FRENTE A LOS DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER [12]. .....	6
FIGURA 3.1: DIFERENTES TIPOS DE FULLERENOS. A) C <sub>60</sub> , B) C <sub>70</sub> , C) C <sub>540</sub> Y D) NANOTUBO. ....	21
FIGURA 3.2: ANÁLISIS ESPECTRAL DEL C <sub>60</sub> DISUELTO EN TOLUENO, THF Y AGUA [68]. .....	22
FIGURA 3.3: FLUJOS CARACTERÍSTICOS DEL EFECTO TERMOGRAVITACIONAL. ....	23
FIGURA 3.4: INSTALACIÓN TERMOGRAVITACIONAL.....	24
FIGURA 3.5: BALANZA DE PRECISIÓN GRAM VXI-310. ....	26
FIGURA 3.6. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE EXPANSIÓN A) MÁSICA Y B) TÉRMICA PARA LA MEZCLA DMSO-PBS A UNA FRACCIÓN MÁSICA DE DMSO DEL 10% Y T = 25°C.....	26
FIGURA 3.7: DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES PARA DETERMINAR LAS PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE. A) DENSÍMETRO ANTON PAAR DMA 5000. B) MICROVISCOSÍMETRO DE CAÍDA DE BOLA ANTON PAAR AMVN. C) VISCOSÍMETRO DE CAÍDA DE BOLA HAAKE. ....	27
FIGURA 3.8: VARIACIÓN DE LA DENSIDAD EN FUNCIÓN DE LA ALTURA DE LA COLUMNA EN ESTADO ESTACIONARIO PARA UNA MUESTRA DE DMSO-PBS A UNA FRACCIÓN MÁSICA DE DMSO DEL 10% Y T=25°C. ....	28
FIGURA 3.9: INSTALACIÓN SLIDING SYMETRIC TUBES. A LA IZQUIERDA EL ESQUEMA DE LA INSTALACIÓN Y A LA DERECHA IMAGEN DEL BAÑO DE ATEMPERACIÓN CON VARIOS DISPOSITIVOS SST.....	29
FIGURA 3.10: PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE DE LAS MEZCLAS DMSO-SACAROSA (◆) Y DMSO-GLUCOSA (■) EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS AZÚCARES. A) VISCOSIDAD, B) EXPANSIÓN MÁSICA, C) ALFA Y D) COEFICIENTE DE TERMODIFUSIÓN. ....	30
FIGURA 3.11: VARIACIÓN DE LAS PROPIEDADES TERMOFÍSICAS PARA LA MEZCLA TOLUENO- FULLERENO C <sub>60</sub> A UNA TEMPERATURA MEDIA DE 25°C Y A DIFERENTES CONCENTRACIONES. A) DENSIDAD, B) VISCOSIDAD, C) EXPANSIÓN MÁSICA Y D) EXPANSIÓN TÉRMICA.....	33
FIGURA 3.12: COEFICIENTE DE TERMODIFUSIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FULLERENO A UNA T=25°C.....	33
FIGURA 3.13: LIMPIEZA DE LA COLUMNA A) PAREDES INTERNAS DE LA COLUMNA RECUBIERTAS DE FULLERENO. B) LIMPIEZA DE LAS PAREDES INTERNAS DEL GAP. ....	34

FIGURA 4.1: DIFERENTES DISPOSITIVOS BD. A) Y B) CON SISTEMA DE GENERADOR DEL GRADIENTE DE TEMPERATURA EXTERNOS, C) CON SISTEMA INTERNO BASADO EN RESISTENCIAS INTEGRADAS Y MINIATURIZADO. ....	47
FIGURA 4.2: MICROCÉLULA <i>BEAM DEFLECTION</i> [3].....	48
FIGURA 4.3: ESQUEMA DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DEL TDFRS. ....	49
FIGURA 4.4: DISPOSITIVO PARA EL ESTUDIO DE ADN MEDIANTE LA TÉCNICA DE SEGUIMIENTO DE COLOIDES POR FLUORESCENCIA. ....	50
FIGURA 4.5: MICRO SCALE THERMOPHORESIS (MST). A) ESQUEMA DEL DISPOSITIVO, B) ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS [24].....	50
FIGURA 4.6: AISLANTE. A) MODELO COMPLETO DEL AISLANTE. B) DETALLE DEL CORTE DEL SISTEMA DE LLENADO. ....	54
FIGURA 4.7: ELEMENTO DE SELLADO. ....	54
FIGURA 4.8: GEOMETRÍA DE LA TAPA EXTERIOR. ....	55
FIGURA 4.9: DISPOSITIVO FINAL DE LA MICROCOLUMNA. A) DESMONTADO, B) ENSAMBLADO. ....	56
FIGURA 4.10: SISTEMA DE LLENADO DE LA MICROCOLUMNA. ....	56
FIGURA 4.11: MEDICIÓN DEL GAP MEDIANTE “OPTICAL TWEEZER”. A) SET-UP, B) MEDIDAS DE CADA UNA DE LAS SUPERFICIES, C) GROSOR DEL GAP Y D) GROSOR DE LOS ZAFIROS. ....	57
FIGURA 4.12: RESULTADOS DE LA SIMULACIÓN NUMÉRICA PARA LA MEZCLA BINARIA TOLUENO-HEXANO EN ESTADO ESTACIONARIO. (A) PERFIL DE TEMPERATURA DENTRO DEL GAP DE LA MICROCOLUMNA. (B) PERFIL DE VELOCIDAD DENTRO DEL GAP DE LA MICROCOLUMNA A UNA ALTURA DE 15MM. (C) PERFIL DE LA FRACCIÓN MÁSCICA DE TOLUENO DENTRO DEL GAP DE LA MICROCOLUMNA A UNA ALTURA DE 15MM. (D) DISTRIBUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN VERTICAL DEL TOLUENO EN LA MITAD DEL GAP A LO LARGO DE LA MICROCOLUMNA. ....	60
FIGURA 4.13: MODELO DEL GAP CON LOS CONDUCTOS DE ENTRADA Y SALIDA. ....	61
FIGURA 4.14: SISTEMA ÓPTICO CON CONTROL ACTIVO DE LA FASE. ....	62
FIGURA 4.15: ANÁLISIS DE LAS FRANJAS DE INTERFEROMETRÍA. A) DESPLAZAMIENTO DE LAS FRANJAS DEBIDO A UN CAMBIO DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN. B) RESULTADO OBTENIDO EN INTENSIDAD AL PRODUCIRSE EL DESPLAZAMIENTO DE LAS FRANJAS. ....	64
FIGURA 4.16: EVOLUCIÓN DEL GRADIENTE DE TEMPERATURA. ....	65
FIGURA 4.17: ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA. EN GRANDE LA TEMPERATURA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN UN LADO Y EN EL OTRO. ARRIBA EN PEQUEÑO, EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA MEDIA Y ABAJO EN PEQUEÑO LA EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA EN LA PARTE ALTA Y BAJA DEL GAP EN UNO DE LOS LADOS. ....	66
FIGURA 4.18: RESULTADOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN JÜLICH. ....	67
FIGURA 4.19: ESQUEMA DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DISEÑADO PARA LA MICROCOLUMNA. ....	68
FIGURA 4.20: SOPORTE DE LA MICROCOLUMNA. ....	69
FIGURA 4.21: MONTAJE DE LA INSTALACIÓN. ....	70

FIGURA 4.22: INSTALACIÓN ÓPTICA COMPLETA.....	70
FIGURA 4.23: ESQUEMA DEL SISTEMA DE DISTRIBUCIÓN TERMOSTÁTICO PARA LA MICROCOLUMNA. A) PARA ATEMPERAR A TEMPERATURA CONSTANTE Y B) PARA APLICAR EL GRADIENTE TÉRMICO.....	71
FIGURA 4.24: ESQUEMA FINAL DEL SISTEMA DE DISTRIBUCIÓN TERMOSTÁTICO PARA LA MICROCOLUMNA . A) PARA ATEMPERAR A TEMPERATURA CONSTANTE Y B) PARA APLICAR EL GRADIENTE TÉRMICO.....	72
FIGURA 4.25: RESPUESTA DEL SISTEMA AL GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA FLUIDOS PUROS, A) TOLUENO, B) IBB Y C) THN.....	73
FIGURA 4.26: ÍNDICE DE REFRACCIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA MEZCLA IBB-C12 A 25°C.....	74
FIGURA 4.27: ENSAYO TOLUENO-HEXANO AL 50% A UNA TEMPERATURA MEDIA DE T=25°C.....	76
FIGURA 4.28: DETALLE DEL INICIO DEL ENSAYO.....	76
FIGURA 4.29: RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS DEMÁS SISTEMAS ANALIZADOS, A) THN-C12, B) IBB-C12 Y C) THN-IBB.....	77
FIGURA 4.30: RESULTADOS DEL COEFICIENTE $D_T$ PARA LOS SISTEMAS DE REFERENCIA ANALIZADOS, DONDE EN PUNTOS CERRADOS SE REPRESENTAN LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO Y EN CÍRCULOS ABIERTOS LOS DE LA LITERATURA.....	78
FIGURA 5.1: DISPOSITIVO EMPLEADO PARA LA EXTRACCIÓN DEL DMSO. A) ESQUEMA DEL DISPOSITIVO [32], B) MODELO EMPLEADO PARA EL ESTUDIO NUMÉRICO.....	89
FIGURA 5.2: FRACCIÓN DE EXTRACCIÓN DE DMSO $c_c / c_0$ EN FUNCIÓN DE $(1/Pe) (L/d)$ .....	92
FIGURA 5.3: DISPOSITIVO EXPERIMENTAL DISEÑADO Y CONSTRUIDO. A) DISPOSITIVO ENSAMBLADO. B) DISPOSITIVO EXPLOSIONADO. C) CORTE CENTRAL DEL DISPOSITIVO.....	93
FIGURA 5.4: ESQUEMA DEL SISTEMA DE MEDICIÓN EXPERIMENTAL.....	95
FIGURA 5.5: SISTEMA DE MEDICIÓN EXPERIMENTAL.....	95
FIGURA 5.6: COMPARATIVA ENTRE RESULTADOS EXPERIMENTALES Y NUMÉRICOS DE LA MEZCLA H <sub>2</sub> O-ISOPROPANOL POR DIFUSIÓN MOLECULAR EN FUNCIÓN DEL CAUDAL A T=25°C.....	96
FIGURA 5.7: COMPARATIVA ENTRE LA SEPARACIÓN DE DMSO POR DIFUSIÓN MOLECULAR REPRESENTADO COMO FRACCIÓN MÁSCICA DEL DMSO A LAS SALIDAS EN FUNCIÓN DEL CAUDAL TOTAL. A) CASO $f q = 0,5$ , B) CASO $f q = 0,4$ Y C) CASO $f q = 0,6$ .....	97
FIGURA 5.8: COMPARATIVA DE LA FRACCIÓN MÁSCICA EXTRAÍDA A LAS SALIDAS SUPERIOR E INFERIOR EN FUNCIÓN DEL CAUDAL TOTAL PARA LOS CASOS DE EXTRACCIÓN POR DIFUSIÓN MOLECULAR (EN LÍNEAS DISCONTINUAS) Y APLICANDO EL GRADIENTE DE TEMPERATURA (LÍNEAS SÓLIDAS), PARA EL CASO $f q = 0,5$ A UNA TEMPERATURA MEDIA DE T=25°C.....	98

FIGURA 5.9: RESULTADOS NUMÉRICOS DE LA EFICIENCIA DE LA EXTRACCIÓN DEL DMSO POR DIFUSIÓN MOLECULAR (AZUL) Y APLICANDO EL GRADIENTE DE TEMPERATURA (ROJO), PARA $f_q = 0,5$ A UNA TEMPERATURA MEDIA DE $T=25^{\circ}\text{C}$ .	99
FIGURA 5.10: COMPARATIVA NUMÉRICO-EXPERIMENTAL DE LA EXTRACCIÓN DEL DMSO EN FUNCIÓN DEL CAUDAL TOTAL. EN LÍNEAS LOS RESULTADOS NUMÉRICOS Y EN PUNTOS Y CUADRADOS RELLENOS LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.	100
FIGURA 6.1: INICIACIÓN DE METÁSTASIS. A) REPRESENTACIÓN DE UN TUMOR. B) REPRESENTACIÓN DE UNA CTC DE ESE TUMOR.	110
FIGURA 6.2: MICROCHIP DE SEPARACIÓN ACTIVA. A) ESQUEMA DE LA GEOMETRÍA DEL MICRODISPOSITIVO. B) CHIP REAL.	112
FIGURA 6.3: ESQUEMA DEL MICRODISPOSITIVO DE SEPARACIÓN ACTIVA. A) IMAGEN ESQUEMÁTICA DEL SISTEMA DE ACTUACIÓN. B) MODO DE ACTUACIÓN.	113
FIGURA 6.4: MICRODISPOSITIVO EMPLEADO. A) CHIP Y PORTACHIP. B) CHIP.	114
FIGURA 6.5: DIFERENTES DISPOSITIVOS PARA EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL. A) MFCS Y FLOWELL. B) CHIP CONECTADO AL PIEZOELÉCTRICO Y AL CONTROLADOR DE FLUJO.	115
FIGURA 6.6: ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	116
FIGURA 6.7: SEPARACIÓN SELECTIVA EN EL MICROCANAL [19]. A) FLUJO DE PARTÍCULAS SIN EXCITACIÓN Y B) CON EXCITACIÓN.	117
FIGURA 6.8: EXPERIMENTACIÓN MEDIANTE EL CHIP DE SEPARACIÓN.	117
FIGURA 6.9: REPRESENTACIÓN DE UN ANÁLISIS DE LA SEPARACIÓN DE MUESTRAS.	118
FIGURA 6.10: REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE VELOCIDAD. A) A LO LARGO DE TODO EL CANAL CON CORTES TRANSVERSALES Y B) A LA ENTRADA DEL CANAL DE SEPARACIÓN.	121
FIGURA 6.11: ANÁLISIS DE FLUJO EN LA ENTRADA. A) DEPRESIÓN GENERADA. B) VECTORES DE VELOCIDAD.	121
FIGURA 6.12: TRAYECTORIA DE UNA PARTÍCULA BAJO LA INFLUENCIA DE LA DEPRESIÓN EN LA ENTRADA.	122
FIGURA 6.13: INTERFACE EN EL CANAL CENTRAL. A) MAYOR CAUDAL EN EL CANAL SUPERIOR DE ENTRADA. B) MAYOR CAUDAL EN EL CANAL INFERIOR DE ENTRADA.	122
FIGURA 6.14: DISTRIBUCIÓN DE VELOCIDADES A LA SALIDA DEL CANAL DE SEPARACIÓN.	123
FIGURA 6.15: DISTRIBUCIÓN DE VELOCIDADES CON DIFERENTES PRESIONES DE SALIDA.	123
FIGURA 6.16: TRAYECTORIA DE UNA PARTÍCULA BAJO LA INFLUENCIA DE LA DIFERENCIA DE VELOCIDAD EN LA SALIDA.	124
FIGURA 6.17: NUEVO CHIP CON GEOMETRÍA OPTIMIZADA. A) CHIP COMPLETO, B) DETALLE DE LA SALIDA Y C) DE LA ENTRADA.	125
FIGURA 6.18: REDISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULAS. A) POSICIONES DE EQUILIBRIO. B) FUERZAS RESPONSABLES DE LAS POSICIONES DE EQUILIBRIO.	126

FIGURA 6.19: EXTRACCIÓN SELECTIVA DE CÉLULAS MEDIANTE FUERZAS INERCIALES [16]. A) DEAN FLOW Y B) DISPOSITIVO EMPLEADO PARA LA EXTRACCIÓN DE PARTÍCULAS EN FUNCIÓN DE SU TAMAÑO. ....	127
FIGURA 6.20: ESQUEMA DEL NUEVO CHIP. A) ESQUEMA COMPLETO, B) DETALLE DE LA ENTRADA DEL CHIP. ....	128
FIGURA 6.21: MODELO DEL SEGUNDO PROTOTIPO DEL CHIP, A) GEOMETRÍA DE LAS ENTRADAS DEL CITÓMETRO, B) DETALLE DE LA MALLA EMPLEADA.....	130
FIGURA 6.22: ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	130
FIGURA 6.23: ANÁLISIS DEL NUEVO CHIP JUNTO CON LOS DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES. ....	131
FIGURA 6.24: CONCENTRACIÓN DE PARTÍCULAS DE 6 MICRAS A DIFERENTES PROFUNDIDADES EN LA ZONA INICIAL DEL CHIP. A) $Q_{CH3}=5 \mu\text{L}/\text{MIN}$ , B) $Q_{CH3}=11 \mu\text{L}/\text{MIN}$ Y C) $Q_{CH3}=33 \mu\text{L}/\text{MIN}$ .....	132
FIGURA 6.25: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS NUMÉRICOS Y EXPERIMENTALES DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS PARTÍCULAS. DONDE A) $Q_{CH3}= 5 \mu\text{L}/\text{MIN}$ , B) $Q_{CH3}= 11 \mu\text{L}/\text{MIN}$ Y C) $Q_{CH3}= 33 \mu\text{L}/\text{MIN}$ Y 1) SIMULACIÓN CON PARTÍCULAS DE $6 \mu\text{M}$ , Y 2) EXPERIMENTAL CON PARTÍCULAS DE $6 \mu\text{M}$ TEÑIDAS DE ROJO CON FLUIDO PORTADO. ....	134
FIGURA 6.26: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS NUMÉRICOS Y EXPERIMENTALES DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS PARTÍCULAS AL FINAL DEL CANAL CENTRAL. DONDE A) $Q_{CH3}= 5 \mu\text{L}/\text{MIN}$ , B) $Q_{CH3}= 11 \mu\text{L}/\text{MIN}$ Y C) $Q_{CH3}= 33 \mu\text{L}/\text{MIN}$ Y 1) SON LOS RESULTADOS DE LAS SIMULACIONES NUMÉRICAS Y 2) LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES. ....	135
FIGURA 6.27: RESULTADOS NUMÉRICOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS PARTÍCULAS EN EL INICIO DEL CANAL CENTRAL. DONDE A) $Q_{CH3}= 5 \mu\text{L}/\text{MIN}$ , B) $Q_{CH3}= 11 \mu\text{L}/\text{MIN}$ Y C) $Q_{CH3}= 33 \mu\text{L}/\text{MIN}$ . ....	136
FIGURA 6.28: RESULTADOS NUMÉRICOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS PARTÍCULAS AL FINAL DEL CANAL CENTRAL. DONDE A) $Q_{CH3}= 5 \mu\text{L}/\text{MIN}$ , B) $Q_{CH3}= 11 \mu\text{L}/\text{MIN}$ Y C) $Q_{CH3}= 33 \mu\text{L}/\text{MIN}$ .....	137
FIGURA 6.29: DISTRIBUCIÓN DE LAS PARTÍCULAS PARA EL CASO OPTIMIZADO, DONDE $CH3 =11 \mu\text{L}/\text{MIN}$ , $CH2 = 31,35 \mu\text{L}/\text{MIN}$ Y $CH1 = 95,5 \mu\text{L}/\text{MIN}$ . SE REPRESENTA A) INICIO DEL CANAL CENTRAL, B) FINAL DEL CANAL CENTRAL Y EN EL CASO PARA 1) PARTÍCULAS DE 6 MICRAS Y 2) DE 20 MICRAS. ....	138
FIGURA 6.30: DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS PARA EL CASO OPTIMIZADO, DONDE $CH3 =11 \mu\text{L}/\text{MIN}$ , $CH2 = 31,35 \mu\text{L}/\text{MIN}$ Y $CH1 = 95,5 \mu\text{L}/\text{MIN}$ . SE REPRESENTA A) INICIO DEL CANAL CENTRAL, B) FINAL DEL CANAL CENTRAL Y EN EL CASO PARA 1) LEUCOCITOS Y 2) CTCs. ....	139





# LISTA DE TABLAS

TABLA 3.1: PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE DE LAS MEZCLAS DE DMSO-SACAROSA Y DMSO – GLUCOSA A DIFERENTES CONCENTRACIONES MÁSICAS DE SACAROSA Y GLUCOSA Y A T= 25°C.....	30
TABLA 3.2: PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE DE LA MEZCLA DE DMSO-PBS A T=25°C. ....	31
TABLA 3.3: PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE DE LAS MEZCLAS DE FULLERENO C <sub>60</sub> A UNA TEMPERATURA MEDIA DE 25°C.....	32
TABLA 4.1: TIEMPOS DE EQUILIBRIO DE LA SEPARACIÓN ESTACIONARIA, SEPARACIÓN, $Gr \cdot Sc$ Y $1000 \cdot A$ PARA LAS DIFERENTES MEZCLAS Y PARA DIFERENTES DIÁMETROS DE COLOIDES CORRESPONDIENTE A LA RELACIÓN DE ASPECTO $Lx = 500\mu m$ , $Lz = 30mm$ Y $Ly = 3mm$ DE LA MICROCOLUMNA DISEÑADA. ....	52
TABLA 4.2: PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE DE LA MEZCLA TOLUENO-HEXANO A UNA FRACCIÓN MÁSICA DE 51,67% DE TOLUENO A T=25°C. ....	59
TABLA 4.3: COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS NUMÉRICOS Y LOS DE LA BIBLIOGRAFÍA PARA LA MEZCLA TOLUENO - HEXANO A UNA FRACCIÓN MÁSICA DE 51,67% DE TOLUENO Y T=25°C. ....	60
TABLA 4.4: COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS NUMÉRICOS, CONTEMPLANDO VOLÚMENES MUERTOS, Y LOS RESULTADOS EN LA BIBLIOGRAFÍA PARA LAS MEZCLAS DE TOL-HEXA, THN-C12, THN-IBB, IBB-DD, AL 50% Y A UNA TEMPERATURA MEDIA DE T=25 °C.....	61
TABLA 4.5: RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LAS MEZCLAS DE TOL-HEXA, THN-C12, THN-IBB Y IBB-C12 AL 50% DE FRACCIÓN MÁSICA Y DETERMINADAS A UNA TEMPERATURA MEDIA DE 25°C. ....	67
TABLA 4.6: RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LAS MEZCLAS DE TOL-HEXA, IBB-C12, THN-IBB, THN-C12 AL 50% Y UNA TEMPERATURA MEDIA DE 25°C.....	78
TABLA 5.1: COMPARACIÓN DEL RATIO DE SEPARACIÓN EN AUSENCIA DE GRADIENTES DE TEMPERATURA, PARA MEZCLAS DE DMSO-PBS CON UNA FRACCIÓN MÁSICA DEL 10% DE DMSO A UNA TEMPERATURA MEDIA DE 25°C. ....	91
TABLA 5.2: PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE DE LA MEZCLA H <sub>2</sub> O-ISOPROPNOL A UNA FRACCIÓN MÁSICA DEL 50% Y A T=25°C.....	94
TABLA 6.1: PROPIEDADES TERMOFÍSICAS Y DE TRANSPORTE DE LA MEZCLA PBS-H <sub>2</sub> O A UNA FRACCIÓN MASICA DE PBS DEL 10% A T=25°C.....	119
TABLA 6.2: DIÁMETRO Y DENSIDAD DE LOS LEUCOCITOS Y LAS CTCs .....	119

TABLA 6.3: DIFERENTES CONDICIONES DE TRABAJO ANALIZADAS EN EL ESTUDIO NUMÉRICO. PARA TODOS LOS CASOS, LA CONDICIÓN DE PRESIÓN DE LA SALIDA 1 ES DE $P_{SAL1} = 1 \text{ ATM}$ . .....	120
TABLA 6.4: TRES CASOS ANALIZADOS NUMÉRICA Y EXPERIMENTALMENTE PARA LAS ENTRADAS DEL CHIP. ....	128
TABLA 6.5: RESULTADO DE LOS NÚMEROS ADIMENSIONALES $Re$ , $Rep$ Y $Rf$ PARA LOS TRES CASOS ANALIZADOS CON DOS DIMENSIONES DE PARTÍCULA, EMPLEANDO COMO LÍQUIDO PORTADOR PBS 1X. ....	129

## Capítulo 1

---

### **Introducción**



# 1. Introducción

La evolución de la esperanza de vida de las personas a lo largo de los siglos XX y XXI, ha registrado un constante incremento. Esto ha sido posible a través de mejoras en la alimentación, la higiene, la estabilidad social y la medicina. Dicho aumento, comenzó conjuntamente con la revolución industrial a inicios de 1900, que trajo consigo una mayor renta per cápita. Esto hizo que la población cambiara de estatus social, abandonando la hambruna. Asimismo, a partir de 1950, la estabilidad social, en ausencia de grandes guerras, contribuyó a que la esperanza de vida pasara de 46 años en 1950, a 66 en 1998, a nivel mundial [1], siendo en España de 75 años (Figura 1.1) [2]. De forma paralela a todos estos acontecimientos, la medicina ha contribuido de manera muy relevante en esta evolución, erradicando plagas y muertes comunes.

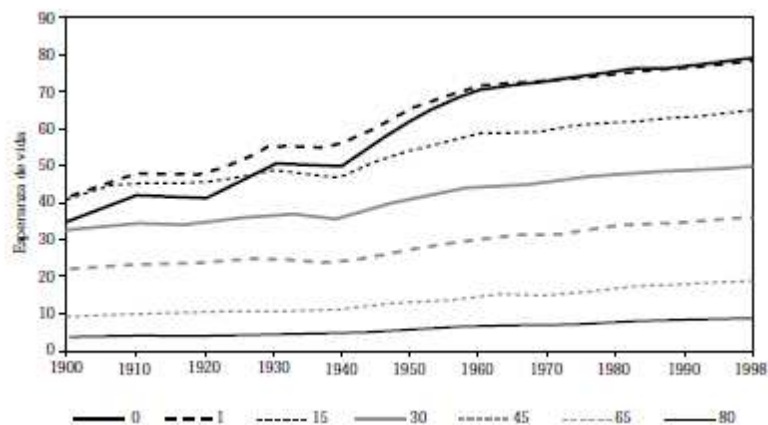


Figura 1.1: Evolución de la esperanza de vida en España a distintas edades (1900-1998).

La medicina moderna no comenzó hasta que, en el siglo XVII, Anton van Leeuwenhoek empleara microscopios para la observación de microorganismos y células, dando comienzo a la biología molecular y microbiología. Después, a finales del siglo XVIII, llegarían las vacunas de manos del Dr. Edward Jenner y Louis Pasteur, y los antibióticos de manos de Alexander Fleming con la penicilina, a inicios del siglo XX. Todos estos descubrimientos, han favorecido de manera muy significativa el aumento de la esperanza de vida de las personas.

Sin embargo, el aumento de la esperanza de vida por encima de los 60 años, ha traído un nuevo reto a la medicina; la necesidad de incrementar los años de vida saludables, con una demanda de mayor calidad de vida, asociada a la autonomía individual, familiar y social. El incremento de la esperanza de vida, proporciona una transición epidemiológica, caracterizada por un mayor impacto de las enfermedades crónicas no transmisibles sobre la salud de la población, siendo un 40,9% de la carga de las enfermedades en el mundo [3]. Entre éstas se encuentran enfermedades o alteraciones

celulares, como el cáncer, alzhéimer, párkinson, diabetes, alergias o enfermedades cardiovasculares y genéticas, que causan 29 millones de muertes de promedio cada año [4]. El coste asociado al tratamiento y seguimiento de estas patologías, así como la carga negativa derivada en malestar físico, mental y social de los individuos, genera pérdidas millonarias cada año en los países con salud pública universal garantizada. Este hecho, ha sido uno de los precursores de políticas económicas para el desarrollo de nuevas técnicas y procedimientos avanzados, con el fin de conseguir, por un lado, una disminución de años perdidos por muerte prematura, y por otro, un aumento de los años de vida saludable y con calidad. Muchas de estas técnicas se basan en sistemas de diagnóstico precoz de enfermedades, control y tratamiento más precisos y efectivos, y de menor coste económico. Para la consecución de estos objetivos, los gobiernos de los diferentes estados, así como diferentes organismos internacionales, como por ejemplo, los Programas Marco de la Unión Europea, han aportado grandes cantidades de dinero para el desarrollo de estas tecnologías embarcadas en el sector biotecnológico, desde 1980. En la Figura 1.2 se muestra como ejemplo, la inversión realizada en proyectos biotecnológicos para el 2010, respecto al total del PIB de cada estado.

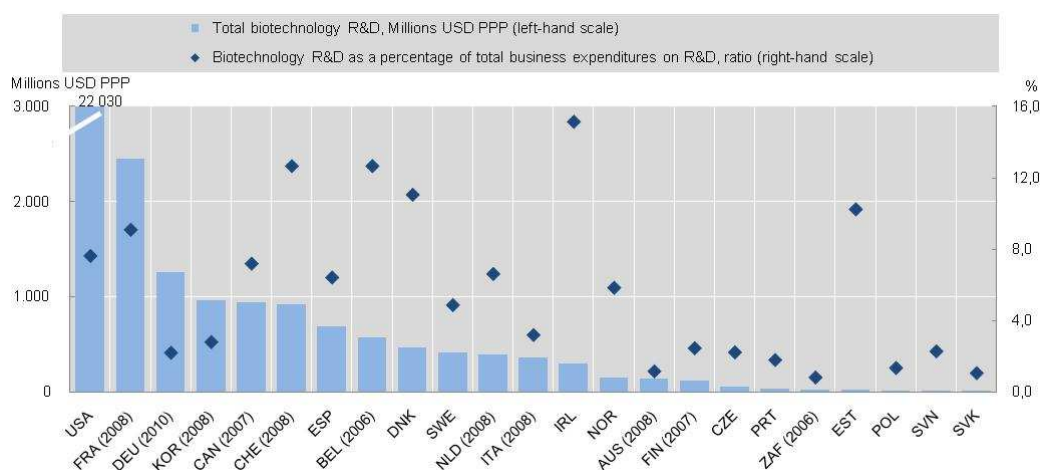


Figura 1.2: Inversión realizada por cada país en Biotecnología (2010) [5].

El desarrollo más importante en este sector, vino de la mano de las microtecnologías, con las que se consiguió la miniaturización de los dispositivos, procedimientos de manipulación, así como de análisis [6]. De esta miniaturización, surgió en la década de los 90 la microfluídica.

La microfluídica, es la ciencia que estudia los dispositivos, los métodos de control y manipulación de flujos fluídicos, a una longitud de escala inferior al milímetro [7]. Esta tecnología, ha sido una verdadera revolución en la biotecnología, ya que permite estudiar, manipular y analizar a escala celular o incluso inferior, además de tener la capacidad de detectar cantidades ínfimas de analitos, poder emplear volúmenes por debajo del microlitro, desarrollar dispositivos portátiles a bajo coste, además de disminuir los tiempos de análisis [8-10]. Así, las plataformas microfluídicas desarrolladas han permitido acelerar los estudios sobre, ADN, proteínas, virus etc. con los que se han podido

realizar nuevos fármacos más eficaces y específicos, gracias en parte, al gran número de experimentos que se pueden realizar simultáneamente. Por otro lado, se están haciendo grandes esfuerzos en el concepto *Lab-on-chip* o  $\mu$ TAS (*Micro Total Analysis System*), cuyo propósito es integrar en un solo microdispositivo, todas las funciones complejas necesarias a cometer en un laboratorio para realizar una análisis clínico [11]. En la Figura 1.3 se muestra a modo de ejemplo, un *Lab-on-chip* integrado para diagnóstico en muestras de saliva.

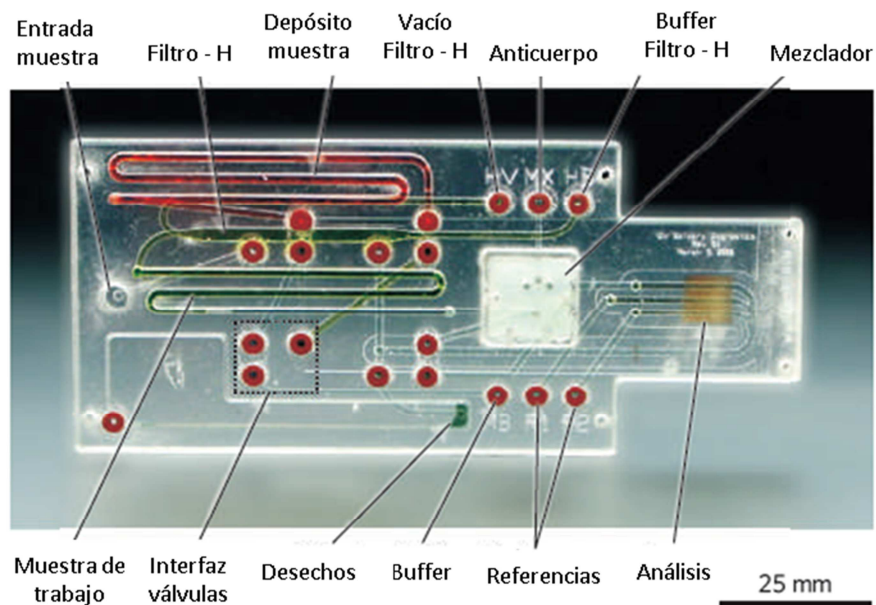


Figura 1.3: Ejemplo de un Lab-on-Chip integrado donde se aprecian las diferentes partes.

A todos estos dispositivos se les atribuye la ventaja de ser rápidos, efectivos, baratos, de fácil uso y con un potencial de ahorro de reagentes y muestra de hasta el 99%. Por otra parte, serían de gran ayuda en países subdesarrollados, ya que no se necesitarían infraestructuras complejas, como laboratorios, para poder emplearlos en diagnósticos rápidos de infecciones sexuales, malaria, tuberculosis, etc. [9]. Los resultados de estos microdispositivos, conjuntamente con otras áreas de la biotecnología, están dando su resultado, consiguiendo avances en áreas como la oncológica (Figura 1.4).

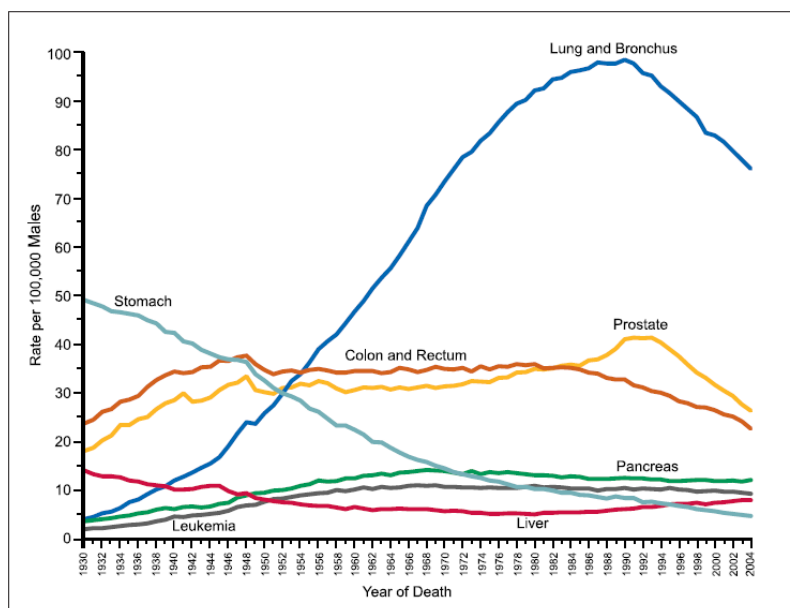


Figura 1.4: Evolución de la esperanza de vida frente a los diferentes tipos de cáncer [12].

No obstante, su perfeccionamiento y generalización, está siendo mucho más compleja de lo que se pronosticaba [13]. Para acometer un diagnóstico clínico en un *Lab-on-chip*, es necesaria la manipulación del fluido, el acondicionamiento de las muestras, realizar reacciones químicas, caracterización, identificación, separación, etc. Debido a la complejidad de implantar todas las acciones citadas en un único microdispositivo, y al mismo tiempo lograr una gran sensibilidad, se puede decir que la mayoría de los microdispositivos desarrollados hasta la fecha, se centran solamente en uno o más procesos del conjunto. Así, existen muchos trabajos en microfluídica sobre la manipulación de fluidos y acondicionamiento de las muestras para la mezcla [14], separación [15] y detección [16]. El propósito final de todos estos microdispositivos, es en gran medida, realizar una detección precoz de las enfermedades, sean infecciosas o no, un diagnóstico rápido, y control de la enfermedad. Además, debido a los avances en cuantificar, separar y detectar las células, se crea una nueva generación de tratamiento clínico basado en la medicina personalizada y específica a cada paciente y/ o patología. Para llegar a este objetivo, es necesaria una gran eficiencia de cada uno de los procesos microfluídicos en el microdispositivo. En la mayoría de las aplicaciones, se requiere un proceso de separación eficiente, rápido, continuo e incluso selectivo. No obstante, la eficiencia del proceso sigue siendo insuficiente, debido principalmente, a la abundancia de diferentes poblaciones celulares existentes en cualquier muestra biológica. Con el fin de optimizar este proceso, se han desarrollado diferentes métodos. Uno de ellos, ha sido mediante filtros de membrana. Sin embargo, la complicada estructura y los problemas de obstrucción, han hecho este método obsoleto. La necesidad de separar a nivel celular, de manera eficiente, ha sido la causa de que en las últimas dos décadas se hayan creado numerosas técnicas microfluídicas de separación. Estas técnicas se pueden clasificar en dos grandes grupos; i) activas y ii) pasivas. Los dispositivos activos [17], emplean



actuadores externos que generan algún tipo de fuerza sobre las muestras, que pueden ser mediante campos acústicos, eléctricos o magnéticos, entre otros. Por otro lado, los dispositivos pasivos [18], se basan principalmente en la geometría, propiedades intrínsecas de las muestras o en el comportamiento hidrodinámico. Los microseparadores activos, aumentan la complejidad técnica del dispositivo y su manipulación, dificultando su integración en otros dispositivos, así como aumentando el coste del producto final. Por su parte, los dispositivos pasivos, por norma general, necesitan de geometrías complejas con un estudio detallado del mismo, lo que hace que su coste también sea elevado. No obstante, estos se presentan más atractivos, ya que si se consigue una buena eficiencia de separación continua, su aplicabilidad está garantizada, debido a su fácil integración en cualquier *Lab-on-chip*.

En este contexto, el objetivo general de esta tesis doctoral, ha sido el estudio de los procesos de separación en fluidos de interés biotecnológico a escala micro. Para ello, se han determinado las propiedades termofísicas y de transporte en mezclas biológicas y nanofluídicas. Los resultados obtenidos han sido utilizados para optimizar el proceso de separación hacia la aplicación de la extracción del DMSO (dimetil sulfóxido) utilizado como crioprotector de células previamente criogenizadas, mediante la aplicación de gradientes de temperatura. Por otro lado, el análisis numérico realizado sobre un microdispositivo para la extracción selectiva, mediante la tecnología ultrasónica, de células tumorales circundantes en sangre periférica (CTCs), ha permitido identificar los parámetros geométricos y las condiciones de contorno idóneas para lograr una eficiencia de separación apta para la aplicación clínica. Finalmente, se ha diseñado, construido y validado una nueva instalación termogravitacional, idónea para el estudio de fluidos de interés biotecnológico. Esta instalación está formada por una microcolumna, y el sistema de análisis elaborado para determinar el coeficiente de termodifusión en las mezclas estudiadas, ha sido puramente óptico.

## **1.1.- Propiedades termofísicas y de transporte en fluidos**

Las propiedades termofísicas y de transporte, pueden variar en función de la temperatura, presión o composición. Entre estas propiedades se encuentran: la conductividad y difusividad térmica, la expansión másica y térmica, viscosidad, densidad, la difusión molecular y térmica, entre otras [19]. El estudio y la determinación de estas propiedades, son esenciales para poder optimizar y desarrollar nuevos procesos más eficientes en los microdispositivos [20].

Por ello, en esta tesis doctoral, se ha realizado un estudio de las propiedades termofísicas y de transporte en fluidos de interés biotecnológico, con el fin de lograr optimizar los procesos de separación en microdispositivos.

## **1.2.- Comportamiento hidrodinámico en microdispositivos de interés biotecnológico.**

La cuantificación y la extracción de poblaciones celulares en una muestra biológica, es de gran interés para el estudio de enfermedades neuronales, parasitarias o cancerosas [21-23]. Para este fin, muchas técnicas microfluídicas se basan en propiedades propias de las células de interés para su extracción, como por ejemplo: su tamaño, densidad, deformabilidad, movilidad, etc. Utilizando técnicas de separación que explotan estas propiedades, se está avanzando en el desarrollo de sistemas de diagnóstico rápido, fármacos y monitorización de enfermedades [24]. De esta manera, se está progresando hacia el desarrollo de la medicina personalizada.

En este contexto, una parte de la tesis doctoral, se ha centrado en el estudio y optimización de un microdispositivo capaz de separar de manera selectiva, células tumorales circundantes colorectales en sangre periférica, mediante ultrasonidos. Este trabajo, se ha llevado a cabo en colaboración con el CSIC, Ikerlan y el Hospital General Universitario de Elche.

El concepto de las CTCs como biopsia asequible y no invasiva del tumor, presenta la posibilidad de caracterizar funcionalmente el comportamiento de dichas células, con respecto a su sensibilidad/resistencia a los fármacos, por lo que presenta la posibilidad de personalizar los tratamientos, empleando los fármacos más eficaces para cada paciente.

El mayor tamaño del que disponen las células, hacen viable su separación selectiva. No obstante, el carácter viscoelástico de las células, hace que sea de una gran complejidad. Por ello, se va a optimizar su separación, mediante el estudio hidrodinámico de la geometría del chip, considerando las propiedades termofísicas de las muestras.

---

### 1.3.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] K. Sen, R. Bonita, "Global health status: two steps, one step back". *Lancet.*, **356**(9229), pp.5577-82. (2000).
- [2] F. J. Goerlich Gisbert, R. Pinilla Pallejà, "Esperanza de vida en España a lo largo del siglo - XX, Las tablas de mortalidad del Instituto Nacional de Estadística", *Fundación BBVA*, (2006).
- [3] C.J. Murray, A.D. Lopez, "Global mortality, disability and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study". *Lancet.*, **349**(9063), pp.1436-42, (1997).
- [4] D. Yach, C. Hawkes, C.L. Gould, K.J. Hofman, "The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control", *JAMA*, **291**(21), pp.2616-22, (2004).
- [5] OECD, *Biotechnology Statistics Database*, (2011).
- [6] P.A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes and A. Manz, "Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications", *Anal. Chem.* **74**, pp. 2637-2652, (2002).
- [7] T. M. Squires, S. R. Quake, "Microfluidics: Fluid Physics At The Nanoliter Scale", *Reviews of Modern Physics*, **77**, pp. 977-1026, (2005).
- [8] A. J. Tudos, G. A. Besselink, R. B. M. Schasfoort, "Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing in clinical chemistry", *Lab Chip*, **1**(2), pp. 83-95, (2001).
- [9] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, Tam M. R. and Weigl B. H., "Microfluidic diagnostic technologies for global public health", *Nature*, **442**, pp. 412-417, (2006).
- [10] C. D. Chin, V. Linder, S. K. Sia, "Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities", *Lab Chip*, **7**(1), pp. 41-57, (2007).
- [11] S. C. Jakeway, A. J. de Mello, E. L. Russell, "Miniaturized total analysis systems for biological analysis", *J. Anal. Chem.*, **366**, pp. 525-539, (2000).
- [12] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray, M. J. Thun, "Cancer Statistics", *CA Cancer J. Clin.*, **58**, pp. 71-96 (2008).
- [13] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics", *Nature*, **442**, pp. 368-373, (2006).
- [14] N. T. Nguyen and Z. Wu, "Micromixers – a review", *J. Micromech. Microeng.*, **15**, pp. 1-16, (2005).

- [15] N. Pamme, "Continuous flow separations in microfluidic devices", *Lab Chip*, **7**, pp. 1644-1659, (2007).
- [16] C. A. Baker, C. T Duong, A. Grimley and M. G. Roper, "Recent advances in microfluidic detection systems", *Bioanalysis*, **1**(5), pp. 967-975, (2009).
- [17] A. A. Bahat, H. Bow, H. W. Hou, S. J. Tan, J. Han, C. T. Lim, "Microfluidics for cell separation", *Med Biol Eng Comput.*, **48**(10), pp. 999-1014, (2010).
- [18] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins et al, "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels", *PNAS*, **104**, pp. 18892-18897, (2007).
- [19] D. Konstantinos, Antoniadis, M. J. Assael, W. A. Wakehan, "Transport properties of fluids" *Encyclopedia Of Life Support Systems, EOLSS Publishers Co.* (2011).
- [20] R. D. Astumian, "Coupled transport at the nanoscale: The unreasonable effectiveness of equilibrium theory", *PNAS*, **104**, pp. 3-4, (2007).
- [21] P. Gascoyne, "Microsample preparation by dielectrophoresis: isolation of malaria". *Lab Chip*, **2**(2), pp. 70-75, (2002).
- [22] J. A. Korecka, J. Verhaagen, E. M. Hol, "Cell-replacement and gene-therapy strategies for Parkinson's and Alzheimer's disease", *Regen. Med.*, **2**(4), pp. :425-446, (2007).
- [23] S. J. Tan, L. Yobas, G. Y. Lee, C. N. Ong, C. T. Lim, "Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood", *Biomed Microdevices*, **11**, pp. 883-892, (2009).
- [24] D. R Gossett, W. M. Weaver, A. J. Mach, S. C. Hur, H. T. Tse, W. Lee, H. Amini, D. Di Carlo, "Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems", *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, pp. 3249-3267, (2010).

## Capítulo 2

---

### **Objetivos**

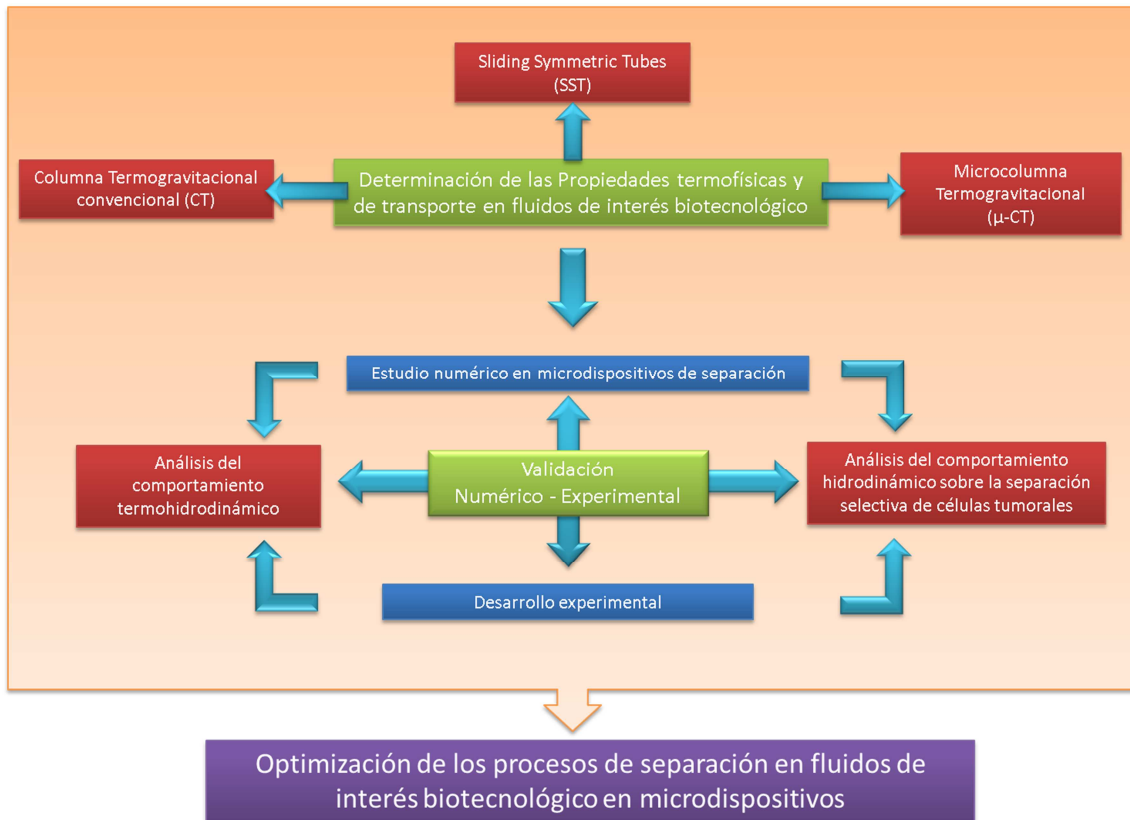


## 2. Objetivos

El principal objetivo de esta tesis doctoral es optimizar los procesos de separación en fluidos de interés biotecnológico para microdispositivos. Así, se han identificado los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las propiedades termofísicas y de transporte de muestras de interés biotecnológico.
- Diseñar, construir y validar una nueva microcolumna termogravitacional ( $\mu$ TC) adaptada para el análisis de fluidos biológicos.
- Estudiar el comportamiento termohidrodinámico sobre la eficiencia de separación en los microdispositivos.
- Analizar el comportamiento hidrodinámico sobre la separación selectiva de células tumorales en los microdispositivos.

Los objetivos principales se resumen en el siguiente diagrama de flujo:





## Capítulo 3

---

### **Determinación de las Propiedades Termofísicas y de Transporte en Muestras de Interés Biotecnológico**



### 3. Determinación de las Propiedades Termofísicas y de Transporte en Muestras de Interés Biotecnológico

El estudio y cuantificación de las propiedades termofísicas y de transporte son esenciales para comprender más extensamente los diferentes fenómenos físicos, y así desarrollar diseños y procesos ingenieriles más eficientes. Uno de estos fenómenos es la termodifusión. Este fenómeno de no-equilibrio, surge cuando una mezcla homogénea se expone a un gradiente de temperatura, el cual genera una redistribución de las especies en la mezcla. Aunque se descubriera hace 150 años, y se hayan hecho grandes esfuerzos, aún no existe una teoría unificada sobre el comportamiento termodifusivo. Este fenómeno, fue originalmente descubierto por Ludwig [1] cuando observó la cristalización de soluciones salinas concentradas en el extremo frío de un tubo invertido en U. Posteriormente, e independientemente, fue Soret [2] quien cuantificó el efecto en varias soluciones electrolíticas, y finalmente, De Groot [3] el que lo introdujo dentro del no-equilibrio termodinámico.

El efecto de un gradiente de temperatura sobre una mezcla binaria puede representarse como un flujo de especies  $J$  de acuerdo con la ecuación 3.1:

$$J = -D\nabla c_0 \rho - \rho D_T c_0 (1 - c_0) \nabla T \quad (3.1)$$

Donde  $D$  es el coeficiente de difusión molecular,  $c_0$  es la fracción másica del componente de referencia en la mezcla homogénea inicial,  $\nabla c_0$  el gradiente de concentración,  $\rho$  la densidad,  $D_T$  el coeficiente de termodifusión y  $\nabla T$  el gradiente de temperatura. El segundo término cuantifica el flujo de separación que origina un gradiente de temperatura en el seno de una mezcla, que está dominado por el coeficiente de termodifusión  $D_T$ , mientras que el primer término cuantifica el flujo de mezcla originado por el gradiente de concentración, que está dominado por el coeficiente de difusión molecular  $D$ . Cuando llega al estado estacionario y en ausencia de la convección, el flujo  $J$  es nulo y por lo tanto, se obtiene el coeficiente Soret, que es el ratio entre  $D_T$  y  $D$ ;  $S_T = D_T/D$ . Si bajo la influencia de un gradiente de temperatura el componente más denso se dirige hacia la pared fría, se denomina efecto Soret positivo, mientras que cuando sucede lo contrario, el efecto Soret será negativo.

En las últimas décadas, la termodifusión ha sido ampliamente estudiada por su importante impacto en la mezcla convectiva, aun siendo de un orden de magnitud pequeño ( $Sr \sim 10^{-3} K^{-1}$ ). Su rol es imprescindible en muchos procesos convectivo naturales, como la segregación de componentes en la solidificación de aleaciones metálicas [4] o en la lava volcánica [5], en la creación de la cristalización

[6] o en el equilibrio de la sedimentación (sobre todo en los yacimientos petrolíferos) [7, 8]. La industria petrolera, especialmente, ha sido una de las grandes precursoras de la determinación de la termodifusión en mezclas multicomponente, para así optimizar la extracción de los yacimientos petrolíferos. A día de hoy, los resultados obtenidos han servido además para verificar códigos numéricos [9], así como para contrastar teorías de predicciones de fluctuaciones de no-equilibrio en mezclas [10]. El estudio de la termodifusión en mezclas binarias, sobre todo en mezclas de hidrocarburos, ha sido muy activo en la pasada década. Para ello, se han empleado una gran variedad de técnicas diferentes para determinar el coeficiente Soret, que pueden ser clasificadas en dos grupos: i) no-convectivos y ii) convectivos. Los no-convectivos deben eludir el efecto de la convección, ya que distorsiona la separación generada por el efecto termodifusivo. Entre estas técnicas se pueden destacar el "Optical Beam Deflection" (OBD) [10], "Optical Digital Interferometry" (ODI) [11] o "Thermal Diffusion Forced Rayleigh Scattering" (TDFRS) [12]. Por otro lado, las técnicas convectivas, hacen uso de la convección para lograr separaciones mayores de los componentes en relación a la separación por pura termodifusión. Entre estos métodos experimentales, se encuentra la técnica de la columna termogravitacional, que puede ser de configuración plana [13, 14] o anular [15] y la técnica de la configuración Rayleigh-Benard [16]. Sin embargo, la comparación de los resultados experimentales entre las diferentes técnicas eran bastante divergentes [17, 18]. Estas discrepancias han sido atribuidas a inestabilidades provenientes de corrientes convectivas. Por ello, se han realizado varios ensayos en microgravedad para eliminar dichas perturbaciones [19, 20]. Finalmente, ante la imposibilidad de cotejar muchos de los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas, y a fin de poder realizar una validación experimental, se organizó un Benchmark en Fontainebleau a escala internacional, en donde participaron los equipos más experimentados. Se analizaron tres mezclas con diferentes técnicas en las mismas condiciones, para conocer el grado de exactitud de los métodos y técnicas, generando una base de datos imprescindible para la bibliografía [21].

En cuanto a los trabajos relacionados con la comprensión del fenómeno de la termodifusión, se han desarrollado numerosas correlaciones haciendo hincapié en la importancia de algunas propiedades termofísicas, como la densidad, peso molecular, momento de inercia, viscosidad, expansión térmica, estructura molecular, o interacciones químicas [22 - 29] sobre el coeficiente de termodifusión, de difusión molecular y Soret, en mezclas binarias como ternarias. Todos estos avances, han sido de mucha importancia para comprender y ajustar los modelos numéricos basados en la dinámica molecular como en la termodinámica de equilibrio, tal y como se ha podido observar en la última edición del congreso IMT10 celebrado en Bruselas en junio del 2012 [30].

En la última década, ha crecido de manera importante el interés por determinar el coeficiente de termodifusión en sistemas biológicos [31], como un mecanismo de transporte para los seres vivos. Un ejemplo de ello, es la respuesta de los espermatozoides bajo el gradiente de temperatura, gracias al cual son capaces de dirigirse hacia el óvulo femenino [32]. Estudios recientes también han

investigado la termodifusión en virus [33]. Así mismo, se han estudiado sistemas de monosacáridos. Estos, son sistemas estructurales de azúcares simples y más abundantes en la naturaleza, siendo la mayor fuente de energía para los seres vivos [34]. También, se han estudiado sistemas más complejos de azúcares, como los oligosacáridos [35]. Estas biomoléculas están presentes en el sistema inmunológico, en el crecimiento de células y en procesos inflamatorios, entre otros.

En los últimos años, debido al incremento de la sensibilidad de los sistema de medición, así como del control del gradiente de temperatura, unido a la posibilidad de realizar microcélulas de medición, ha permitido avanzar en el estudio de la termodifusión en mezclas multifásicas compuestas por nanopartículas en suspensión [36 - 38]. El análisis teórico del movimiento de las partículas bajo gradientes de temperatura, se ha analizado desde la termodinámica de la interface entre partícula y solvente. Así, se han propuesto diferentes teorías para describir los mecanismos fundamentales del movimiento de las partículas en el fluido bajo gradientes de temperatura, como por ejemplo: gradientes de tensión superficial [39], electrolitos no uniformes y distribución electrostática [40], perturbaciones termo-acústicas [41] o interacciones no uniformes de enlaces London - Van der Waals [42].

Explotar la termodifusión como mecanismo para manipular coloides o macromoléculas, es una perspectiva muy atractiva, sobre todo, enfocado a coloides biológicos como proteínas o ADN (ácido desoxirribonucleico). En concreto, ya se han intentado focalizar proteínas con la técnica "Temperature Gradient Focusing" (TGF) [43] o ADN [44] mediante calentamiento por láser de infrarrojos. La aplicación de este mecanismo de transporte dentro de microdispositivos microfluídicos, podría conseguir una separación de partículas entorno al 20% (partículas de 100nm y  $S_T \sim 10^{-1} \text{ K}^{-1}$ , canal de 20 $\mu\text{m}$ ) con tan solo una diferencia de temperatura de 1°C [45]. Por ello, es de vital importancia obtener un conocimiento claro del mecanismo de transporte de partículas o coloides para poder diseñar microdispositivos optimizados en la separación o manipulación.

Estudios en este tipo de microdispositivos, han demostrado que el ADN puede ser concentrado, empleando gradientes de temperatura [44]. Estos resultados podrían dar una pista sobre la evolución de los inicios de la vida, ya que se abre la posibilidad de que el ADN existente se acumulara, replicara y mutara en poros de rocas hidrotermales submarinas, siendo así la termodifusión pieza clave en la evolución prebiótica [46].

En este contexto, como primer paso de este trabajo de tesis, se han determinado las propiedades termofísicas y de transporte de varias mezclas de interés biotecnológico. Estas propiedades serán posteriormente empleadas en la optimización de microdispositivos de separación. Para ello, se ha utilizado la instalación termogravitacional actual del laboratorio de fluidos complejos de MGEP, así

como la instalación de “Sliding Symetric Tubes” (SST). Todos los ensayos se han realizado a una temperatura media de 25°C. Las mezclas de interés biotecnológico han sido:

- DMSO – glucosa
  - Fracción másica en peso de glucosa: 5%, 10%, 15%, 20% y 25% a T= 25°C.
- DMSO – sacarosa
  - Fracción másica en peso de sacarosa: 5%, 10%, 15%, 20% y 25% a T= 25°C.
- DMSO – PBS (*Phosphate buffered saline*)
  - Fracción másica en peso de DMSO: 10% a T= 25°C.
- Tolueno – Fullerenos C<sub>60</sub>
  - Fracción másica en peso de Fullerenos: 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,2% a T= 25°C.

El DMSO es un solvente altamente polar, por lo que es fácilmente miscible tanto en agua como en solventes orgánicos. El DMSO se utiliza en la actualidad como portador de fármacos o venenos, por su facilidad de atravesar membranas celulares o como medicamento anti-inflamatorio. No obstante, su mayor uso se centra como líquido crioprotector. De hecho, es el crioprotector más empleado [48]. Sin embargo, aunque su poder crioprotector sea elevado, su toxicidad también ha sido ampliamente demostrada, ya que puede generar náuseas, escalofríos, hipotensión o arritmia cardíaca, entre otros [48 - 52]. Por ello, se están haciendo muchos estudios tanto para reducir la cantidad de DMSO necesaria en la crioprotección, añadiéndole otros productos, así como empleando sistemas de extracción más eficaces para obtener una limpieza más profunda de las células antes de su uso clínico.

La glucosa forma parte de la familia de los monosacáridos, mientras que la sacarosa es un oligosacárido, formado por dos monosacáridos; glucosa y fructosa. Ambos forman parte de la familia de los azúcares; el primero, simple y el segundo, complejo. Varios estudios han demostrado que uniéndose con el DMSO forma una mezcla capaz de aumentar su poder crioprotector, pudiendo así disminuir la concentración de DMSO, pasando del 10% en el protocolo habitual, hasta la mitad [53, 54]. Por su parte, el PBS, es un *buffer* no tóxico común en la investigación biológica, muy empleado en cultivos celulares, que se utiliza como fluido limpiador para la extracción del DMSO de las células criogenizadas.

Finalmente, se ha estudiado un sistema compuesto por un nanofluido: Tolueno- Fullerenos C<sub>60</sub>. Este material, fue descubierto en 1985 por Harold Kroto [55], el cual ha resultado ser la tercera forma alotrópica conocida del carbono, conjuntamente con el grafito y el diamante. Su estructura atómica y su alta simetría le aportan unas características únicas. De hecho, es la molécula más simétrica conocida. Su estructura consta de 60 átomos, 12 pentágonos y 20 hexágonos, los cuales adoptan una forma de balón de fútbol con un diámetro de 10 Å (Figura 3.1a).

El fullereno puede producirse en pequeñas cantidades de manera natural por el impacto de rayos o tras la combustión de carbón [56]. También se ha detectado su presencia en meteoritos [57]. No obstante, su producción en masa se realiza mediante la evaporización del grafito por radiación láser [55]. El fullereno más común es el denominado  $C_{60}$ , sin embargo, se han descubierto fullerenos mayores,  $C_{70}$ ,  $C_{540}$  o incluso nanotubos [58]. En la Figura 3.1 se representan los diferentes tipos de geometría de fullerenos.

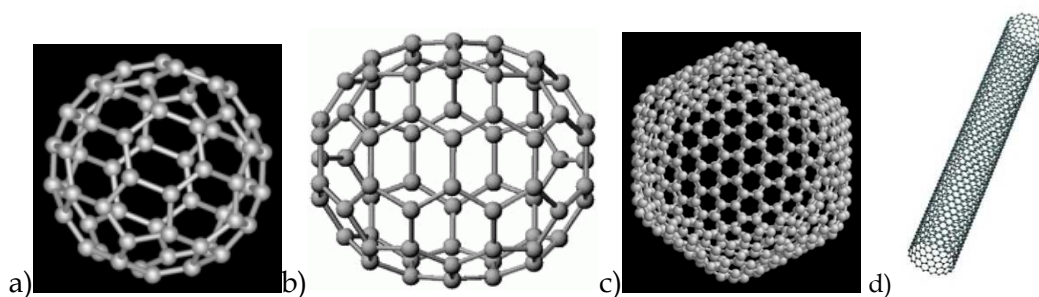


Figura 3.1: Diferentes tipos de fullerenos. a)  $C_{60}$ , b)  $C_{70}$ , c)  $C_{540}$  y d) nanotubo.

Desde su descubrimiento y debido a sus diferentes propiedades, se le han atribuido diversas aplicaciones en áreas muy diferentes. Así, aunque su estructura molecular sea muy resistente, capaz de aguantar hasta 3000 bar, las uniones entre moléculas son especialmente débiles (Van der Waals), por lo que se emplea como aditivo en lubricantes, creando una nueva generación de lubricantes nanofluídicos [59]. A nivel químico, el  $C_{60}$  es muy electronegativo por lo que forma muy fácilmente compuestos con átomos donadores. Una combinación viable es el  $C_{60}$  con un metal alcalino, ya que es muy electropositivo. De esta manera, se ha conseguido mediante la unión de potasio (K) o rubidio (Rb) al fullereno que adopte carácter de superconductor [60]. También se ha demostrado su potencial en aplicaciones ópticas, ya que sus propiedades varían ante exposiciones de luz UV [61].

No obstante, la propiedad debida a la cual se han realizado muchos estudios, ha sido su capacidad de disolución en disolventes orgánicos. Gracias a esta característica, se han podido realizar múltiples derivados que conservan las propiedades excepcionales del  $C_{60}$ . De esta manera, se han conseguido realizar nuevos polímeros con aditivos de  $C_{60}$  aportándoles sus propiedades de dureza y baja densidad. Incluso, se ha conseguido su disolución en medios acuosos [62]. Este hecho, ha fomentado su aplicación en el sector biotecnológico. Debido a su tamaño, se han realizado estudios para su aplicación como inhibidor de la proteasa causante del virus del sida (HIV) [63, 64]. Además, su similitud en tamaño con medicamentos comunes, lo hace viable como posible portador de medicamentos [65]. Otras aplicaciones han utilizado su cavidad interna, en donde se ha introducido, uno, dos o tres átomos de materiales diferentes al carbono. En su mayoría, han introducido átomos metálicos (*metallofullerenes*) o gases nobles para su aplicación en visualización MRI o rayos X [66, 67].

Estas aplicaciones son de gran interés sobre todo para la lucha contra el cáncer. Además, los fullerenos, al estar formados únicamente de carbono y ser significativamente pequeños, son tolerados y expulsados por el cuerpo. No obstante, hay estudios que demuestran algunas conductas nocivas para el ser humano de este tipo de nanopartículas [68]. Esta situación adversa, tiene su origen en la escasa solubilidad de estas nano partículas en medios acuosos; aproximadamente de 1,6 mg/ml. Esto hace que a determinadas concentraciones de fullereno, se generen agregados o nanocristales de  $C_{60}$  [62, 68]. Estas agregaciones, son las causantes de su toxicidad. La generación de estas estructuras, así como su morfología, es aún ambigua y dudosa. Por ello, es importante su estudio. En la Figura 3.2, se puede ver un análisis espectral del  $C_{60}$  en diferentes solventes, donde se aprecia una única excitación en torno a 340 nm para los solventes orgánicos de tolueno y THF (tetrahidrofurano). Sin embargo, en el espectro de la solución acuosa de  $C_{60}$ , existen dos excitaciones: una, en torno a 340 nm correspondiente a moléculas de  $C_{60}$ , y otra, en torno a 490 nm correspondiente a nanocristales formados por moléculas de  $C_{60}$ .

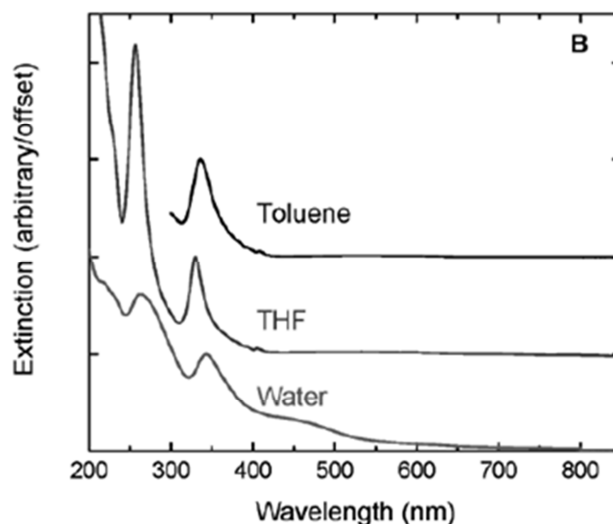


Figura 3.2: Análisis espectral del  $C_{60}$  disuelto en tolueno, THF y agua [68].

Por todo esto, una parte de esta tesis doctoral se ha centrado en determinar las propiedades termofísicas y de transporte aún no estudiadas en algunas de estas mezclas. Gracias a los resultados obtenidos, se pueden mejorar y optimizar las posibles aplicaciones relacionadas con los fenómenos de transporte, tal como, los procesos relacionados con la separación en microdispositivos.

### 3.1.- Técnica termogravitacional

La técnica termogravitacional es una técnica convectiva, mediante la cual, se puede obtener el coeficiente de termodifusión  $D_T$  de manera directa a partir de las medidas de separación en el estado estacionario. Fue originalmente desarrollada por Clusius y Dickel [69]. Mediante la convección



generada por la aceleración gravitacional, se consigue una mayor separación de los componentes entre los extremos de la columna. En este caso, se ha empleado una columna de configuración plana, cuyas dimensiones internas son  $L_x = 1mm$ ,  $L_y = 50mm$  y  $L_z = 500mm$ , lo que da un volumen total de 25ml, y con un sistema de refrigeración basado en una recirculación de agua atemperada, empleando dos baños termostáticos. La mezcla a estudiar se confina en el interior del *gap* y se la somete a un gradiente de temperatura horizontal. El gradiente de temperatura ocasiona la separación de los componentes debido a tres contribuciones. En primer lugar, y en el caso de Soret positivo, se produce un flujo del componente más denso, perpendicular a la aceleración gravitacional, hacia la pared más fría. A continuación, debido al gradiente de concentración originado por este flujo, se produce otro flujo, pero en dirección contraria, para tratar de homogenizar de nuevo la mezcla. Finalmente, debido a la aceleración gravitacional, se produce un flujo convectivo descendente en la pared fría y ascendente en la caliente, la cual genera un gradiente de concentración vertical, dando lugar a una mayor concentración del componente más denso en la parte inferior y una mayor concentración del componente menos denso en la parte superior (Figura 3.3).

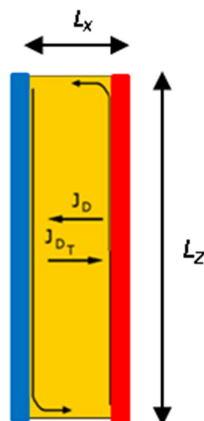


Figura 3.3: Flujos característicos del efecto termogravitacional.

La teoría de la difusión térmica en las columnas termogravitacionales (CT) fue inicialmente desarrollada por Furry, Jones y Onsager [70], lo que se conoce como la teoría FJO. La teoría desarrollada para las columnas termogravitacionales [71 - 73] establece una relación entre la separación de masa estacionaria y el coeficiente de termodifusión  $D_T$ , de la siguiente manera:

$$\Delta c = \frac{-504 \cdot L_z \cdot D_T \cdot \nu}{g \cdot L_x^4 \cdot \alpha} c_0 (1 - c_0) \quad (3.2)$$

Donde  $\Delta c$  es la diferencia de la fracción de masa entre la parte superior y la inferior de la CT,  $L_x$  y  $L_z$  son el espesor y longitud del gap de la CT respectivamente,  $\alpha = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial \rho}{\partial T}$  el coeficiente de expansión térmica,  $\nu$  la viscosidad cinemática,  $g$  la aceleración gravitacional,  $\rho$  la densidad y  $T$  la temperatura. Para obtener la separación a lo largo de la columna se deben extraer muestras a diferentes alturas, una vez que el sistema llegue a un estado estacionario. Para conocer cuando se produce el estado estacionario se coge como referencia el valor del tiempo de relajación  $t_r$ , multiplicado cinco veces, que se representa como:

$$t_r = \frac{9!(L_z \cdot \nu)^2 D}{(g \cdot \pi \cdot \alpha \cdot \Delta T \cdot L_x^3)^2} \quad (3.3)$$

En la Figura 3.4 se muestra la instalación termogravitacional empleada en esta tesis doctoral:

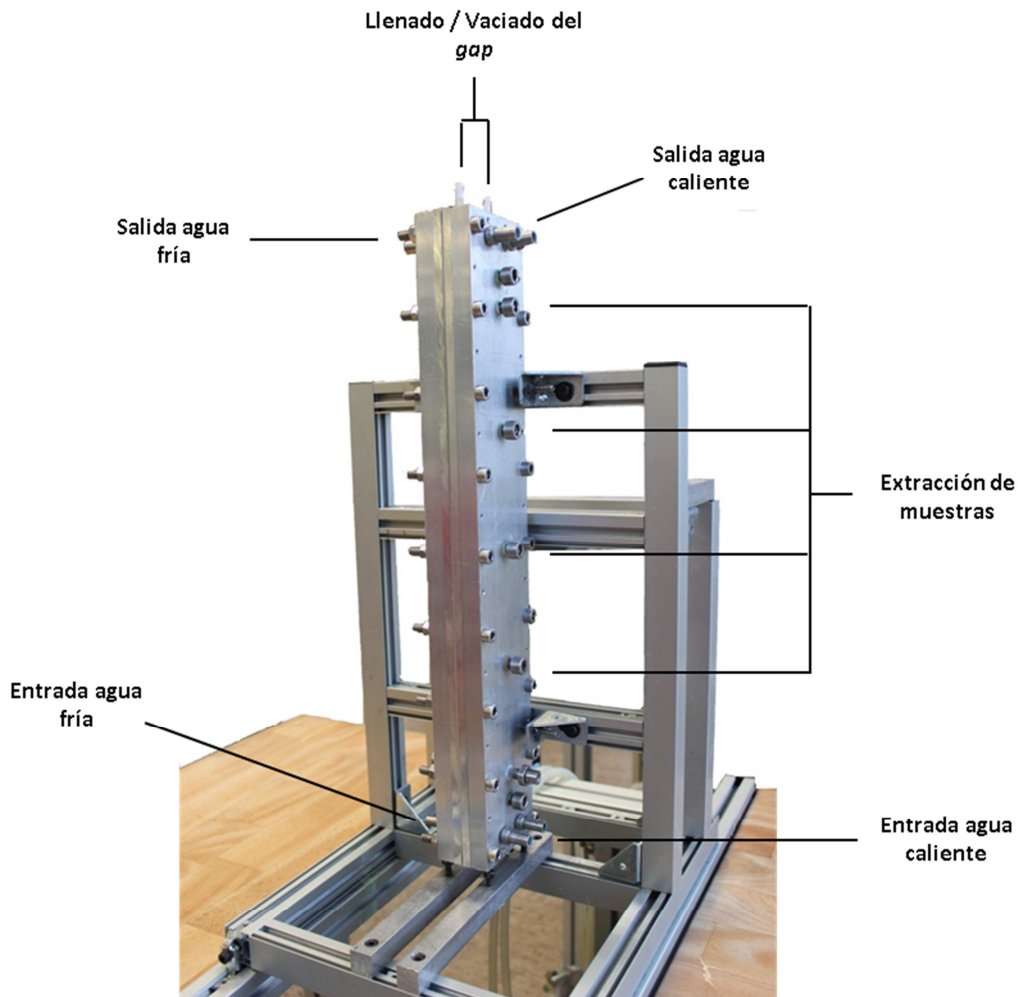


Figura 3.4: Instalación termogravitacional.

La separación másica se determina experimentalmente mediante la siguiente expresión:

$$\Delta c = \frac{Lx}{\beta\rho} \frac{\partial\rho}{\partial z} \quad (3.4)$$

Donde  $\beta = \frac{1}{\rho} \frac{\partial\rho}{\partial c}$  es el coeficiente de expansión másica, y  $\frac{\partial\rho}{\partial z}$  es el gradiente de la densidad a lo largo de CT. Por lo tanto, combinando las ecuaciones (3.2) y (3.4), se obtiene la ecuación de trabajo para obtener  $D_T$ :

$$D_T = -\frac{gLx^4}{504} \frac{\alpha}{c_0(1-c_0)\beta\mu} \frac{\partial\rho}{\partial z} \quad (3.5)$$

Donde  $\mu$  es la viscosidad dinámica. De tal manera, midiendo la densidad de las muestras obtenidas a diferentes alturas de la CT, se puede determinar el coeficiente de difusión térmica  $D_T$ .

### 3.1.1.-Procedimiento experimental

#### *Preparación de muestras*

Uno de los pasos más importantes es la preparación de las muestras, ya que de su exactitud dependen todas las precisiones de las propiedades a determinar. Por ello, se ha empleado una balanza de precisión Gram VXI-310 (Figura 3.5) con una resolución de 0,0001g. Para la elaboración de las mezclas de componentes volátiles, en primer lugar, se ha introducido el fluido más denso, y posteriormente, el menos denso. En mezclas con componentes sólidos, estos han sido los primeros en introducirse. De esta manera, se consiguen mezclas de concentraciones más fiables.



Figura 3.5: Balanza de precisión Gram VXI-310.

### *Obtención de las propiedades termofísicas*

Para la obtención de la expansión másica, se realiza una calibración de la densidad en función de la concentración. Para ello, se emplean diferentes muestras con una concentración en torno a la concentración media (Figura 3.6a). La expansión térmica se determina realizando una calibración de la densidad de la mezcla de referencia en función de la temperatura (Figura 3.6b). Para determinar estos coeficientes, así como la variación de la densidad en función de la altura de la columna, se emplea un densímetro ANTON Paar DMA 5000 (Figura 3.7a) de tubo de cuarzo en U vibrante con una resolución de  $1 \cdot 10^{-6} \text{ g/cm}^3$  y un control de temperatura basado en sistema peltier con una resolución de 0,001K.

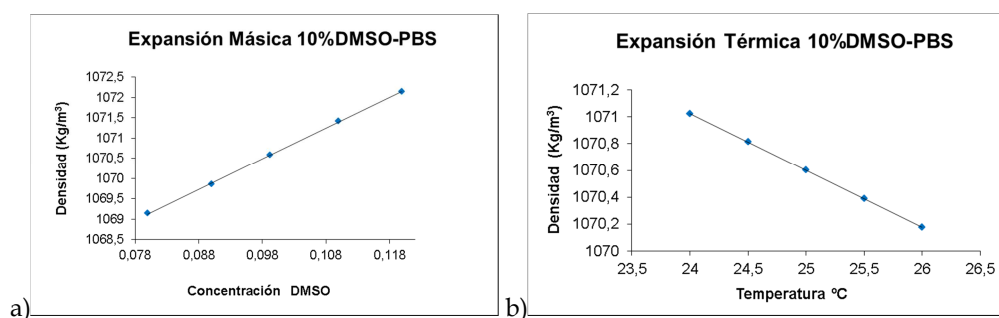
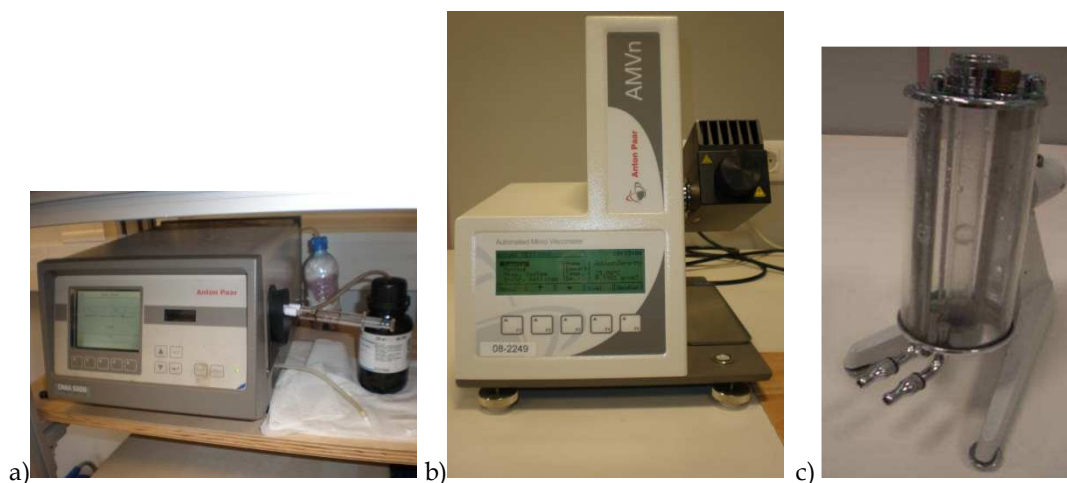


Figura 3.6. Determinación del coeficiente de expansión a) másica y b) térmica para la mezcla DMSO-PBS a una fracción másica de DMSO del 10% y T = 25°C.

La viscosidad se ha determinado mediante un microviscosímetro de caída de bola Anton Paar AMVn (Figura 3.7b), cuya precisión es del  $\pm 0,5\%$ . El control de la temperatura se realiza mediante

unos elementos peltier integrados en el dispositivo que permiten un control de la temperatura con una precisión de 0,05 °C. También se ha empleado como método complementario un viscosímetro de caída de bola de la marca HAAKE (Figura 3.7c), cuya resolución es del  $\pm 1\%$ .



**Figura 3.7: Dispositivos experimentales para determinar las propiedades termofísicas y de transporte. a) Densímetro Anton Paar DMA 5000. b) Microviscosímetro de caída de bola Anton Paar AMVn. c) Viscosímetro de caída de bola Haake.**

### *Obtención del coeficiente de termodifusión*

La CT debe colocarse en posición vertical, ya que se ha demostrado que en función de su verticalidad, el coeficiente  $D_T$  varía [74, 75]. Para ello, se emplea un nivel de precisión y cuatro posicionadores que se encuentran en la base de la estructura de sujeción. Una vez posicionada la columna, la muestra a estudiar se introduce desde la parte superior, donde dispone de dos entradas/salidas que están unidas con la cavidad central. Con la ayuda de una jeringuilla, se introduce la muestra por gravedad o haciendo una leve presión (si la mezcla es muy viscosa), por una de las estradas. Con la ayuda de dos baños termostáticos (LAUDA Proline RP-855) y mediante un circuito hidráulico, se aplica el gradiente de temperatura deseado. La temperatura se controla con un termopar PT100, el cual puede ser introducido por la parte superior e inferior de ambos lados de la CT. Gracias al aislante empleado para delimitar la cavidad interna, se consigue un gradiente de temperatura estable. La  $\Delta T$  aplicada es de 7 K, donde a un lado se aplica una temperatura de  $T_{med} + \Delta T/2$  y en la otra  $T_{med} - \Delta T/2$ , donde  $T_{med}$  es 25°C. Una vez transcurrido el tiempo de equilibrio, y con la ayuda de jeringuillas, se extraen 4 muestras a diferentes alturas de la columna. Estas jeringuillas se introducen a través de unos orificios que se encuentran a una distancia equidistante (Figura 3.4). El gradiente de la densidad  $\partial\rho/\partial z$ , se obtiene mediante la medida de la densidad de las cuatro muestras extraídas (Figura 3.8).

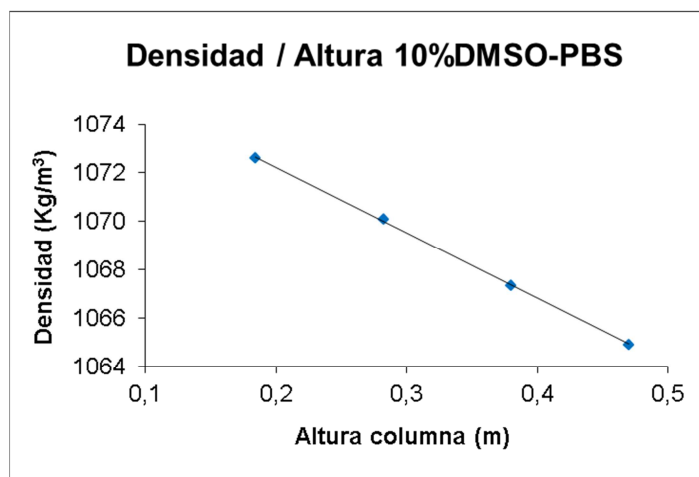


Figura 3.8: Variación de la densidad en función de la altura de la columna en estado estacionario para una muestra de DMSO-PBS a una fracción másica de DMSO del 10% y  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

Una vez determinadas todas estas propiedades, se está en disposición de determinar el coeficiente de termodifusión de las mezclas analizadas a partir de las medidas de separación estacionaria aplicando la ecuación (3.5).

### *Obtención del coeficiente de difusión molecular*

En cuanto a la determinación del coeficiente de difusión molecular se ha empleado la técnica de "SST" (Sliding Symetric Tubes) (Figura 3.9). Esta técnica consiste en una serie de conjuntos compuestos por dos tubos idénticos. Estos conjuntos tienen dos posiciones: tubos separados y tubos enfrentados. En la posición de tubos separados, el contenido de ambos tubos se encuentra aislado del otro, mientras que en la posición de tubos enfrentados, los dos tubos se encuentran conectados. Partiendo en su posición de tubos separados, se introduce en cada uno de ellos la mezcla a estudiar con una pequeña diferencia de concentración. Es decir, si se pretende estudiar una mezcla con un 50% de concentración másica de cada componente, se prepara una muestra con un 47% de concentración másica del componente más denso y otra muestra con un 53% de concentración másica del componente más denso. La mezcla con una mayor densidad se introduce en el tubo inferior, mientras que la mezcla menos densa se introduce en el tubo superior, así se evita la convección al enfrentar los dos tubos. Los conjuntos son introducidos en su posición de tubos separados en un baño con agua (Figura 3.9) para que la mezcla de su interior alcance la temperatura de ensayo. Cuando los tubos se han atemperado, se cambian todos los conjuntos de la posición de tubos separados a la posición de tubos enfrentados permitiendo así que aparezca la difusión molecular entre los dos tubos. Cada cierto periodo de tiempo, cada uno de estos conjuntos se vuelve a cambiar a su posición de tubos separados, deteniendo de esta forma la difusión entre los dos tubos. Analizando la composición de cada tubo se determina el cambio de concentración en cada tubo en

función del tiempo, y por lo tanto, se puede obtener el coeficiente de difusión molecular de la mezcla [29].

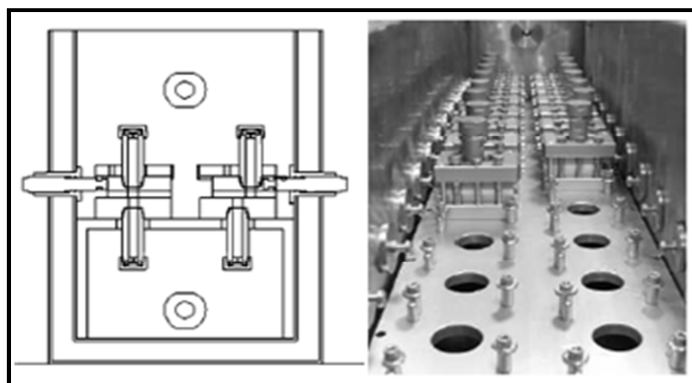


Figura 3.9: Instalación Sliding Symetric Tubes. A la izquierda el esquema de la instalación y a la derecha imagen del baño de atemperación con varios dispositivos SST.

## 3.2.- Resultados

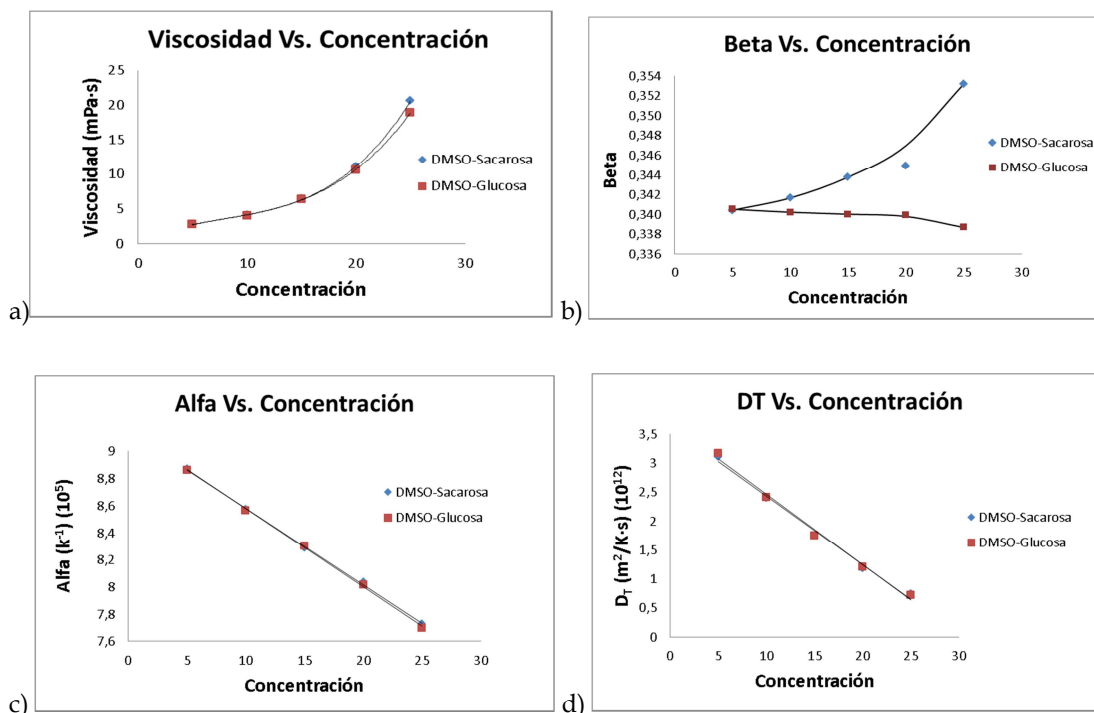
### 3.2.1.-DMSO-Glucosa y DMSO-Sacarosa

Las propiedades determinadas, corresponden a mezclas biológicas de DMSO-glucosa y DMSO-sacarosa a concentraciones máxicas del 5%, 10%, 15%, 20% y 25% de glucosa y sacarosa. Se ha estudiado un rango de concentraciones, desde sistemas diluidos, hasta muy concentrados, con el fin de determinar el coeficiente de termodifusión en función de la concentración. No se han estudiado mezclas de mayores concentraciones debido a su difícil disolución. Para conseguir una disolución total y homogénea, se ha empleado un agitador ultrasónico ELMA Transsonic TI - H5. Las propiedades determinadas para todas estas mezclas han sido: densidad, viscosidad dinámica y cinética, coeficiente de expansión térmica y másica, así como el coeficiente de termodifusión. Todos los ensayos se han repetido al menos 4 veces, con una desviación inferior al 4%, para el caso del coeficiente de termodifusión. Al no tener conocimiento sobre el tiempo de equilibrio, se han realizado varios ensayos bajo el mismo gradiente de temperatura, a diferentes tiempos de extracción, desde 4 horas hasta 72 horas. En la Tabla 3.1 se resumen los resultados obtenidos, donde se representan las propiedades termofísicas y de transporte de primer como de segundo orden, determinadas a una temperatura media de 25°C, para las mezclas de DMSO-glucosa y DMSO-sacarosa a diferentes concentraciones.

**Tabla 3.1: Propiedades termofísicas y de transporte de las mezclas de DMSO-Sacarosa y DMSO - glucosa a diferentes concentraciones máscas de sacarosa y glucosa y a T= 25°C.**

Glucosa	$\rho(\text{kg/m}^3)$	$\mu(\text{mPa}\cdot\text{s})$	$\beta$	$\alpha(\text{K}^{-1}) (10^{-3})$	$D_T (\text{m}^2/\text{K}\cdot\text{s}) (10^{-12})$
5%	1114,08	2,77	0,340	0,886	3,17
10%	1133,12	4,07	0,340	0,856	2,41
15%	1152,62	6,37	0,340	0,830	1,75
20%	1172,36	10,59	0,339	0,801	1,21
25%	1192,41	18,88	0,338	0,769	0,72
Sacarosa	$\rho(\text{kg/m}^3)$	$\mu(\text{mPa}\cdot\text{s})$	$\beta$	$\alpha(\text{K}^{-1}) (10^{-3})$	$D_T (\text{m}^2/\text{K}\cdot\text{s}) (10^{-12})$
5%	1113,86	2,74	0,340	0,887	3,11
10%	1132,90	4,05	0,342	0,857	2,40
15%	1152,38	6,43	0,344	0,828	1,75
20%	1172,39	11,02	0,345	0,803	1,19
25%	1192,71	20,56	0,353	0,773	0,75

En la Figura 3.10 se representan los resultados obtenidos en gráficas en función de la concentración.



**Figura 3.10: Propiedades termofísicas y de transporte de las mezclas DMSO-Sacarosa (◆) y DMSO-Glucosa (■) en función de la concentración de los azúcares. a) Viscosidad, b) Expansión máscica, c) Alfa y d) Coeficiente de termodifusión.**



Estos resultados demuestran que el valor del coeficiente de termodifusión es positivo para este rango de concentraciones a 25°C de temperatura media. Asimismo, bajo un gradiente de temperatura, las moléculas de los azúcares se dirigen hacia la zona más fría. Tal y como se puede apreciar en la Figura 3.10d, según se aumenta la concentración del soluto, el coeficiente de termodifusión disminuye linealmente. Cabe esperar que para las concentraciones del soluto del orden de 30% de sacarosa y de glucosa, el coeficiente de difusión térmica cambie de signo; es decir, que a partir de estas concentraciones, el componente más denso se dirija hacia la pared más caliente. Por lo tanto, a mayor concentración de azúcares en DMSO, el coeficiente de termodifusión es negativo. El comportamiento del coeficiente de expansión térmica (Figura 3.10c), tal y como se observa, tiene un comportamiento lineal para ambas mezclas, común en la mayoría de las mezclas binarias. Sin embargo, el coeficiente de expansión másica (Figura 3.10b), no es lineal al menos en el caso de la mezcla DMSO-Sacarosa. Además, a 25% de fracción másica de los azúcares, la tendencia se rompe. Esto puede deberse a que el sistema se encuentra al límite de la saturación. Por otra parte, las dos mezclas tienen tendencias diferentes. En el caso de la glucosa, es parcialmente constante, mientras que en el caso de la sacarosa es creciente en función de la concentración. Esto puede deberse a que la glucosa es un monosacárido (compuesto de una sola molécula), mientras que la sacarosa es un disacárido (compuesto por dos moléculas) por lo que tiene mayor influencia sobre el coeficiente de expansión másica.

### 3.2.2.-DMSO-PBS

Se han determinado las propiedades termofísicas y de transporte para una concentración másica del 10% de DMSO en PBS. En concreto se han determinado: la densidad, viscosidad, coeficiente de expansión térmica y másica, así como el coeficiente de termodifusión. Todos los ensayos se han repetido al menos 4 veces. En todos los casos la desviación siempre ha sido inferior al 4% en lo que se refiere al coeficiente  $D_T$ . En la Tabla 3.2 se resumen los resultados obtenidos, donde se representan las propiedades termofísicas y de transporte.

**Tabla 3.2: Propiedades termofísicas y de transporte de la mezcla de DMSO-PBS a T=25°C.**

DMSO	$\rho(kg/m^3)$	$\mu(mPa \cdot s)$	$\beta (10^{-1})$	$a (K^{-1}) (10^{-3})$	$D (m^2/s)(10^{-9})$	$D_T (m^2/K \cdot s) (10^{-11})$
10%	1070,64	1,345	0,706	0,397	1,88	2,38

Mediante este estudio experimental se ha comprobado que para la mezcla analizada de DMSO - PBS al 10% de DMSO y a 25°C de temperatura media, el coeficiente de termodifusión es positivo.

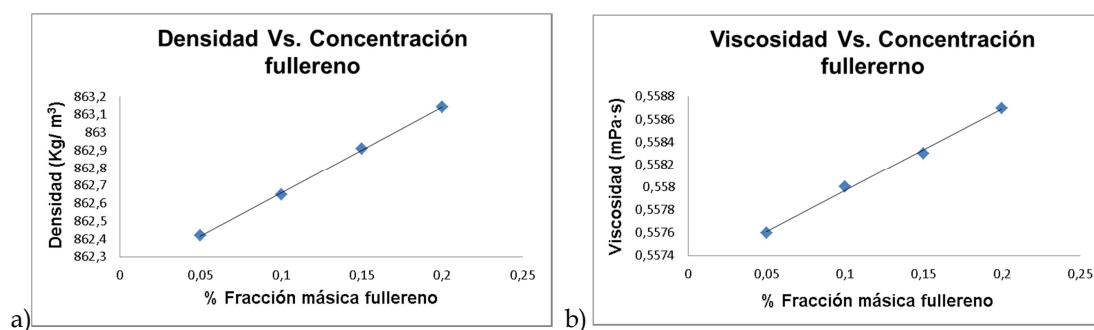
### 3.2.3.-Tolueno-Fullereno C<sub>60</sub>

Se han determinado las propiedades termofísicas del nanofluido tolueno-C<sub>60</sub> a fracciones máxicas de fullereno de 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,2%. Hay que destacar, que la elaboración de las mezclas ha sido muy meticulosa, ya que una pequeña variación en la masa del soluto o del disolvente, significa un gran cambio en la concentración final. No se han estudiado fracciones máxicas superiores debido a su baja disolubilidad (en tolueno 2.9mg/mL) [62]. En concreto, se ha determinado, la densidad, viscosidad dinámica, coeficiente de expansión máxica y térmica y el coeficiente de difusión térmica. Al igual que en los casos anteriores, todos los ensayos se han repetido al menos 4 veces, donde la desviación máxica ha sido inferior al 4% en lo que se refiere al coeficiente  $D_T$ . Todos los ensayos se han realizado a una temperatura media de 25°C. En la Tabla 3.3 se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 3.3: Propiedades termofísicas y de transporte de las mezclas de Fullereno C<sub>60</sub> a una temperatura media de 25°C.**

Fullereno C <sub>60</sub>	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$\mu$ (mPa·s)	$\beta$	$a(K^{-1})$ (10 <sup>-3</sup> )	$D_T$ (m <sup>2</sup> /K·s) (10 <sup>-11</sup> )
0,05%	862,42	0,5576	0,621	1,079	5,435
0,1%	862,65	0,5580	0,608	1,080	3,881
0,15%	862,91	0,5583	0,598	1,080	3,415
0,20%	863,14	0,5587	0,578	1,079	3,398

En la Figura 3.11 se representan los resultados obtenidos de la densidad, la viscosidad dinámica, del coeficiente de expansión máxica y del coeficiente de expansión térmica respectivamente, para las diferentes concentraciones máxicas.



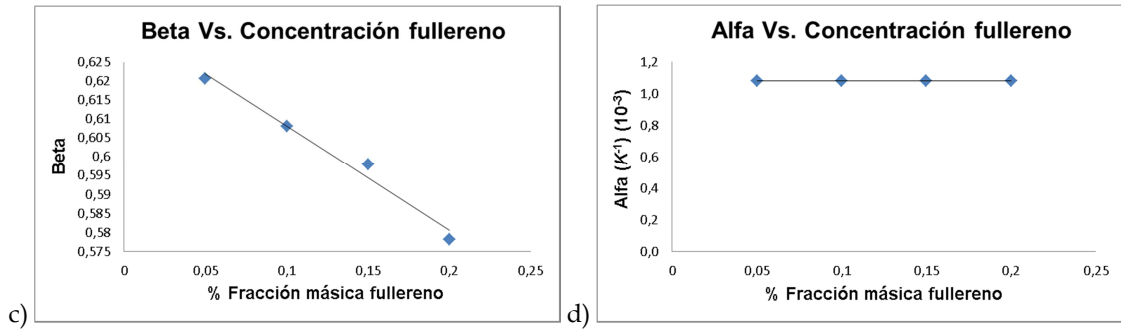


Figura 3.11: Variación de las propiedades termofísicas para la mezcla Tolueno-Fullereno  $C_{60}$  a una temperatura media de  $25^{\circ}C$  y a diferentes concentraciones. a) Densidad, b) Viscosidad, c) Expansión másica y d) Expansión térmica.

Al analizar los resultados, se puede apreciar cómo según se acrecienta la concentración del fullereno en el tolueno, tanto la densidad (Figura 3.11a) como la viscosidad (Figura 3.11b) aumentan de manera lineal. Sin embargo, el coeficiente de expansión másica (Figura 3.11c), tiene una evolución contraria, es decir, disminuye en función de la concentración de fullereno de forma lineal. Por otro lado, el coeficiente de expansión térmica (Figura 3.11d) se mantiene constante, por lo que, es independiente a la concentración de fullereno.

Una vez obtenidas todas las propiedades termofísicas necesarias, se ha determinado el coeficiente de difusión térmica ( $D_T$ ) para las diferentes concentraciones de fullereno. En la Figura 3.12 se representan estos resultados.

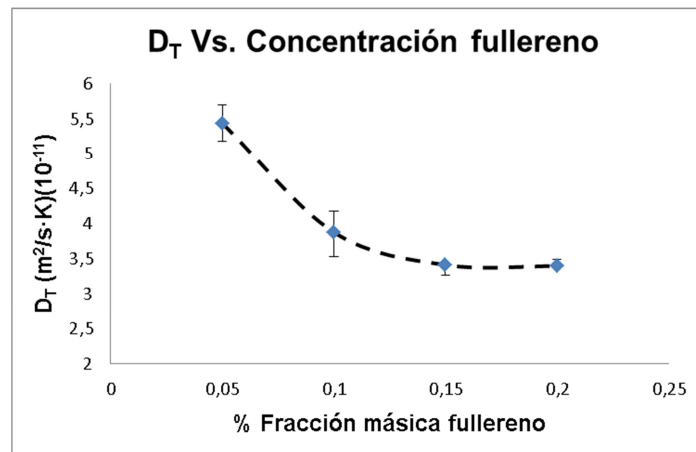


Figura 3.12: Coeficiente de termodifusión en función de la concentración de fullereno a una  $T=25^{\circ}C$ .

Como se puede observar en la Figura 3.12, el valor del coeficiente de difusión térmica es del mismo orden que en mezclas binarias de líquidos comunes. En este caso, el coeficiente de difusión térmica

decrece en función de la concentración, hasta un valor límite, cerca del punto crítico de solubilidad. De la misma manera, se verifica que  $D_T$  es positivo, y por lo tanto, el componente más denso (fullereno  $C_{60}$ ) se dirige hacia la pared fría.

### 3.3.- Observaciones

Al realizar la limpieza interna de la columna de manera exhaustiva, desmontando la CT, se ha verificado que se produce una adhesión de las nanopartículas de fullereno en las paredes internas, especialmente en el lado de la pared fría. Al parecer, la dimensión nanométrica del  $C_{60}$  (10 Å) ha permitido su penetración a través de los poros del aluminio. No obstante, es reseñable confirmar que tras unos ensayos iniciales con resultados ambiguos, los ensayos posteriores han mostrado una gran concordancia, con una desviación inferior al 4% entre experimentos bajo las diferentes condiciones del gradiente de temperatura aplicada. Por lo tanto, se cree que el fullereno ha formado un nanorecubrimiento estable a lo largo de toda la columna, sin capacidad de influencia en los resultados finales. En la Figura 3.13 se puede apreciar el recubrimiento de fullereno.

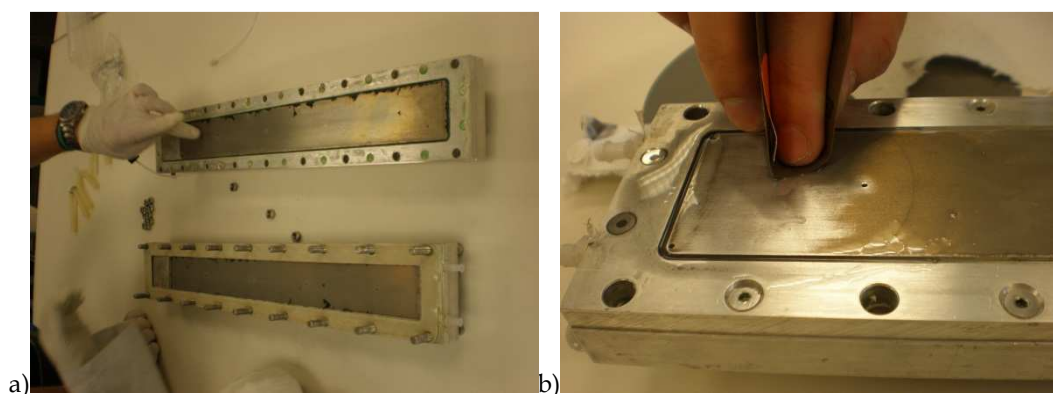


Figura 3.13: Limpieza de la columna a) Paredes internas de la columna recubiertas de fullereno. b) Limpieza de las paredes internas del *gap*.

### 3.4.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C. Ludwig, *Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien Math.-Naturw. Kl.* **20**, pp. 539, (1856).
- [2] Ch. Soret, "Une dissolution saline primitivement homogène", *Archives des Sciences Physiques et Naturelles de Genève.* **3**, pp. 48-61,(1879).
- [3] S. R. de Groot, "L'effet Soret : diffusion thermique dans les phases condensées, *Amsterdam:North - Holland*, (1945).
- [4] L. L. Zheng, D. J. Larson, H. Zhang, "Role of thermotransport (Soret effect) in macrosegregation during eutectic/off-eutectic directional solidification", *J. Cryst. Growth*, **191**(1), pp. 243-251, (1998).
- [5] R. T. Cygan and C. R. Carrigan, "Time-dependent Soret transport: Applications to brine and magma", *Chemical Geology*, **95**, pp. 201-212, (1992).
- [6] M. C. Cross and P. C. Hohenberg, "Pattern formation outside of equilibrium", *Reviews of Modern Physics*, **65**, pp. 851-1112, (1993).
- [7] Ph. Georis, F. Montel, S. Van Vaerenbergh, Y. Decroly, J. C. Legros, "Measurement of the Soret coefficient in crude oil", *European Petroleum Conference, Université Libre de Bruxelles*, 20-22 October, The Hague, Netherlands, (1998).
- [8] S. Van Vaerenbergh, A. Shapiro, G. Galliero, F. Montel, J. Legros, J. Caltagirone, J. Daridon and Z. Saghir, "Multicomponent processes in crudes Benny Elmann-Larsen", *ESA SP-1290, ESTEC, Noordwijk, Netherlands: ESA Publications Division*, ISBN 92-9092-971-5, pp. 202 - 213, (2005).
- [9] A. Firoozabadi, K. Ghorayeb and K. Shukla, "Theoretical model of thermal diffusion factors in multicomponent mixtures" *AIChE J.*, **46**, pp. 892, (2000).
- [10] K. J. Zhang, M. E. Briggs, R. W. Gammon, and J. V. Sengers, "Optical measurement of the Soret coefficient and the diffusion coefficient of liquid mixtures", *J. Chem. Phys.*, **104**, pp. 6881, (1996).
- [11] A. Mialdun and V. Shevtsova, "Measurement of the Soret and diffusion coefficients for benchmark binary mixtures by means of digital interferometry", *J. Chem. Physics*, **134**, pp. 044524, (2011).
- [12] S. Wiegand and W. Köhler, "Measurement of transport coefficients by an optical grating technique", *Lecture Notes Phys.*, **584**, pp. 189-210, (2002).

- [13] J. K. Platten, M. M. Bou-Ali, Dutrieux, "Precise determination of the Soret, thermodiffusion and isothermal diffusion coefficients of binary mixtures of dodecane, isobutylbenzene and 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (contribution of the University of Mons to the benchmark test)", *J. F. Philos. Mag.*, **83**, pp. 2001–2010, (2003).
- [14] P. Blanco, M.M Bou-Ali, J. K. Platten, D. A. de Mezquia, J. A. Madariaga, C. Santamaria, "Thermodiffusion coefficients of binary and ternary hydrocarbon mixtures", *J. Chem. Phys.*, **132**, pp. 114506, (2010).
- [15] M. M. Bou-Ali, J. J. Valencia, J. A Madariaga, C. Santamaria, O. Ecenarro O., Dutrieux, "Determination of the thermodiffusion coefficient in three binary organic liquid mixtures by the thermogravitational method (contribution of the Universidad del País Vasco, Bilbao, to the benchmark test)", *J. F. Philos. Mag.*, **83**, pp. 2011–2015, (2003).
- [16] J. K. Platten, M. Marcoux, A. Mojtabi, "The Rayleigh-Benard problem in extremely confined geometries with and without the Soret effect", *C. R. Mec.*, **335**(9-10), pp. 638-654, (2007).
- [17] J. C. Legros, P. Goemaere and J. K. Platten, "Soret coefficient and the two-component Bénard convection in the benzene-methanol system" *Phys. Rev. A*, **32**, pp. 1903, (1985).
- [18] M. M. Bou-Ali, O. Ecenarro, J. A. Madariaga and C. M. Santamaria, J. J. Valencia, "Measurement of negative Soret coefficients in a vertical fluid layer with an adverse density gradient", *Phys. Rev. E*, **62**(1), (2000).
- [19] S. van Vaerenbergh and J. C. Legros, "Soret coefficients of organic solutions measured in the microgravity SCM experiment and by the flow and Benard cells", *J. Phys. Chem. B*, **102**, pp. 4426, (1998).
- [20] A. Mialdun, C. Minetti, Y. Gaponenko, V. Shevtsova, F. Dubois, "Towards SODI-DCMIX experiments on the ISS: analysis of the thermal performance", submitted to MGST.
- [21] J. K. Platten, M. M. Bou-Ali, P. Costeseque, J. F. Dutrieux, W. Köhler, C. Leppla, S. Wiegand, G. Wittko, "Benchmark values for the Soret, thermal diffusion and diffusion coefficients of three binary organic liquid mixtures", *Philos. Mag.*, **83**, pp. 1965–1971 (2003).
- [22] C. Debuschewitz, W. Kohler, "Molecular origin of thermal diffusion in benzene + cyclohexane mixtures" *Phys. Rev. Lett.*, **87**, pp. 055901, (2001).
- [23] P. Polyakov, J. Luettmmer-Strathmann, S. Wiegand, "Study of the thermal diffusion behavior of alkane/benzene mixtures by Thermal Diffusion Forced Rayleigh Scattering experiments and Lattice model calculations" *J. Phys. Chem. B*, **110**, pp. 26215–26224, (2006).

- [24] P. Blanco, M. M. Bou-Ali, J. K. Platten, J. A. Madariaga, P. Urteaga, C. M. Santamaria, "Thermodifusion coefficient for binary liquid hydrocarbon mixtures", *C. J. Non-Equilib. Thermodyn.*, **32**, pp. 309–317, (2007).
- [25] G. Wittko, W. Kohler, "On the temperature dependence of thermal diffusion of liquid mixtures" *EPL*, **78**, pp. 46007, (2007).
- [26] P. Blanco, M. M. Bou-Ali, J. K. Platten, P. Urteaga, J. A. Madariaga, C. Santamaria, "Determination of thermal diffusion coefficient in equimolar n-alkane mixtures: Empirical correlations" *J. Chem. Phys.*, **129**, pp. 174504, (2008).
- [27] P. Blanco, P. Polyakov, M. M. Bou-Ali, S. Wiegand, "Thermal diffusion and molecular diffusion values for some alkane mixtures: a comparison between thermogravitational column and thermal diffusion forced rayleigh scattering", *J. Phys.Chem. B*, **112**, pp. 8340–8345. (2008).
- [28] J. A. Madariaga, C. Santamaria, M. M. Bou-Ali, P. Urteaga and D. A. De Mezquia, "Measurement of thermodiffusion coefficient in n-alkane binary mixtures: composition dependence", *J. Phys. Chem. B*, **114**, pp. 6937–6942, (2010).
- [29] D. A. De Mezquia, M. M. Bou-Ali, M. Larrañaga, J. A. Madariaga and C. Santamaría, "Determination of molecular diffusion coefficient in n-alkane binary mixtures: empirical correlations", *J. Phys. Chem. B*, **116**(9), pp. 2814–2819, (2012).
- [30] 10th International meeting on thermodifusion (IMT10), 4-8 Junio, Bruselas, Belgica, (2012).
- [31] F. J. Bonner, L. O. Sundelof, "Thermal diffusion as a mechanism for biological transport", *Z, Naturforscher*, **39**, pp. 656–661, (1984).
- [32] A. Bahat, I. Tur-Kaspa, A. Gakamsky, L. C. Giojalas, H. Breitbart, M. Eisenbach, "Thermotaxis of mammalian sperm cells: A potential navigation mechanism in the female genital tract", *Nat. Med.*, **9**, pp. 149–150 (2003).
- [33] P. Blanco, H. Kriegs, M. P. Lettinga, P. Holmqvist and S. Wiegand, "Thermal diffusion of a stiff rod-like mutant y21m fd-virus", *Biomacromolecules*, **12**, pp. 1602–1609, (2011).
- [34] P. Blanco and S. Wiegand, "Study of the Soret effect in monosaccharide solutions", *J Phys. Chem. B.*, **114**(8), pp. 2807–13, (2010).
- [35] P. Blanco, H. Kriegs, B. Arlt and S. Wiegand, "Thermal diffusion of oligosaccharide solutions: the role of chain length and structure", *J. Phys. Chem. B*, **114**, pp. 10740–10747, (2010).

- [36] S. A. Putnam and D. G. Cahill, "Micron-Scale Apparatus For Measurements Of Thermodiffusion In Liquids", *Rev. Sci. Instrum.*, **75**, pp. 2368, (2004).
- [37] S. Duhr, S. Arduini, and D. Braun. "Thermophoresis Of DNA Determined By Microfluidic Fluorescence", *Eur. Phys. J. E*, **15**, pp. 277-286 (2004).
- [38] H. Ning, J. Buitenhuis, J. K. G. Dhont, and S. Wiegand, "Thermal Diffusion Behaviour Of Hard-Sphere Suspensions", *Journal of Chemical Physics*, **125**, p. 204911, (2006).
- [39] E. Ruckenstein, "Can phoretic motions be treated as interfacial-tension gradient driven phenomena" *J. Colloid Interface Sci.*, **83**, pp. 77-81, (1981).
- [40] K. I. Morozov, "Thermal diffusion in disperse systems", *J. Exp. Theor. Phys.*, **88**, pp. 944-946, (1999).
- [41] A. F. Andreev, "Thermophoresis in liquids", *Sov. Phys. JETP*, **67**, pp. 117-120, (1988).
- [42] S. Semenov, M. Schimpf, "Thermophoresis of dissolved molecules and polymers: Consideration of the temperature-induced macroscopic pressure gradient", *Phys. Rev. E*, **69**, pp. 011201, (2004).
- [43] D. Ross and L. E. Locascio, "Microfluidic temperature gradient focusing", *Anal. Chem.* **74**, pp. 2556, (2002).
- [44] D. Braun and A. Libchaber, "Trapping of dna by thermophoretic depletion and convection", *Phys. Rev. Lett.*, **89**, pp. 188103-4, (2002).
- [45] M. Braibanti, D. Vigolo and R. Piazza, "Does thermophoretic mobility depend on particle size?", *PRL*, **100**, pp. 108303, (2008).
- [46] D. Braun and A. Libchaber, "Thermal force approach to molecular evolution", *Phys. Biol.*, **1**, pp. 1-8, (2004).
- [47] T. Demirer, "New advances in stem cell transplantation", *InTech*, ISBN 978-953-51-0013-3, (2012).
- [48] J. R. O'Donnell, A. K. Burnett, T. Sheehan, P. Tansey, and G. A. McDonald, "Safety of dimethylsulphoxide". *Lancet*, **1**, pp. 8218, (1981).
- [49] J. M. Davis, S. D. Rowley, H. G. Braine, S. Piantadosi and G. W. Santos, "Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion", *Blood*, **75**(3), pp. 781-6, (1990).
- [50] J. Davis, S. D. Rowley, and G. W. Santos, "Toxicity of autologous bone marrow graft infusion. Progress in clinical and biological research", *Prog. Clin. Biol. Res.*, **333**, pp. 531-40, (1990).



- [51] D. F. Stroncek, S. K. Fautsch, L. C. Lasky, "Adverse reactions in patient transfused with cryopreserved marrow", *Transfusion*; **31**, pp. 521-6, (1991).
- [52] A. Zambelli, G. Poggi, G. A. Da Prada, "Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion". *Anticancer Res.*,**18**, pp. 4705-4708, (1998).
- [53] J. P. Rodrigues, F. H. Paraguassú-Braga, L. Carvalho, E. Abdelhay, L. F. Bouzas, L. C. Porto, "Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood", *Cryobiology*, **56**(2), pp. 144-5, (2008).
- [54] J.G. Martínez, A.M. Tarazona-Morales, S.C. Pardo-Carrasco, "Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency", *Anim. Reprod.*, **9**(1), p.19-26, (2012).
- [55] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R.E. Smalley, "C60: Buckminsterfullerene", *Nature*, **318** p.162, (1985).
- [56] S. Utsunomiya, K. A. Jensen, G. J. Keeler, R. C. Ewing, "Uraninite and fullerene in atmospheric particles", *Environ.Sci. Technol.*, **36**, pp. 4943-4947, (2002).
- [57] L. Becker, T. E. Bunch, "fullerenes, fulleranes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Allende meteorite", *Meteorit. Planet. Sci.*, **32**, pp. 479-87, (1997).
- [58] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. Avourios (Eds.): "Carbon nanotubes", *Topics in applied physics, Springer - Verlag Berlin Heidelberg*, **80**, pp. 1-9, (2001).
- [59] A. Katz, M. Redlich, L. Rapoport, H.D. Wagner and R. Tenne, "Self-lubricating coatings containing fullerene-like ws2 nanoparticles for orthodontic wires and other possible medical applications", *Tribol. Lett.*, **21**, pp. 135-139, (2006).
- [60] O. Gunnarsson, "Superconductivity in fullerides", *Rev. Mod. Phys.*, **69**, pp. 203-210, (1997).
- [61] R. Signorini, M. Zerbetto, M. Meneghetti, R. BozioM. Maggini, C. D. Faveri, M. Prato, G. Scorrano, "Fullerene derivatives embedded in sol-gel materials for optical limiting", *Fullerene and photonics III*, Eds. Zaky H. Kafafi, ISBN: 9780819422422, **2854**, p. 130, (1996).
- [62] P. Scharff, K. Risch, L. Carta-Abelmann, I. M. Dmytruk, M. M. Bilyi, O. A. Golub, A. V. Khavryuchenko, E. V. Buzaneva, V. L. Aksenov, M.V. Avdeev, Yu. I. Prylutskyy, S.S Durov, S.S., "Structure of C<sub>60</sub> fullerene in water: spectroscopic data", *Carbon*, **42**, pp. 1203-1206, (2004).

- [63] R. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, J.A. Castoro, C. Wilkins, S.H. Friedman, D.L. DeCamp, G.L. Kenyon, "Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes", *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, pp. 6510-6512, (1993).
- [64] H. Friedman, D.L. DeCamp, R.P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, G.L. Kenyon, "Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification," *J. Am Chem. Soc.*, **115**, pp. 6506-6509 (1993).
- [65] L. Qingnuan, X. Yan, Z. Xiaodong, L. Ruili, D. Qieqie, S. Xiaoguang, C. Shaoliang, L. Wenxin, "Preparation of  $^{99m}Tc-C_{60}(OH)_X$  and Its biodistribution studies", *Nucl. Med. Biol.*, **29**, pp. 707-710, (2002).
- [66] M. Mikawa, H. Kato, M. Okumura, M. Narazaki, Y. Kanazawa, N. Miwa, H. Shinohara, "Paramagnetic water-soluble metallofullerenes having the highest relaxivity for mri contrast agents", *Bioconjugate Chem.*, **12**, pp. 510-514, (2001).
- [67] A. Miyamoto, H. Okimoto, H. Shinohara, Y. Shibamoto, "Development Of Water-Soluble Metallofullerenes as X-ray contrast media", *Eur. Radiol.*, **16**, pp. 1050-1053, (2006).
- [68] J. D. Fortner, D. Y. Lyon, C. M. Sayes, A. M. Boyd, J. C. Falkner, E. M. Hotze, L. B. Alemany, Y. J. Tao, W. Guo, K. D. Ausman, V. L. Colvin, and J. B. Hughes, "C60 in Water: Nanocrystal Formation and Microbial Response", *Environ. Sci. Technol.*, **39**, pp. 4307-4316, (2005).
- [69] K. Clusius and G. Dickel, "The separating tube process for liquids", *Naturwissenschaften*. **27**. pp. 149 (1939).
- [70] W. H. Furry, R. C. Jones, L. Onsager, "On the theory of isotope separation by thermal diffusion", *Phys. Rev.*, **55**, pp. 1083-1095, (1939).
- [71] J. Dutrieux, J.K. Platten, G. Chavepeyer, and M.M. Bou-Ali; On the measurement of positive Soret coefficients, *J. Phys. Chem. B*, **106**, pp. 6104, (2002).
- [72] O. Ecenarro, J. A. Madariaga, J. Navarro, C.M. Santamaría, J. A. Carrión and J.M. Savirón, Fickian and "Thermal diffusion coefficients from liquid thermogravitational columns", *J. Phys.: Condens Matter*, **2** pp. 2289-2296, (1990).
- [73] J.J. Valencia, M.M. Bou-Ali, O. Ecenarro, J.A. Madariaga, C.M. Santamaría, "Thermal nonequilibrium phenomena in fluid mixtures", in: S. Wiegand, W. Köhler (Eds.), *Lect. Notes Phys.*, vol. 584, Springer, Berlin, pp. 233-249, (2002).
- [74] J. K. Platten, M. M. Bou-Ali and J. F. Dutrieux, "Enhanced molecular separation in inclined thermogravitational columns", *J. Phys. Chem. B*, **107**, pp. 11763-11767, (2003).

[75] B. Elhajjar, A. Mojtabi, P. Costesèque, M.C. Charrier-Mojtabi, "Separation in an inclined porous thermogravitational cell", *Int. J. Heat Mass Transf.*, **53**, pp. 4844-4851, (2010).



## Capítulo 4

---

# **Diseño, Construcción y Validación de Una Microcolumna Termogravitacional**



## 4. Diseño, Construcción y Validación de Una Microcolumna Termogravitacional

En el capítulo anterior se ha mostrado que con la instalación termogravitacional actual, se pueden estudiar fluidos de carácter biotecnológico. No obstante, la investigación de las mismas puede quedar limitada por las características de dicha instalación, especialmente relacionado con los volúmenes de muestra y los tiempos de ensayo. El coste de muchos fluidos de interés biotecnológico es especialmente elevado. Esto hace imprescindible reducir el volumen de muestra a analizar.

En la última década, se han presentado numerosos estudios sobre la termodifusión en sistemas de suspensiones coloidales sintéticas [1 - 4] como biológicas [5, 6], así como sistemas biológicos no coloidales [7 - 9]. El objetivo esencial de estos estudios es el análisis de los mecanismos de transporte en condiciones de no-equilibrio, con el fin de lograr información sobre las propiedades y las interacciones soluto/ solvente. El conocimiento detallado de los mecanismos de transporte, puede ayudar a mejorar nuestro entendimiento en sistemas biológicos [10]. Así se podrán desarrollar nuevas aplicaciones y diseñar nuevas técnicas capaces de analizar muestras a nivel celular o incluso a niveles inferiores.

En los últimos años, se ha realizado un enorme esfuerzo en el estudio de sistemas biológicos coloidales o no coloidales, así como la aplicación de la termodifusión en la microfluídica. En cuanto a los sistemas biológicos, uno de los que más interés ha suscitado, ha sido el estudio de ADN. En estos trabajos, se ha demostrado cómo con la acción de la termodifusión, unida a la convección, se logra un notable agrupamiento en sitios muy localizados [5]. Este hecho abre las puertas a su integración en posibles dispositivos de concentración bioquímica. Algunos estudios, han señalado a la fuerza térmica como un mecanismo base para el origen de la vida, explicando la posibilidad de que el ADN presente en poros subacuáticos y bajo la influencia térmica, permitiera su confinamiento, replicamiento y consiguiente evolución hacia moléculas más complejas precursoras del inicio de la vida [11, 12]. Por otra parte, la denominada micro-termofóresis, se ha aplicado en estudios sobre las interacciones de pequeñas moléculas o proteínas en buffers o en fluidos biológicos [13]. Estos estudios pueden ser de gran ayuda para identificar nuevos fármacos potenciales. Otros trabajos relacionados con la aplicación de la termodifusión en microfluídica, han demostrado satisfactoriamente la posibilidad de seleccionar coloides bajo gradientes de temperatura [14], así como su manipulación mediante el control de electrolitos específicos [15].

Para poder avanzar en el conocimiento de la termodifusión en los fluidos biológicos, y así poder comprender mejor el comportamiento en sistemas biológicos, es necesaria una teoría sólida que

prediga el comportamiento en este tipo de fluidos bajo gradientes de temperatura. Para poder desarrollar esta teoría, los ensayos experimentales son imprescindibles. Teniendo en cuenta que para el estudio de la física coloidal, típicamente han sido empleadas, como estándar, suspensiones de partículas rígidas, esféricas, sintéticas y monodispersas, y teniendo en cuenta que gran parte de los fluidos de interés biotecnológico son sistemas coloidales, compuestos por proteínas, ARN o ADN, han sido numerables los estudios de la termodifusión sobre este tipo de partículas sintéticas [1 - 3]. De acuerdo con estos resultados, las partículas experimentan un desplazamiento estable desde la pared caliente, hacia la fría, es decir; en dirección opuesta al gradiente térmico. No obstante, se ha demostrado que existe una dependencia del sistema a la temperatura media de los ensayos. El sistema tiende a comportarse positivamente (las partículas se dirigen hacia la pared fría), hasta una temperatura dada ( $T_{\text{crítica}}$ ). Por debajo de esta temperatura, su comportamiento cambia drásticamente y el movimiento de los coloides toma la dirección opuesta [2, 3, 16]. Este comportamiento también ha sido observado en sistemas coloidales biológicos de ADN [16] y proteínas [6, 17]. De la misma manera, también se ha analizado experimentalmente la dependencia del coeficiente de termodifusión en función del tamaño [3, 16, 18], y a la concentración [2, 16]. En muestras biológicas no coloidales, de azúcares, también se ha conseguido determinar el comportamiento de la termodifusión en función de la concentración y la temperatura tanto para azúcares simples como complejos [7- 9].

A continuación, se va a realizar un pequeño resumen de las técnicas más empleadas en el estudio termodifusivo de sistemas coloidales sintéticos y biológicos, así como sistemas biológicos no coloidales.

#### **4.1.- Dispositivos de análisis de termodifusión mediante sistemas ópticos**

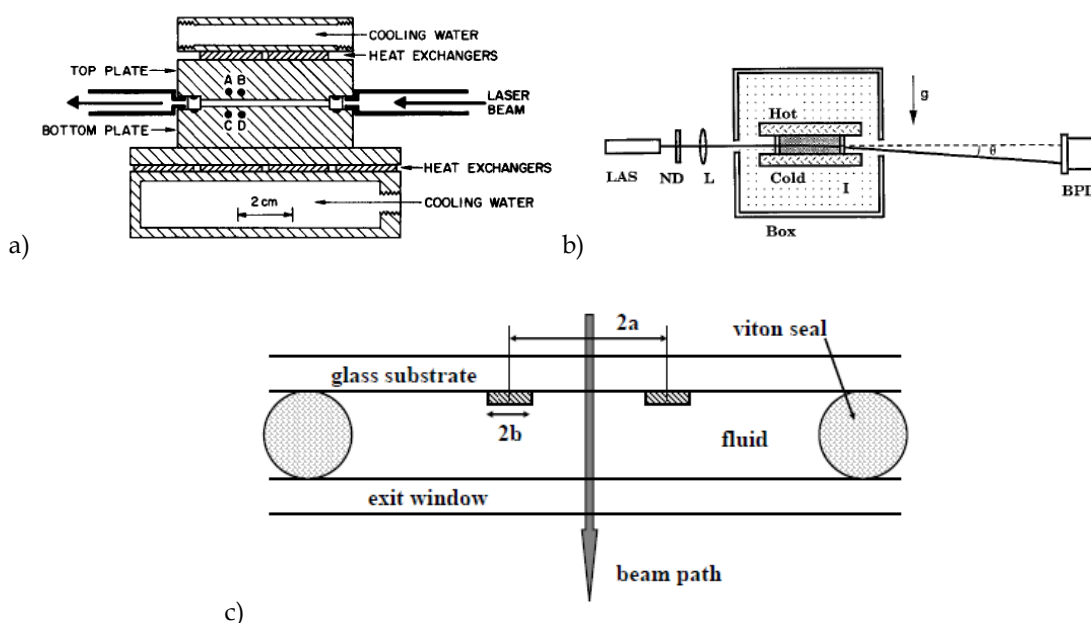
Como se ha comentado anteriormente, para el estudio experimental de la termodifusión en muestras de interés biotecnológico, se han tenido que modificar y adaptar gran parte de las técnicas empleadas para el análisis de la termodifusión en fluidos. Esto se ha debido al bajo coeficiente de difusión molecular de las partículas, lo que ha originado unos tiempos de relajación excesivamente elevados. Además, el excesivo coste de muestras biológicas, ha obligado a miniaturizar los dispositivos de medición. En este apartado, se van a analizar los diferentes dispositivos empleados, y su adaptación para el análisis de este tipo de mezclas.

##### **4.1.1.-Deflexión de rayo láser (BD)**

Esta técnica hace uso de la relación existente entre índice de refracción ( $nD$ ) de una muestra y la concentración ( $c$ ). Para realizar un análisis de una muestra, se hace pasar un haz láser a través de una célula transparente, donde se encuentra la muestra. Al aplicar el gradiente de temperatura en



dirección de la aceleración gravitacional, se produce una deflexión del haz debido al cambio de la temperatura y a consecuencia del cambio de concentración producido. Con un detector sensible al desplazamiento, se analiza el cambio de ángulo del láser ocasionado por el cambio del índice de refracción. Mediante esta técnica, se pueden realizar los experimentos in-situ; es decir, sin necesidad de extraer la muestra. En los dispositivos más convencionales, el gradiente de temperatura se impone mediante baños termostáticos empleando termoresistencias integradas dentro del dispositivo (Figura 4.1a y b) [19, 20], mientras que se ha demostrado que disminuyendo la altura de la célula y empleando termoresistencias integradas dentro de la muestra, el tiempo de ensayo disminuye y la precisión de la medida mejora (Figura 4.1c) [21].



**Figura 4.1:** Diferentes dispositivos BD. a) y b) con sistema de generador del gradiente de temperatura externos, c) con sistema interno basado en resistencias integradas y miniaturizado.

Cuando se aplica el gradiente de temperatura, el haz láser flexiona rápidamente debido al cambio de temperatura y posteriormente, de manera más suave, debido al cambio de concentración relacionado a la termodifusión, hasta llegar a un estado estacionario. El tiempo necesario para llegar al estado estacionario se define como  $t = h^2 / (\pi^2 \cdot D)$ , donde  $h$  es la altura del *gap*. Ya que los coloides tienen un coeficiente de difusión molecular muy inferior al de los líquidos convencionales, el tiempo de análisis sería demasiado elevado. Por ello, la solución es disminuir la altura de la célula. No obstante, esto requiere sistemas de control de temperatura muy sensibles y de alta resolución. Esto se ha conseguido mediante la miniaturización de la célula, donde la altura se ha disminuido desde 1,5mm hasta las 300 $\mu$ m (Figura 4.2) [3]. El gradiente de temperatura se aplica calentando alternativamente

un par de resistencias fabricadas mediante láminas de oro separadas 25  $\mu\text{m}$ . La limitación de este dispositivo, viene de la imposibilidad de emplear poblaciones coloidales inferiores al 3% de fracción volumétrica, ya que la señal obtenida es del mismo orden que el ruido del sistema.

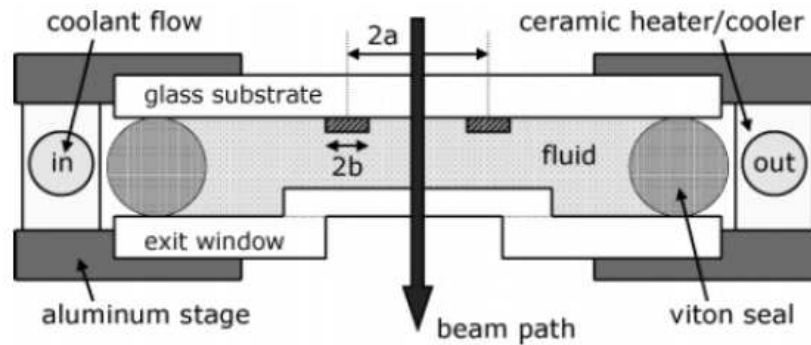


Figura 4.2: Microcélula *Beam Deflection* [3].

#### 4.1.2.-Thermal diffusion forced Rayleigh scattering (TDFRS)

Este método de análisis óptico emplea un láser para generar un gradiente de temperatura y otro para el análisis. Al igual que en el caso anterior, la muestra se introduce en una célula transparente y su análisis se realiza "in-situ". Para que el láser que incide sobre la muestra pueda crear una diferencia de temperatura, ésta debe absorber la energía del láser. Para solucionar este problema, se introduce una tinta en el interior de la muestra. Ésta es una de las desventajas de este método, ya que esta tinta puede alterar la naturaleza de la muestra. Para generar el gradiente de temperatura en este sistema, el haz láser se divide en dos rayos para que a continuación incida por partida doble sobre la muestra con un ángulo  $\theta$  entre ambos (Figura 4.3). De esta manera, se genera una rejilla de temperaturas (frío-calor-frío-calor) espaciadas por una distancia que se determina con  $\theta$ . Esta rejilla de temperaturas, genera otra rejilla de diferente índice de refracción debido a la difusión térmica. Esto se analiza mediante un segundo láser, el cual determina la intensidad de la difracción a lo largo del tiempo de ensayo, determinando  $D$  y  $S_T$  [22]. En la Figura 4.3 se puede apreciar el esquema de este método de análisis.

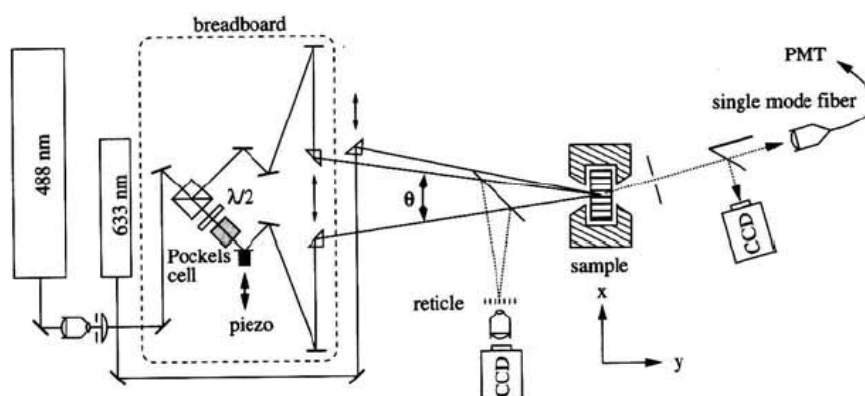


Figura 4.3: Esquema del método de análisis del TDFRS.

Este método, al necesitar alternar el gradiente de temperatura para poder analizar el efecto termodifusivo, genera convecciones que en mezclas líquidas es despreciable, ya que el tiempo de ensayo es pequeño. Sin embargo, en sistemas coloidales, debido al bajo coeficiente de difusión molecular, el tiempo de ensayo es elevado, por lo que las perturbaciones pueden ser importantes.

#### 4.1.3.-Seguimiento de los coloides por fluorescencia

Este método de análisis, emplea únicamente microscopios ópticos de fluorescencia para determinar el desplazamiento de las partículas ocasionado por un gradiente de temperatura [23]. Para el control del gradiente de temperatura, se emplea un tinte fluorescente, cuya fluorescencia es sensible a la temperatura. No obstante, al ser baja la sensibilidad de esta tinta, para poder determinar el gradiente de temperatura correctamente, se necesita una gran diferencia de temperatura. Este gradiente se genera mediante un haz láser que es absorbido por la muestra. En este caso, como el haz láser incide directamente, el gradiente de temperatura es local en el punto exacto donde incide el láser. Debido a la sensibilidad de los sistemas ópticos de fluorescencia, se puede analizar el gradiente de concentración en función de la intensidad de la fluorescencia, incluso en sistemas diluidos; de hecho, se puede analizar el movimiento de tan solo una partícula [16]. Una de las grandes ventajas de este sistema, es que no se necesitan dispositivos sofisticados (Figura 4.4). Con un simple capilar, es suficiente para realizar un estudio experimental. Sin embargo, el gran inconveniente de este método, es la obligación de emplear partículas autofluorescentes o inducidas mediante un tinte y la imposibilidad de analizar sistemas biológicos no coloidales.

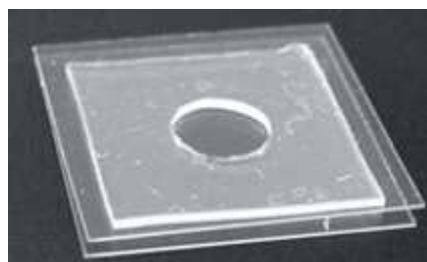


Figura 4.4: Dispositivo para el estudio de ADN mediante la técnica de seguimiento de coloides por fluorescencia.

#### 4.1.4.-Termofóresis a micro escala (MST)

Este sistema emplea el mismo principio que el anterior. La única diferencia es que se ha disminuido la focalización, con lo que se ha conseguido la posibilidad de emplear capilares de volúmenes de 500nl y además, tiene la posibilidad de realizar múltiples ensayos de manera consecutiva (Figura 4.5a) [13]. Es la única técnica que se ha comercializado hasta la fecha para el análisis de interacciones biomoleculares bajo el efecto de la termodifusión (Monolith NT - NanoTemper). Como se puede observar en la Figura 4.5b, analiza la separación de los coloides midiendo la intensidad de la fluorescencia. Entre sus grandes ventajas, está la rapidez de análisis. Al igual que en el caso anterior, solo sirve para sistemas coloidales fluorescentes.

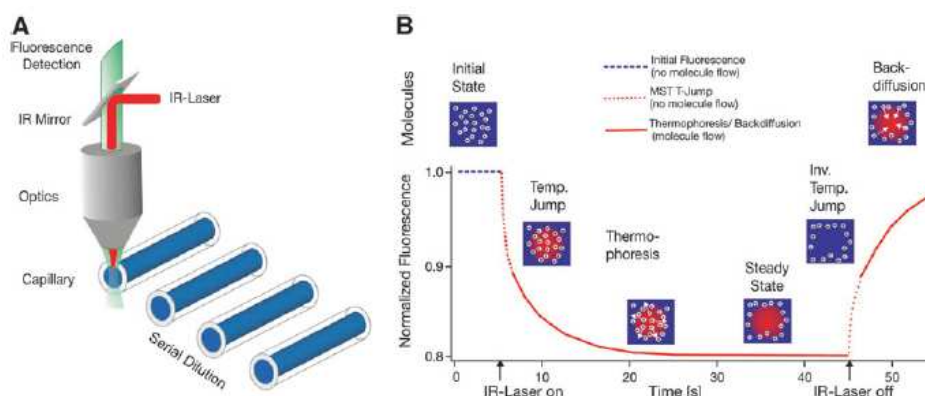


Figura 4.5: Micro Scale Thermophoresis (MST). a) Esquema del dispositivo, b) análisis de los resultados [24].

#### 4.2.- Microcolumna Termogravitacional ( $\mu$ CT)

Paralelamente a estos desarrollos, en esta tesis doctoral se va a proyectar el desarrollo de una nueva instalación termogravitacional basada en una microcolumna de termodifusión. Mediante esta nueva instalación, se va a aprovechar de forma positiva la convección, al contrario de lo que sucede en los

sistemas anteriores, ya que actúa de forma negativa. Al mismo tiempo, se van a poder analizar sistemas muy diluidos, por la gran capacidad de separación del efecto termogravitacional. Al miniaturizar la columna termogravitacional, también se tendrá que diseñar un sistema de medición basado en sistemas ópticos, ya que el método habitual de extracción es inviable debido al escaso volumen de muestra que se necesita para su análisis. El diseño, construcción y validación se ha realizado en colaboración con el grupo de la Profesora Simone Wiegand del centro Forschungszentrum Jülich GmbH, Alemania.

### 4.3.- Relación de aspecto

La descripción de la teoría termogravitacional base fue primeramente desarrollada por Furry, Jones y Onsager (FJO) [25] tal y como se ha comentado en el apartado 3.1. Posteriormente fue aplicada en mezclas líquidas [26], en la cual se podía determinar el coeficiente de termodifusión de una mezcla en estado estacionario, a partir de medidas de separación [27]. No obstante, recientes trabajos han demostrado los límites de validez de esta teoría [28 - 30], ya que depende de la naturaleza de la mezcla a estudiar y de la relación de aspecto de la geometría del dispositivo [28]. De este trabajo, se extrae la relación adimensional que debe satisfacer la técnica termogravitacional, para ser viable la determinación del coeficiente de termodifusión a partir de medidas de separación en el estado estacionario:

$$Gr \cdot Sc \leq 1000 \cdot A \quad (4.1)$$

Donde  $G_r$  es el número de Grashof  $Gr = g\alpha L_x^3 \Delta T / \nu^2$ ,  $S_c$  el número de Schmidt  $Sc = \nu / D$ , y  $A$  es la relación de aspecto, donde  $A = L_z / L_x$ .

De acuerdo con la relación de la ecuación (4.1), y las ecuaciones de la separación (3.2) y el tiempo de relajación de la columna (3.3), se debe conseguir un compromiso entre  $L_z$  y  $L_x$ , para lograr tiempos cortos de ensayo y a la vez, separaciones grandes dentro de los límites de validez de la teoría de FJO.

Como primer prototipo para determinar la relación de aspecto de la  $\mu$ CT, se han tenido en cuenta en este estudio, las mezclas del Benchmark de Fontainebleau [31], así como las limitaciones en cuanto a la mecanización y la construcción de la microcolumna. De acuerdo con los resultados, el *gap* elegido ha sido de dimensiones:  $L_x = 500\mu m$ ,  $L_z = 30mm$  y  $L_y = 3mm$ , lo que constituye un volumen de muestra de  $45\mu L$ . Esto supone un ahorro de muestra respecto a la columna plana actual (25ml) de 99,82%. En la Tabla 4.1 se muestran los valores de separación, tiempo de equilibrio así como la relación de la ecuación (4.1) aplicados a la nueva relación de aspecto analizados para el nuevo *gap*. En el caso de los coloides, se ha tomado el valor de  $D_T = 2 \cdot 10^{-12} (m^2/K \cdot s)$  [18] para los diferentes

tamaños, mientras que la concentración propuesta para ese cálculo, ha sido del 2% en fracción másica en H<sub>2</sub>O.

**Tabla 4.1: Tiempos de equilibrio de la separación estacionaria, separación,  $Gr \cdot Sc$  y  $1000 \cdot A$  para las diferentes mezclas y para diferentes diámetros de coloides correspondiente a la relación de aspecto  $Lx = 500\mu m$ ,  $Lz = 30mm$  y  $Ly = 3mm$  de la microcolumna diseñada.**

Diámetro Coloide (nm)	5*Tr (h)	$\Delta c$	$Gr \cdot Sc$	1000 · A
1	7,29	0,00338	3604,8	60000
10	0,73	0,00338	36047,6	60000
16	0,46	0,00338	57676,2	60000
THN-nC12 al 50%	3,11	0,07363	4877,6	60000
IBB-nC12 al 50%	2,57	0,03392	4339,8	60000
THN-IBB al 50%	3,04	0,02954	4215,6	60000
Tol-hexa 51,67%	0,65	0,03480	4846,0	60000

Tal y como se puede observar en la Tabla 4.1, todos los sistemas analizados cumplen con la condición del límite de validez de la teoría de FJO.

#### 4.4.- Diseño de la $\mu CT$

El primer paso para la construcción de la microcolumna, ha sido realizar un estudio para determinar el material apropiado para cada uno de los elementos necesarios. A continuación, se describen las necesidades de cada componente y el material empleado.

##### 4.4.1.-Elección del material

**Gap:** El material para la realización del *gap*, ha de ser un buen aislante térmico y no dilatante, ya que debe aislar la parte caliente de la parte fría y no debe sufrir ninguna deformación importante bajo las condiciones térmicas de trabajo. De la misma manera, tiene que tener una buena resistencia química, para que sus propiedades no se alteren con los fluidos que se vayan a emplear, tanto el que va a ser analizado, como el que se emplee para la limpieza. Teniendo en cuenta estas características, se ha determinado que el material sea un polímero especial; en concreto, Polieteretercetona (PEEK), con una baja conductividad térmica (0,25W/mK) [32], una baja expansión térmica también ( $50 \cdot 10^{-6} K^{-1}$ ) [33] y una gran resistencia química.

**Ventana de medición:** La ventana que se va a emplear para la medición mediante el sistema óptico, debe ser ópticamente transparente en el rango visible. De la misma manera, debe ser resistente a los fluidos con los que va a estar en contacto. Además, como se ha decidido que el gradiente de temperatura se aplique en la dirección de incidencia del haz láser, se necesita que estas ventanas sean buenas conductoras térmicas. Teniendo en cuenta estas características, se ha

determinado que el mejor de los materiales es el zafiro, cortado en el plano y dirección C (0001) y con un pulido óptico para que no genere ningún tipo de distorsión en las medidas. Además, su conductividad térmica alcanza hasta 34W/mK [34].

**Elemento de sellado:** Las placas de zafiro, conjuntamente con el aislante, deben delimitar el volumen de la cavidad interna (*gap*). Para que el fluido no fugue del volumen interior, es necesario que un cuerpo presione el zafiro hacia el aislante para que el volumen sea estanco. De la misma manera, debe transmitir el calor a la ventana de zafiro. Para este fin, se ha optado por el cobre, debido a su buena conductividad térmica y fácil maquinabilidad.

**Tapa exterior:** Para la generación del gradiente de temperatura, se van a emplear baños termostáticos. Estos baños bombean agua atemperada hacia las tapas exteriores, por donde debe circular el agua por su interior. El flujo de agua debe circular desde la parte inferior hacia la superior. Estas tapas deben estar en contacto directo con los elementos de sellado, para transmitir la temperatura del agua hacia el zafiro y generar el gradiente de temperatura en el seno de la mezcla. Este material ha de ser buen conductor térmico y con buena resistencia química, ya que está expuesto a posibles derrames de los fluidos a analizar, y de los fluidos de limpieza, además de ser resistente a la corrosión. Para este material, se ha pensado en acero inoxidable de alta resistencia a medios corrosivos.

Una vez identificados los materiales, se ha realizado tanto el diseño de cada pieza, como el montaje del dispositivo. A continuación, se muestra en qué consiste cada parte del dispositivo.

#### 4.4.2.-Descripción de los componentes de construcción

##### *Gap*

En la Figura 4.6, se puede ver el diseño del aislante, donde se observa la cavidad para generar el *gap*, así como la cajera donde irán apoyados los zafiros (Figura 4.6a). Por otro lado, se aprecia un orificio, por donde mediante una jeringuilla, se introduce la mezcla al interior. Los doce agujeros laterales, son para el montaje final de sellado mediante tornillería. Debido a la delgadez del *gap* (500 $\mu$ m), se ha tenido que diseñar un sistema de llenado específico, en donde el fluido llena la cavidad, a través de una hendidura que discurre entre el zafiro y el propio aislante (Figura 4.6b). Para poder medir el gradiente de temperatura, se emplean termopares PT100, con los que se mide la temperatura del zafiro, a través de unos orificios laterales. En la Figura 4.6b, se aprecia un detalle del corte del aislante, donde se puede observar el sistema de llenado, así como los orificios laterales para la medición de la temperatura.

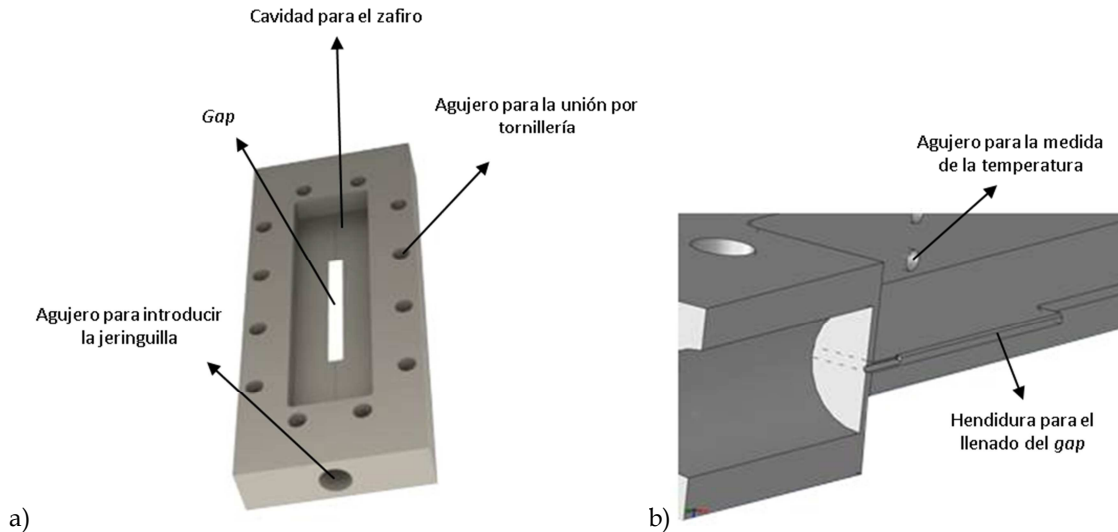


Figura 4.6: Aislante. a) Modelo completo del aislante. b) Detalle del corte del sistema de llenado.

### *Ventana de medición*

La ventana de medición está fabricada de zafiro, cortada en el plano C (0001), para garantizar su transparencia. Sus dimensiones son de 15mm x 60mm x 1,25mm. Son las mismas medidas de la caja realizada en el aislante. Se ha decidido este tamaño, ya que es lo suficientemente grande para que no se generen fugas desde el *gap*.

### *Elemento de sellado*

El elemento de sellado dispone de una ranura central por donde lo atraviesa el láser. Dicha ranura es de 30mm de longitud, para poder hacer mediciones a lo largo de todo el *gap*, y de 2mm de anchura, para que el rayo del láser pase en toda su totalidad. El elemento de sellado, una vez montado el dispositivo, por una parte, está en contacto con el aislante y el zafiro, y por el otro, con el flujo de agua que discurre a través de la tapa exterior. En la Figura 4.7 se puede apreciar su geometría.

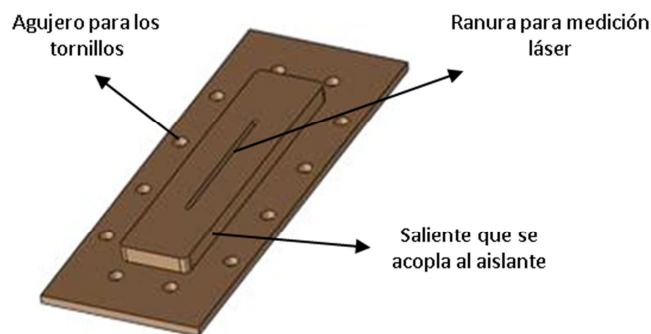
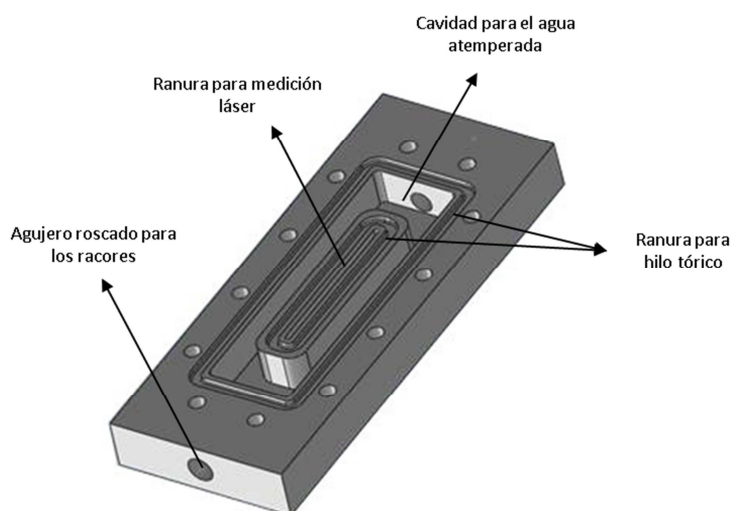


Figura 4.7: Elemento de sellado.



### *Tapa exterior*

La tapa exterior, es por donde transcurre el agua encargada de crear la diferencia de temperatura. Por ello, aparte de la ranura para que pase el haz del láser, también tiene mecanizada la cavidad necesaria para que discurra el agua, así como los surcos para los elementos de estanqueidad (hilo tórico) (Figura 4.8). Además, para unir los racores, por donde se introduce el agua a su interior, se han mecanizado dos agujeros roscados; uno en la parte inferior, y otro, en la superior. En la Figura 4.8 se puede apreciar la geometría de la tapa exterior.



**Figura 4.8: Geometría de la tapa exterior.**

### *Montaje completo*

En la Figura 4.9 se puede observar el dispositivo final desmontado (Figura 4.9a) y una vez realizado el montaje completo (Figura 4.9b). Tal y como se puede apreciar, la unión entre todos los componentes está realizada mediante tornillería. Las dimensiones finales exteriores son de 90mm x 35mm x 32mm. El dispositivo ha sido diseñado para que la muestra sea introducida desde la parte inferior, mediante una jeringuilla (Figura 4.10). Para evitar la formación de burbujas, la muestra debe introducirse de manera suave, hasta que rebose por la salida superior.

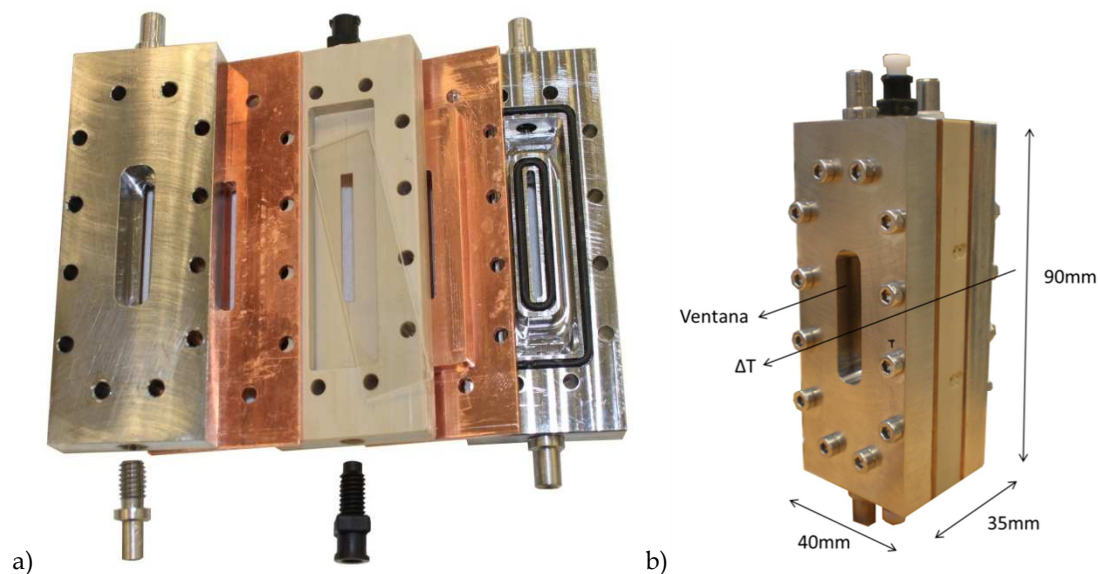


Figura 4.9: Dispositivo final de la microcolumna. a) Desmontado, b) ensamblado.

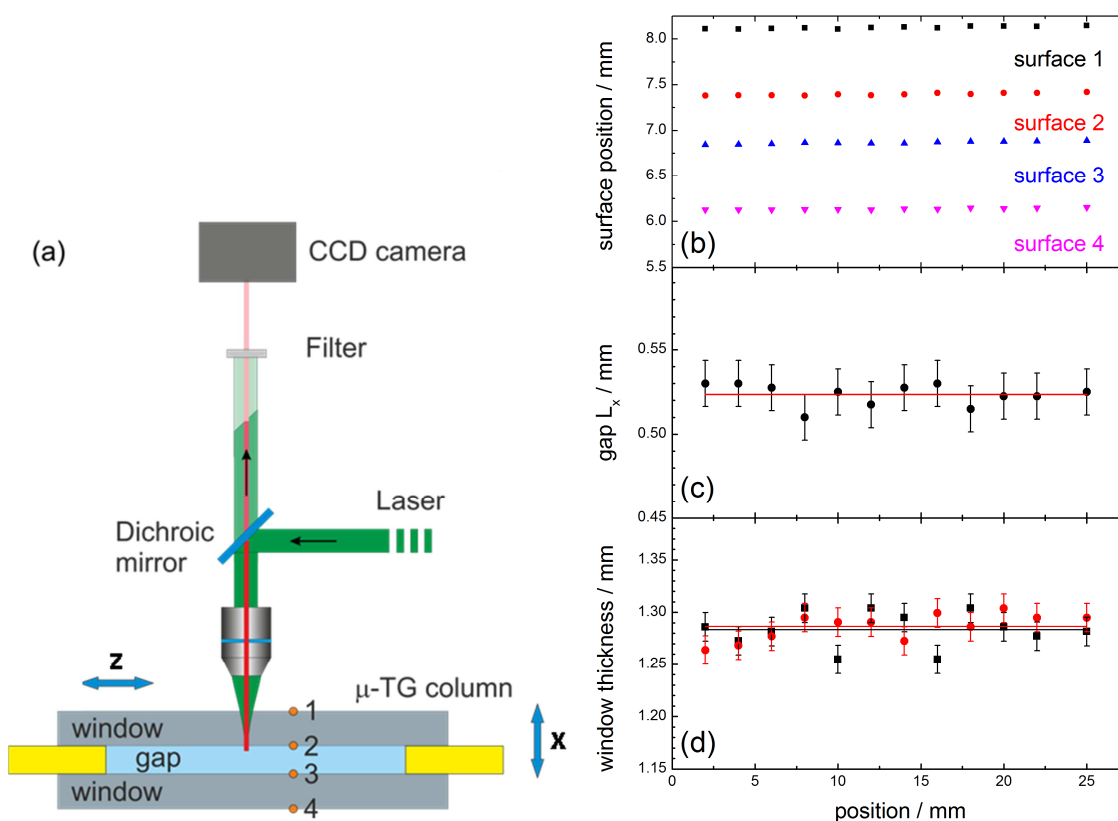


Figura 4.10: Sistema de llenado de la microcolumna.

#### 4.5.- Determinación experimental de las dimensiones del *gap*

La  $\mu$ CT construida, al tener una ventana de visualización hacia el *gap*, brinda una excelente oportunidad para determinar las dimensiones del *gap* experimentalmente. Este parámetro, es muy relevante en la determinación del coeficiente de termodifusión (ecuación (3.5)). El método habitual para determinar el espesor del *gap*, una vez estudiada la no-asimetría del mismo, es realizar medidas del coeficiente de termodifusión de varias mezclas; preferentemente, al menos, las más contrastadas en la bibliografía. De la desviación de estas medidas, se corrige el valor  $Lx$ . En este caso, la

determinación del mismo, se realiza con un sistema óptico, mediante la técnica “*Optical Tweezer*” (Figura 4.11a).



**Figura 4.11: Medición del *gap* mediante “*Optical Tweezer*”. a) Set-up, b) medidas de cada una de las superficies, c) grosor del *gap* y d) grosor de los zafiros.**

La anchura del *gap* de la microcolumna se ha determinado mediante una configuración de microscopio en el centro de Jülich, dentro del marco de colaboración MGEP-Jülich. Se enfoca un haz de sondeo en la superficie y detecta la señal reflejada. El objetivo (10X Mitutoyo) utilizado tiene una larga distancia de trabajo de 33,8 mm y una profundidad de enfoque muy pequeña, de 3,58 micras. En la Figura 4.11a se representa un esquema del principio de funcionamiento. Cuando el haz se enfoca en una cara, el haz reflejado se convierte en un punto de gran intensidad, teniendo su valor máximo cuando refleja desde la superficie de la cara. Se graba el cambio de enfoque desde una cara a otra, mediante un elevador. En la Figura 4.11b se muestra la posición de las cuatro superficies en función de la altura, mientras que en la Figura 4.11c y Figura 4.11d se muestran el espesor del *gap*,  $L_x$  y el espesor de las ventanas de zafiro, respectivamente. Con este método se ha determinado que el espesor promedio de la microcolumna es de  $523\mu\text{m} \pm 4\mu\text{m}$ .

## 4.6.- Validación numérica

A fin de validar la geometría propuesta para la  $\mu$ CT, se ha realizado un estudio numérico utilizando el software ANSYS-Fluent [35]. Las simulaciones se han realizado utilizando un método basado en volúmenes finitos en 3D (FVM) de CFD (*Computational Fluids Dynamics*). Se asume que el fluido es incompresible y el flujo es laminar a presión atmosférica. La resolución de las ecuaciones se ha realizado mediante un método implícito con un esquema de acoplamiento sencillo velocidad-presión y con un módulo de doble precisión. Para evitar inestabilidades, se ha utilizado una discretización de segundo orden para la presión, densidad, velocidad, flujo de masa y energía. El criterio de convergencia residual de todas las variables se ha establecido en un orden de magnitud de  $10^{-9}$ . Para el pre-procesado de la geometría se ha empleado el software Gambit [36], donde se ha generado la geometría del *gap* ( $523\mu\text{m} \times 3\text{mm} \times 30\text{mm}$ ). Este dominio computacional en 3D, consiste en un malla con celdas hexahedrales no uniformemente espaciadas. Se ha empleado una resolución de malla muy fina de 720000 celdas para tener una representación realista de los gradientes de concentración. El modelo considera la difusión molecular de mezclas binarias bajo la ley de Fick, así como la termodifusión mediante el modelo "Species Transport", mientras que los cambios de densidad en el fluido, con la concentración y temperatura, están cubiertos por la aproximación de Boussinesq, tal y como se describe en la ecuación (4.2) [37]:

$$\rho = \rho_0(1 - \alpha(T - T_0) + \beta(c - c_0)) \quad (4.2)$$

Donde  $\rho$  es la densidad en cada celda,  $\rho_0$  es la densidad de la mezcla homogénea,  $T$  la temperatura en cada celda y  $T_0$  es la temperatura media. Los valores de los coeficientes de expansión másica y térmica se determinan experimentalmente. Se ha aplicado la condición de "no-slip" en las paredes y la diferencia de temperatura aplicada ha sido de 5K, perpendicular a la gravedad.

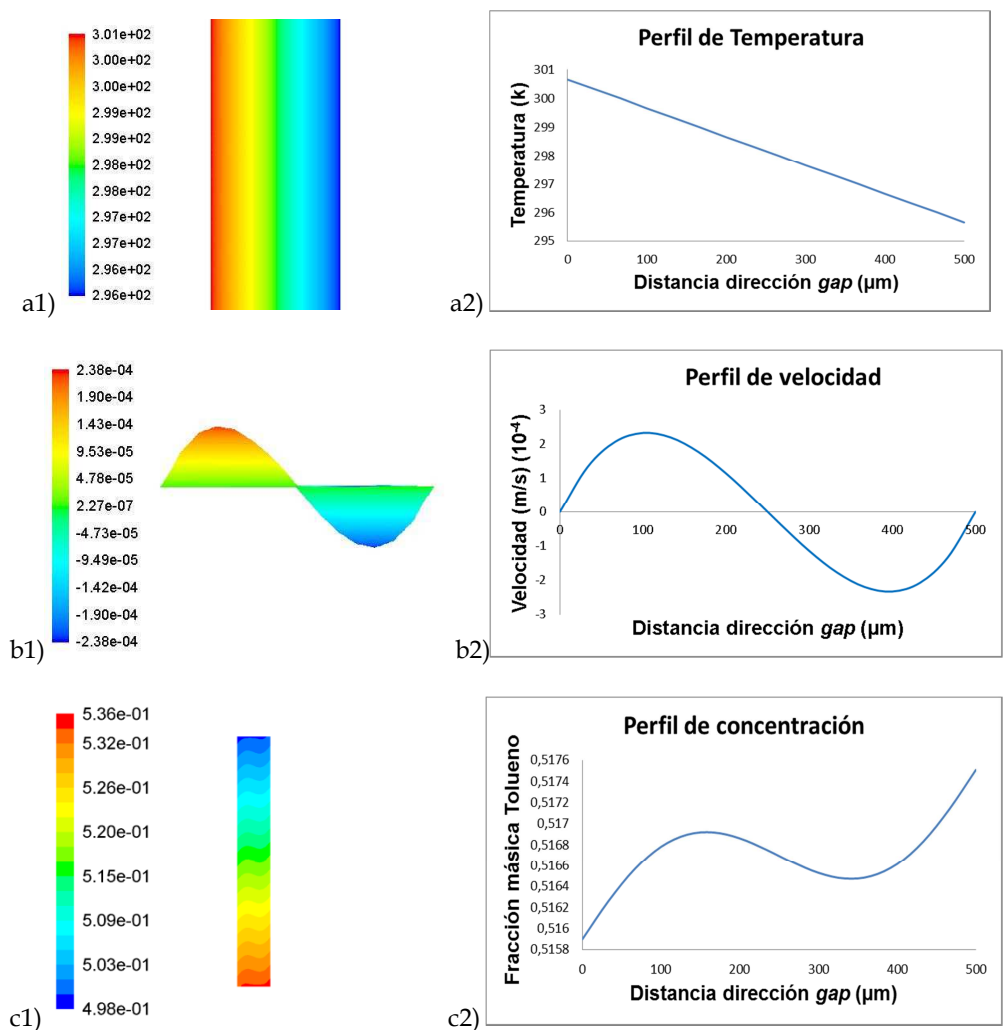
### 4.6.1.-Resultados numéricos

Para la validación numérica de la  $\mu$ CT, se ha analizado el efecto de la termodifusión en estado estacionario, utilizando un fluido de referencia, Tolueno-hexano a una fracción másica de tolueno de 51,67% y a una  $T=25^\circ\text{C}$ . En la Tabla 4.2 se muestran todas las propiedades termofísicas de la mezcla de tolueno-hexano que se ha utilizado en la validación numérica [19, 27, 38]. En la referencia [38] solo han medido los coeficientes de termodifusión y difusión molecular a  $T= 23^\circ\text{C}$  y mayores temperaturas por lo que para determinar  $D_T$  y  $D$  a  $T=25^\circ\text{C}$  se ha realizado una interpolación lineal.

**Tabla 4.2: Propiedades termofísicas y de transporte de la mezcla tolueno-hexano a una fracción másica de 51,67% de tolueno a T=25°C.**

$\rho(\text{kg/m}^3)$	$\mu(\text{mPa}\cdot\text{s})$	$\beta (10^{-1})$	$a(\text{K}^{-1}) (10^{-3})$	$D (\text{m}^2/\text{s})(10^{-9})$	$D_T (\text{m}^2/\text{K}\cdot\text{s}) (10^{-11})$
748,19	0,3861	0,275	1,23	2,78 [19]	13,7 [19]
				2,85 [38]	13,2 [27]
					14,0 [38]

En la Figura 4.12 se muestran los resultados numéricos en cuanto al perfil de temperatura (a1 y a2), velocidad (b1 y b2), concentración (c1 y c2) y la distribución de la concentración vertical a lo largo de toda la  $\mu\text{CT}$  (d1 y d2) en el estado estacionario. Como se puede apreciar, los perfiles obtenidos en la  $\mu\text{CT}$  son los predichos por la teoría termogravitacional [28, 30]. Aunque de magnitud, como en el caso del perfil de velocidad, es de un orden inferior, en comparación al comportamiento termohidrodinámico de las columnas de termodifusión estándar [30].



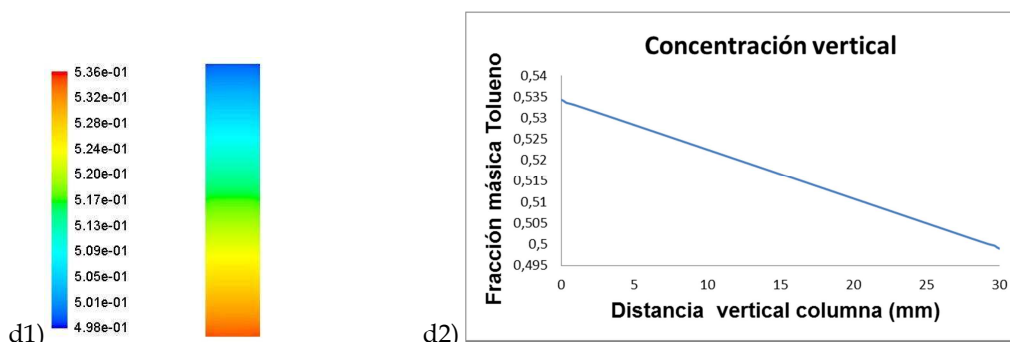


Figura 4.12: Resultados de la simulación numérica para la mezcla binaria tolueno-hexano en estado estacionario. (a) Perfil de temperatura dentro del *gap* de la microcolumna. (b) Perfil de velocidad dentro del *gap* de la microcolumna a una altura de 15mm. (c) Perfil de la fracción másica de tolueno dentro del *gap* de la microcolumna a una altura de 15mm. (d) Distribución de la concentración vertical del tolueno en la mitad del *gap* a lo largo de la microcolumna.

La Tabla 4.3 resume los resultados de la simulación numérica y compara la diferencia de la separación y del coeficiente de termodifusión en el estado estacionario con los valores experimentales. Los resultados de la simulación concuerdan con los valores experimentales dentro de un pequeño porcentaje menor al 1% respecto a la media de los valores experimentales. La excelente afinidad entre los resultados de la simulación y los valores experimentales, determina que el diseño cumple con las condiciones de la teoría FJO.

Tabla 4.3: Comparación entre los resultados numéricos y los de la bibliografía para la mezcla tolueno - hexano a una fracción másica de 51,67% de tolueno y  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

$\Delta C_{\text{Ecuación (3.2)}}$ $Lz = 22\text{mm}$	$\Delta c_{\text{fluent}}$ $Lz = 22\text{mm}$	Desviación (%)	$D_{\text{Texp}} (m^2/K \cdot s)$ ( $10^{-12}$ )	$D_{\text{Tfluent}} (m^2/K \cdot s)$ ( $10^{-12}$ )	Desviación (%)
0,0258	0,0257	<1	13,6 [media 19, 27, 38]	13,56	<1

Adicionalmente, se ha analizado numéricamente el efecto sobre la diferencia de concentración causada por los volúmenes muertos de los canales de entrada y salida. Los volúmenes muertos considerados son del orden de 3,625  $\mu\text{l}$  proveniente de los canales de entrada y salida de diámetro de 250  $\mu\text{m}$  y 14,5 mm de longitud. La Figura 4.13 muestra el modelo utilizado.

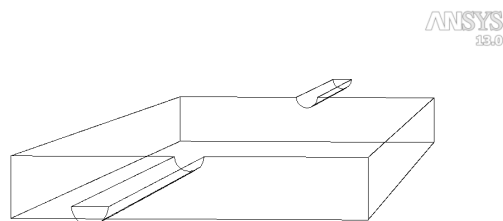


Figura 4.13: Modelo del *gap* con los conductos de entrada y salida.

Como se muestra en la Tabla 4.4, la diferencia de concentración obtenida a partir de la simulación  $\Delta c_{fluent}$  coincide dentro del 1% con la diferencia de concentración calculada,  $\Delta c_{Ecuación (3.2)}$ . Los coeficientes de termodifusión determinados para las mezclas de Tolueno-hexano, THN-IBB, IBB-C12 y THN- C12 a una fracción de masa del 50% y a  $T = 25^{\circ}\text{C}$  coinciden, dentro de un pequeño error, con los resultados numéricos obtenidos para un *gap* de  $523\mu\text{m}$  e incluyendo los volúmenes muertos.

Tabla 4.4: Comparación entre los resultados numéricos, contemplando volúmenes muertos, y los resultados en la bibliografía para las mezclas de Tol-Hexa, THN-C12, THN-IBB, IBB-DD, al 50% y a una temperatura media de  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

Mezcla	$\Delta c_{Ecuación (3.2)}$ $Lz = 22\text{mm}$	$\Delta c_{fluent}$ $Lz = 22\text{mm}$	Desviación (%)	$D_{Texp} (m^2/K \cdot s)$ $(10^{-12})$	$D_{Tfluent} (m^2/K \cdot s)$ $(10^{-12})$	Desviación (%)
Tol- hexa	0,0213	0,0214	0,47	13,6 [media 19, 27, 38]	13,56	-0,29
THN- C12	0,0451	0,0453	0,44	5,90 [31]	5,93	0,5
THN- IBB	0,0180	0,0177	-1,66	2,80 [31]	2,78	-0,71
IBB-C12	0,0207	0,0206	-0,48	3,70 [31]	3,68	-0,54

#### 4.7.- Validación de la microcolumna (en Jülich)

Una vez construida la  $\mu\text{CT}$ , y comprobado numéricamente su funcionamiento dentro de los límites de validez de la teoría de FJO, se ha realizado su validación experimental en el centro Forschungszentrum Jülich dentro del acuerdo de colaboración MGEP-Jülich. Las mezclas empleadas para este fin han sido las mezclas del Benchmark de fontainableau THN-IBB, THN-C12 y IBB-C12 al 50% además de la mezcla Tolueno - hexano al 50%. El sistema de análisis que se ha empleado ha sido un interferómetro tipo Mach-Zehnder. El sistema de análisis diseñado se basa en un solo láser, el

cual se divide en dos, atravesando la  $\mu$ CT a dos alturas diferentes a través de las ventanas. Una vez que los haces han atravesado la muestra, estos se unen de nuevo en un fotodetector. El fotodetector, recibe la información sobre la variación de la intensidad de la luz en función del tiempo. En la Figura 4.14 se muestra el esquema empleado, donde en este caso se ha utilizado un control de fase activo para obtener directamente el valor de la separación a partir de la medida de la intensidad de la luz.

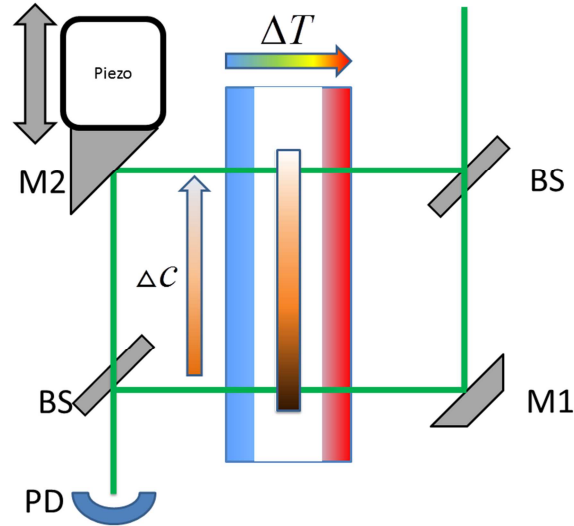


Figura 4.14: Sistema óptico con control activo de la fase.

A continuación, se describe la formulación necesaria para la obtención del coeficiente de termodifusión a partir de los datos analizados con el sistema óptico presentado en la Figura 4.14.

### 4.7.1.-Ecuaciones de trabajo

#### *Determinación del cambio de fase*

Tal y como muestra el esquema de la Figura 4.14, se va a analizar la diferencia de fase a través de la microcolumna en dos alturas diferentes. En un modelo simple la fase  $\phi$  entre los dos haces de la misma longitud de onda corresponde al recorrido óptico:  $S_{top}$  y  $S_{bottom}$  dentro de la columna:

$$\phi = k(S_{top} - S_{bottom}) \quad (4.3)$$

Siendo  $S_{top}$  y  $S_{bottom}$  los recorridos del haz superior e inferior,  $k = (2\pi)/\lambda$  el vector de onda y  $\lambda$  la longitud de onda, asumiendo un láser totalmente estable. Un cambio en el camino óptico arriba y abajo,  $dS_{top}$  y  $dS_{bottom}$ , conlleva un cambio en la fase  $\Delta\phi$ :

$$\Delta\phi = k(dS_{top} - dS_{bottom}) \quad (4.4)$$



En nuestro sistema, se asume que el cambio del índice de refracción vertical, es debido solamente a cambios en la concentración. Ya que el cambio del camino óptico es consecuencia del cambio en el índice de refracción,  $\Delta n_{top}$  y  $\Delta n_{bottom}$ , se puede escribir:

$$\Delta\phi = k \cdot Lx (\Delta n_{top} - \Delta n_{bottom}) \quad (4.5)$$

$$\Delta\phi = k \cdot Lx \cdot \Delta n \quad (4.6)$$

$$\Delta n = \Delta\phi (kLx)^{-1} \quad (4.7)$$

Siendo  $\Delta n$ , la diferencia en el índice de refracción entre la parte superior e inferior de la microcolumna. Además, se desprecian los cambios de fase originados por cambios en el índice de refracción derivados del zafiro, y cambios en la temperatura del aire circundante, ya que ambos haces se ven afectados en la misma medida.

La variación del índice de refracción con la concentración a temperatura y presión constante,  $(\partial n / \partial c)_{p,T}$  está directamente relacionada con la variación de la fase con la concentración  $(\partial \phi / \partial c)_{p,T}$ , de la siguiente manera:

$$\Delta c = \frac{1}{k \cdot Lx} \left( \frac{\partial n}{\partial c} \right)^{-1} \cdot \Delta\phi \quad (4.8)$$

Donde  $(\partial n / \partial c)_{p,T}$ , se determina experimentalmente mediante una calibración previa.

### ***Determinación del cambio de concentración***

Como se ha comentado con anterioridad, se emplea la teoría de FJO, para determinar el coeficiente de termodifusión a partir de la separación en estado estacionario entre dos puntos distanciados  $Lz$ . Combinando la ecuación (3.2) con la ecuación (4.8), se determina experimentalmente el coeficiente de termodifusión a partir de los resultados obtenidos mediante el sistema de medición óptico de la siguiente manera.

$$D_T = - \frac{g \cdot Lx^3}{504 \cdot Lz} \frac{\alpha}{c_0(1-c_0)k \cdot v} \left( \frac{\partial n}{\partial c} \right)^{-1} \cdot \Delta\phi \quad (4.9)$$

Al alinear paralelamente los haces, se produce una rejilla de interferencia. Las franjas de las rejillas se desplazan al haber un cambio en la concentración, lo que produce un cambio de índice de refracción

$\Delta n$  (Figura 4.15a). Este desplazamiento, produce un cambio de la intensidad de la luz, la cual se mide mediante un fotodetector y un medidor de potencia. La señal obtenida tiene forma sinusoidal (Figura 4.15b). Cuando una franja se desplaza hasta ocupar la ubicación de la franja adyacente, se dice que el cambio de fase es de  $\pi$  (Figura 4.15b). Midiendo el número de periodos, se obtiene  $\Delta\phi$ , con lo que se determina  $D_T$  a partir de la ecuación (4.9).

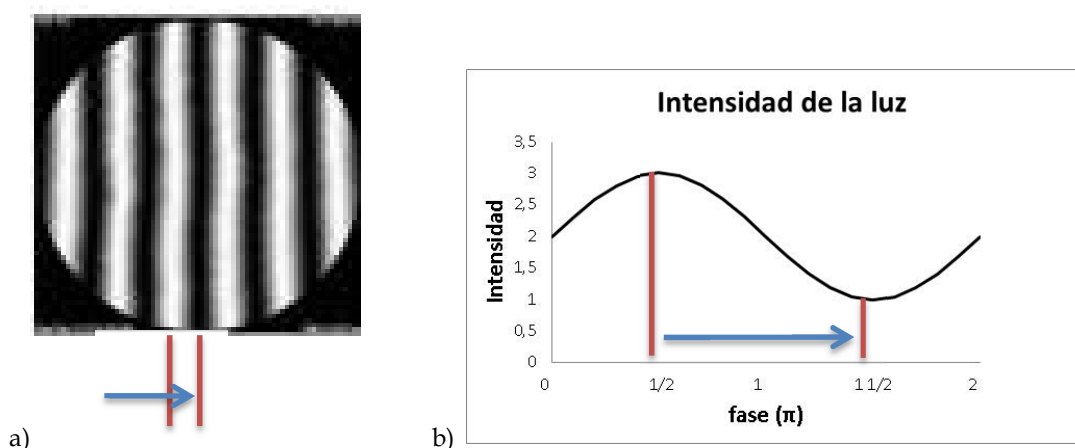


Figura 4.15: Análisis de las franjas de interferometría. a) Desplazamiento de las franjas debido a un cambio del índice de refracción. b) Resultado obtenido en intensidad al producirse el desplazamiento de las franjas.

#### 4.7.2.-Resultados experimentales en Jülich

Los ensayos experimentales han demostrado que para todos los casos analizados, en el instante que se aplica el gradiente de temperatura, se produce un cambio de fase instantáneo en la señal. Para poder determinar el origen de este cambio repentino, en el centro de Jülich, se ha realizado un estudio térmico de la microcolumna mediante una cámara termográfica. En este estudio, se ha analizado la evolución del gradiente de temperatura a un lado y al otro de la microcolumna. En la Figura 4.16 se representa dicha evolución, empleando fotogramas capturados de los vídeos realizados, donde la toma Figura 4.16a corresponde al inicio del ensayo, la toma de la Figura 4.16b al central y la de la Figura 4.16c al final, donde el gradiente se estabiliza, transcurriendo un tiempo desde el inicio hasta el final de 1,5 minutos. Se puede observar como en la toma central (Figura 4.16b) las temperaturas no son homogéneas a lo largo de la columna, llegando a haber una diferencia de 2K entre el gradiente superior e inferior. El ensayo ha sido realizado con una muestra de tolueno puro en el interior del *gap*.

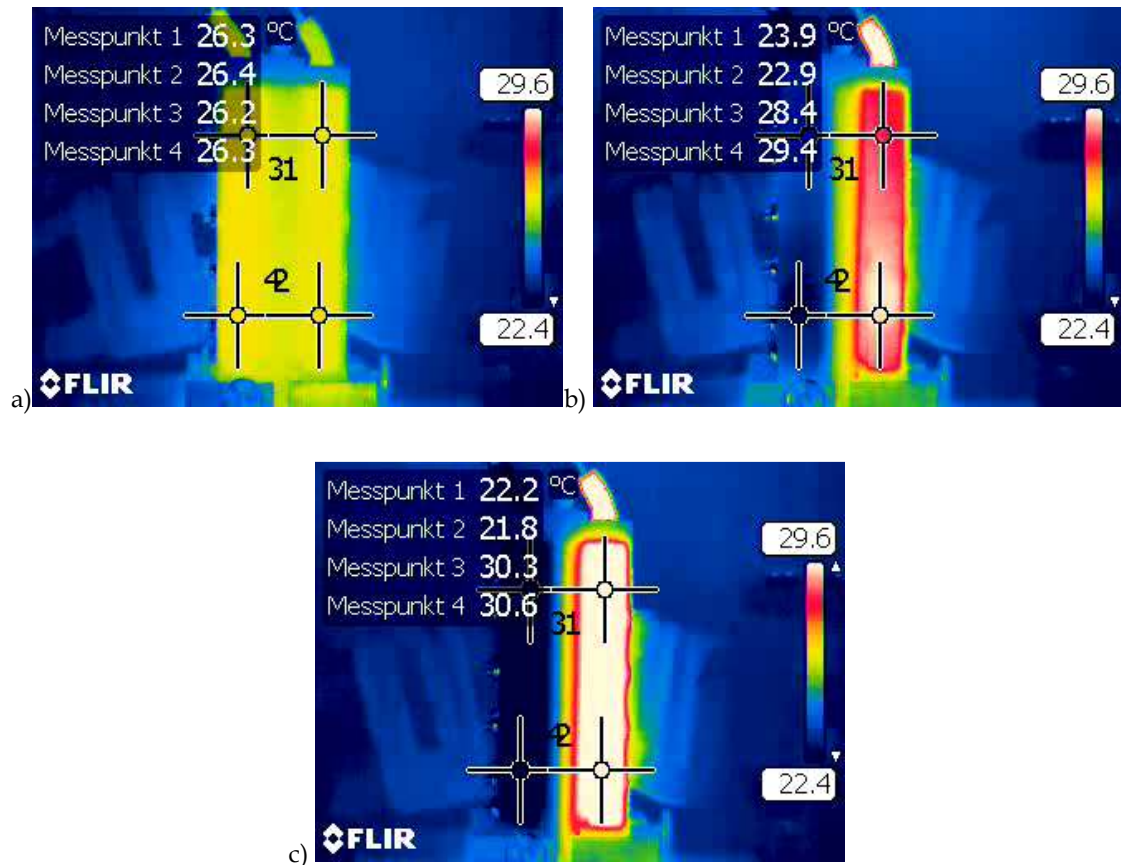


Figura 4.16: Evolución del gradiente de temperatura.

De este estudio se han obtenido datos cuantitativos que se representan en la Figura 4.17, donde en grande se representa la evolución de la temperatura a ambos lados, en pequeño y arriba, la temperatura media en función del tiempo, y en pequeño y abajo, la evolución de la temperatura en uno de los lados, arriba y abajo. De los datos obtenidos, se concluye que la zona baja de la microcolumna, por donde se introduce el flujo de agua, sufre un cambio de temperatura brusco antes que en la zona alta, hasta que las dos zonas se estabilizan transcurridos unos segundos. Esta diferencia de temperatura vertical puede ser la que origine el cambio de fase instantáneo inicial. Para determinar  $D_T$ , se debe sustraer de la señal final obtenida el desfase inicial provocado por esta asimetría térmica.

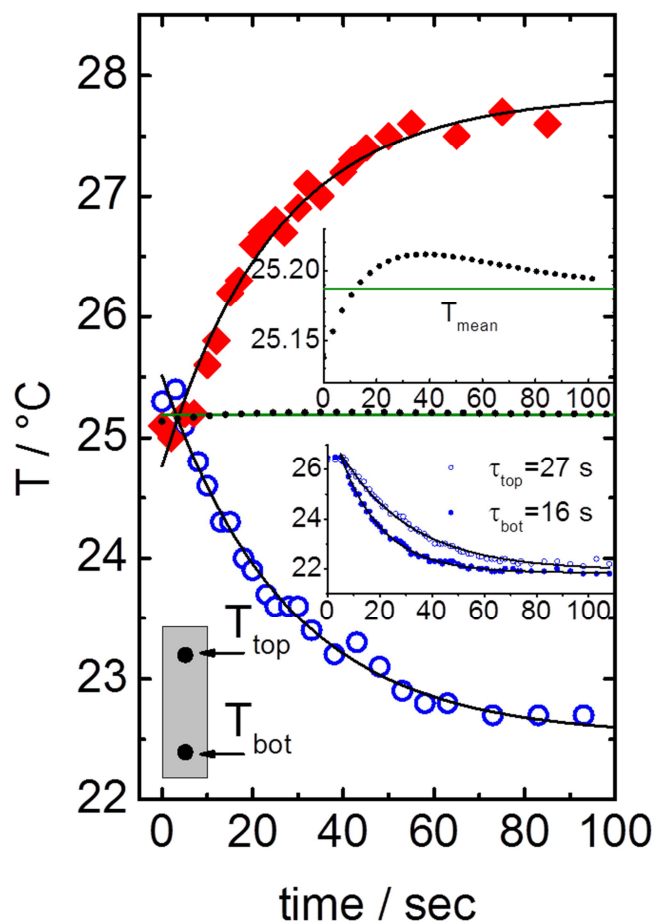
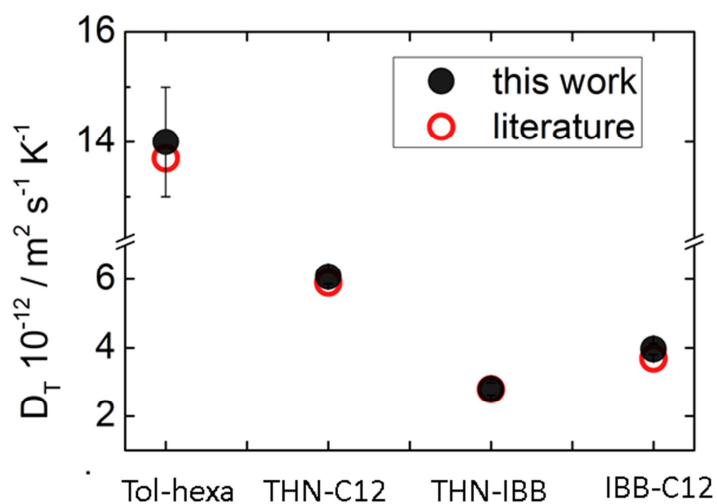


Figura 4.17: Análisis de la evolución de la temperatura. En grande la temperatura en función del tiempo en un lado y en el otro. Arriba en pequeño, evolución de la temperatura media y abajo en pequeño la evolución de la temperatura en la parte alta y baja del *gap* en uno de los lados.

La desviación típica en la determinación de  $D_T$  en las mezclas analizadas, respecto a los resultados de la literatura, ha sido entorno al 5%. La mayor desviación ha sido del 6% para la mezcla THN-IBB. Los resultados se agrupan en la Tabla 4.5 y se grafican en la Figura 4.18. Estos resultados se consideran satisfactorios. En cuanto al sistema de adquisición de datos, se analiza en detalle en el artículo [39] y en el anexo de esta tesis doctoral.

**Tabla 4.5: Resultados experimentales de las mezclas de Tol-Hexa, THN-C12, THN-IBB y IBB-C12 al 50% de fracción másica y determinadas a una temperatura media de 25°C.**

Mezcla	$D_T$ (este trabajo) ( $m^2/K \cdot s$ ) ( $10^{-12}$ )	$D_T$ (Literatura) ( $m^2/K \cdot s$ ) ( $10^{-12}$ )	Desviación (%)
Tol-hexa	13,0±0.35	13,6 [media 19, 27, 38]	-4,5
THN-C12	5,87±0.23	5,90 [31]	-0,5
THN-IBB	2,63±0.01	2,80 [31]	-6,3
IBB-C12	3,91±0.15	3,70 [31]	5,5



**Figura 4.18: Resultados experimentales obtenidos en Jülich**

#### 4.8.- Construcción del sistema de medición óptico en MGEP

Dentro del acuerdo de colaboración con el centro Forschungszentrum Jülich GmbH, se ha procedido a la construcción del sistema de medición óptico en el laboratorio de Mecánica de Fluidos de MGEP. En la Figura 4.19, se muestra el esquema del sistema óptico de medición implantado en MGEP.

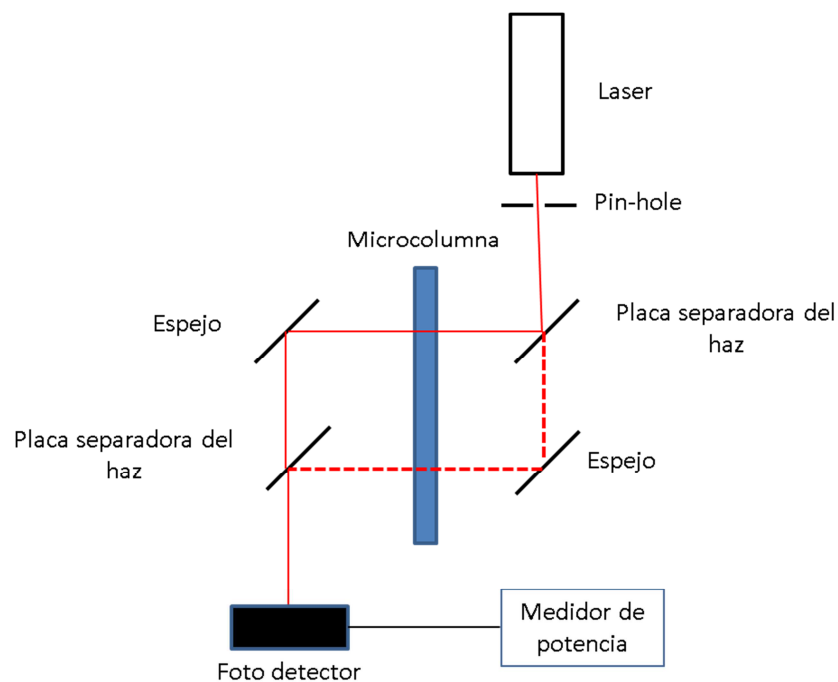


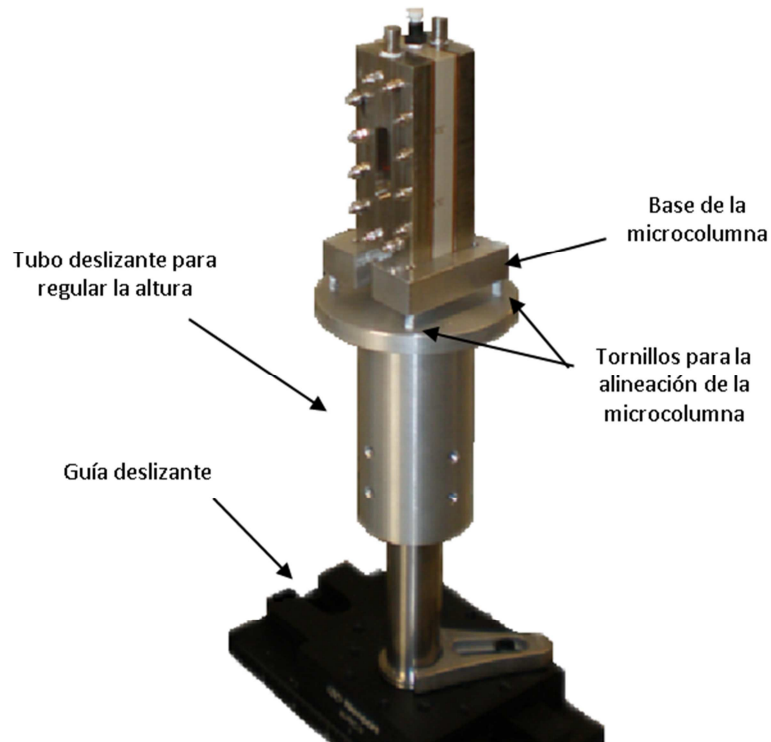
Figura 4.19: Esquema del sistema de medición diseñado para la microcolumna.

#### 4.8.1.-Construcción del sistema óptico

La instalación del sistema óptico de medición, está compuesto por los siguientes componentes principales:

- Mesa óptica compuesta por: Encimera de 900 x 1800 x 203 mm perforada con agujeros roscados de M6 cada 25 mm y con cuatro amortiguadores neumáticos.
- Láser HeNe, de 633nm de 1mm de diámetro y una potencia de 1.5mW, (R-32734, Newport).
- Fotodetector (918D-SL-OD3, Newport).
- Medidor de potencia (1918-R, Newport).
- 2 Espejos, 2 divisores de haz, 2 *pinholes* y estructuras.

Además de los componentes comerciales, se ha diseñado y construido un sistema de sujeción y de soporte para poder posicionar la microcolumna, y así los dos haces puedan atravesar la microcolumna de manera limpia. Todo el soporte diseñado, está sujeto a una guía, que se fija a la mesa óptica. En la Figura 4.20 puede verse una imagen del conjunto completo.



**Figura 4.20: Soporte de la microcolumna.**

En la Figura 4.21, puede verse la nueva instalación termogravitacional con sistema de medición óptico. Para que los ensayos puedan realizarse en un entorno controlado, se ha aislado el set-up con aislante térmico, como puede verse en la Figura 4.22. De esta manera, la fluctuación de la temperatura, así como las corrientes de aire, afectarán en menor medida sobre la medición obtenida. Además, se ha instalado un sistema de refrigeración para que la habitación se encuentre siempre en las mismas condiciones de trabajo.

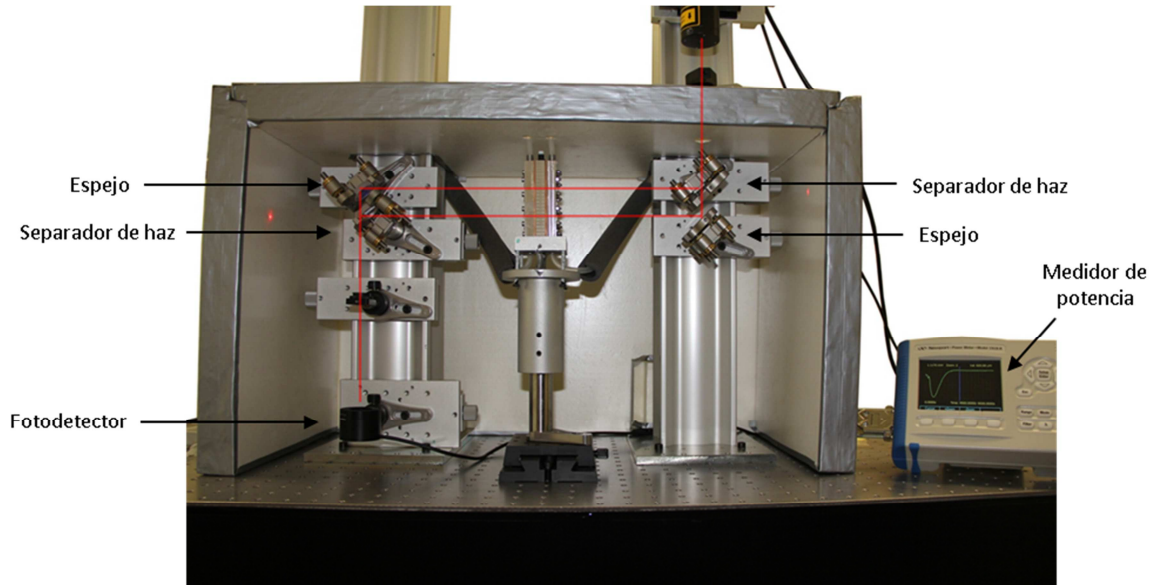


Figura 4.21: Montaje de la instalación

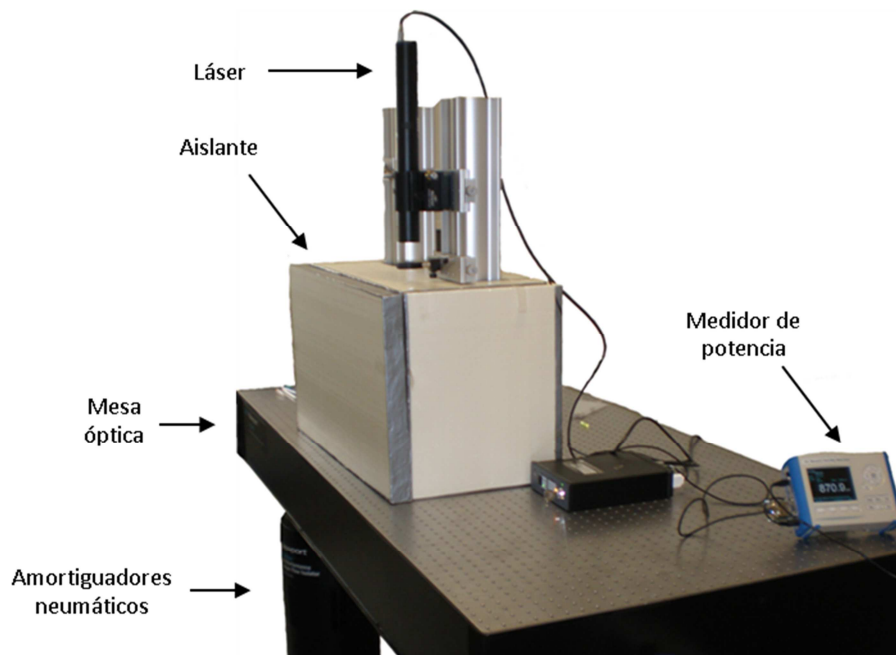


Figura 4.22: Instalación óptica completa.

#### 4.9.- Validación de la nueva instalación termogravitacional en MGEP.

A continuación, se va a describir el proceso realizado para la obtención de los coeficientes de termodifusión. Para ello, se han empleado las mismas ecuaciones de trabajo descritas en el apartado 4.7.1.-



#### 4.9.1.-Sistema de aplicación del gradiente térmico

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, para aplicar el gradiente térmico, se emplea un flujo de agua atemperada, mediante la utilización de baños termostáticos (LAUDA Proline RP-855). A diferencia de las instalaciones habituales de las columnas termogravitacionales, donde se determina  $D_T$  a partir de muestras extraídas una vez el sistema se encuentra en estado estacionario, con el nuevo método óptico de medición, es necesario analizar la separación de la muestra a lo largo de todo el ensayo. Esto hace, que el inicio del ensayo tenga que producirse en unas condiciones de equilibrio, con un buen atemperado de la muestra a  $T_{med}$ , ya que el resultado final depende directamente del inicio del mismo. Para ello, se han empleado dos baños para aplicar el gradiente de temperatura, y mediante un sistema hidráulico, se han permitido dos posiciones; mezcla y separado. En la posición de mezcla, los dos flujos, el del baño caliente como del frío, se mezclan para después dirigirse a las entradas de la columna a  $T_{med}$ . Una vez se encuentre la columna atemperada, se pasa a la posición de separado, donde los dos flujos dejan de mezclarse para dirigirse directamente a cada entrada de la microcolumna para generar el gradiente de temperatura. En la Figura 4.23 se presenta el esquema hidráulico, donde la configuración de la Figura 4.23a es para atemperar la microcolumna y el de la Figura 4.23b para aplicar el gradiente térmico.

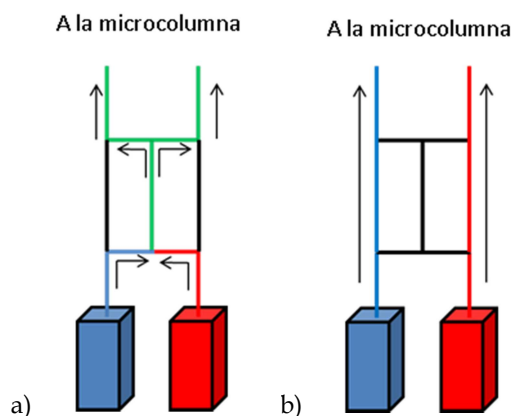


Figura 4.23: Esquema del sistema de distribución termostático para la microcolumna. a) Para atemperar a temperatura constante y b) para aplicar el gradiente térmico.

No obstante, este esquema ha presentado problemas por la incapacidad de controlar con exactitud los caudales que aporta cada baño. Al tener diferentes caudales, y ser difícil su control, la temperatura media obtenida al mezclar ambos caudales, y la temperatura media obtenida al aplicar el gradiente de temperatura, no siempre es la misma. Por lo que los resultados obtenidos en la lectura del desplazamiento de franjas pueden llegar a ser erróneos. Por ello, se ha optado por un sistema hidráulico compuesto por tres baños. Uno, para atemperar la columna; y otros dos, para

aplicar el gradiente de temperatura. De esta manera, se ha conseguido que ambas temperaturas medias sean las mismas. En la Figura 4.24 se muestra el esquema hidráulico final, tanto para atemperar (Figura 4.24a), como para aplicar el gradiente térmico (Figura 4.24b).

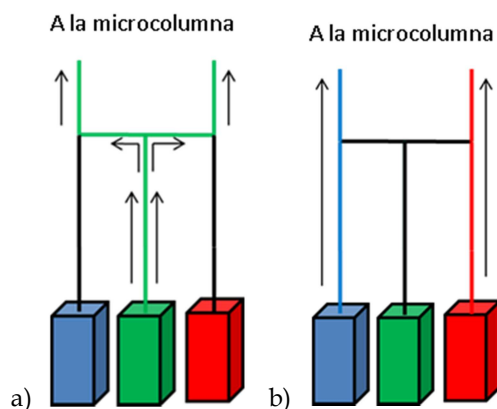


Figura 4.24: Esquema final del sistema de distribución termostático para la microcolumna . a) Para atemperar a temperatura constante y b) para aplicar el gradiente térmico.

#### 4.9.2.-Estudio térmico

Los ensayos experimentales han demostrado que para todos los casos analizados, en el instante que se aplica el gradiente de temperatura, se produce un salto en la señal inicial. Este fenómeno ha sido ampliamente explicado en [39], donde se ha observado que el salto en la señal se produce por el gradiente de temperatura vertical inicial. Al introducir el flujo de agua desde la parte inferior hacia la superior, la zona baja de la microcolumna sufre el cambio de temperatura de forma más agresiva que la zona alta. Esta variación del gradiente vertical produce dicho salto, que se neutraliza una vez se estabilizan las temperaturas, trascurridos algunos segundos.

Es imprescindible analizar esta transición hacia un gradiente de temperatura estable, para poder sustraer este desfase de la medida total  $\Delta\theta$ . Para comprobar el desfase provocado por esta inestabilidad inicial, y la influencia de la muestra a la respuesta, se han realizado ensayos con líquidos puros de; tolueno (Figura 4.25a), IBB (Figura 4.25b) y THN (Figura 4.25c).

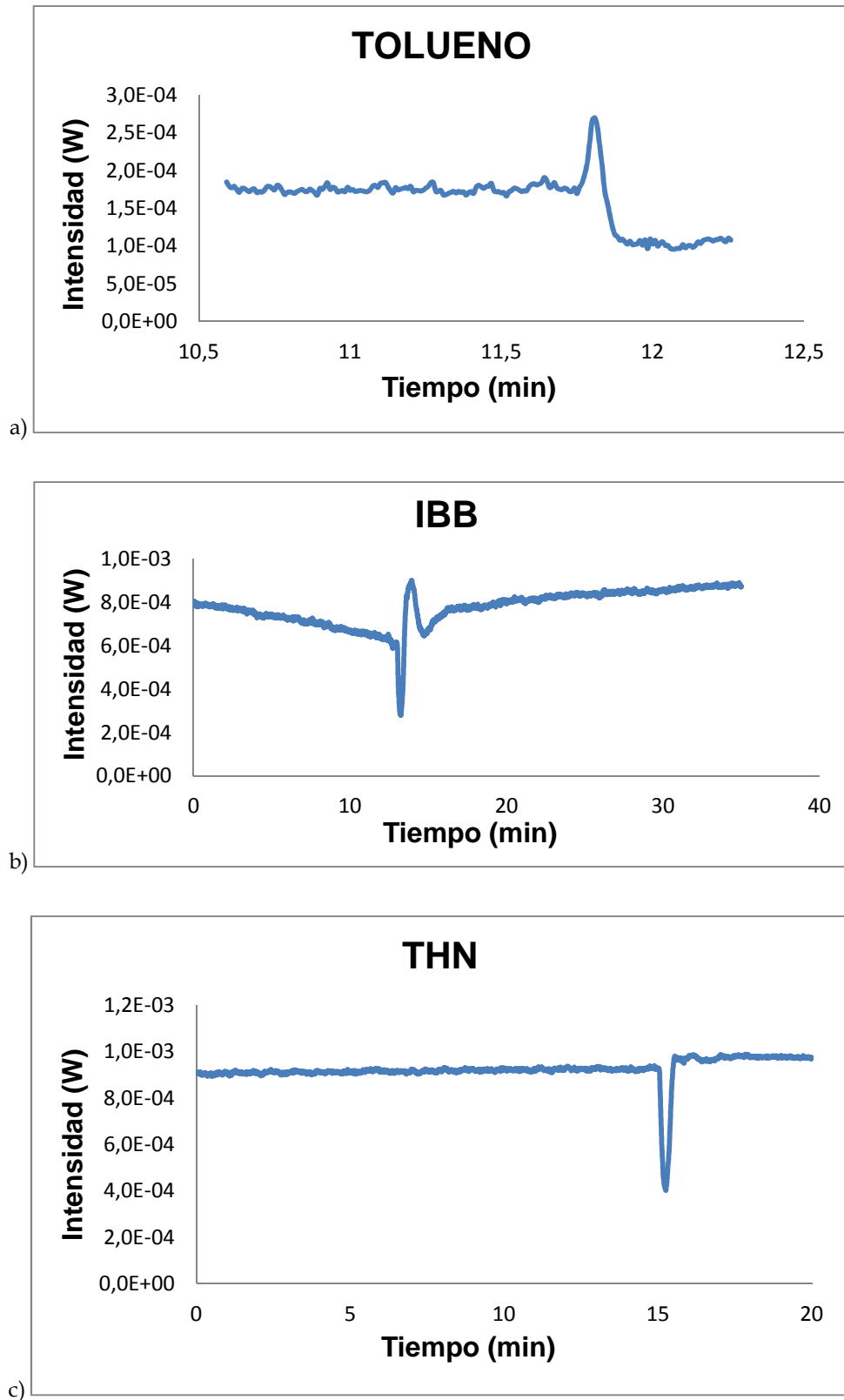


Figura 4.25: Respuesta del sistema al gradiente de temperatura para fluidos puros, a) Tolueno, b) IBB y c) THN.

Como se puede apreciar en la Figura 4.25, para cada uno de los líquidos puros introducidos, la respuesta es instantánea, de unos pocos segundos de duración y de diferente forma al aplicarse el gradiente de temperatura. Esto se debe a las características de cada fluido, ya que la conducción térmica, así como su expansión térmica, influyen directamente sobre este resultado. Esta respuesta es claramente identificable, y siempre es la misma para un mismo líquido.

### 4.9.3.-Procedimiento experimental

Para poder determinar  $D_T$  a partir de la ecuación (4.9), se necesita realizar una calibración previa para determinar la variación del índice de refracción en función de la concentración ( $\partial n/\partial c$ ) para cada muestra. La determinación de  $\partial n/\partial c$ , también llamado factor de contraste, se realiza de manera similar a la obtención del coeficiente de expansión másica. Se emplean diferentes muestras con una concentración entorno a la concentración de referencia (Figura 4.26). Estas medidas se realizan con un refractómetro Anton Paar RXA 156 cuya repetibilidad es de  $2 \cdot 10^{-5} nD$ .

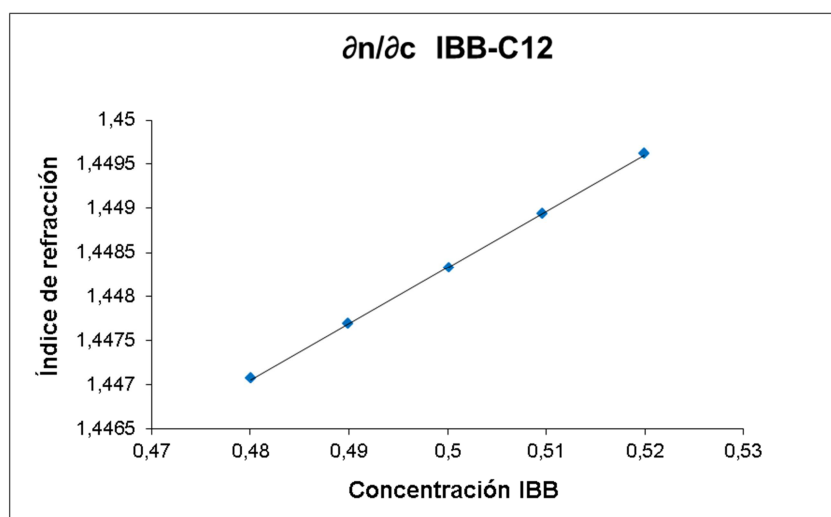


Figura 4.26: Índice de refracción en función de la concentración de la mezcla IBB-C12 a 25°C.

Todos los ensayos se han llevado a cabo siguiendo el mismo procedimiento.

1. Primero, se introduce la muestra dentro de la microcolumna, con la ayuda de dos jeringuillas. Para evitar cualquier contaminante, se realiza el proceso de llenado y vaciado tres veces. La cuarta será la que se emplea para la medida. El proceso de carga se realiza muy lentamente y siempre desde la parte inferior de la microcolumna con el fin de evitar la formación de burbujas.
2. A continuación, se sitúa la microcolumna en la base y se sujeta con la ayuda de dos tornillos de apriete.

3. Se colocan los tubos para la circulación de agua.
4. Con los posicionadores, se asegura que el haz tanto superior como inferior, pasa limpiamente a través de los zafiros.
5. Se comprueba que la columna se encuentra en posición vertical con la ayuda de un nivel de burbuja.
6. Se alinean correctamente los haces para que generen una rejilla de interferencia con gran contraste. Para ello, hay que asegurarse de que los haces están lo más paralelos posibles. La graduación de los haces, se realiza alineando los espejos y los separadores de haz, modificando su ángulo de incidencia levemente. Se ha establecido una diferencia de altura entre el haz superior e inferior de  $Lz = 23,5 \text{ mm}$ .
7. Se cierra la caja aislante.
8. Se abre el paso del baño donde se encuentra el agua atemperada a  $25^{\circ}\text{C}$ .
9. Transcurrido un tiempo, la señal de la intensidad se estabiliza y no varía su valor. Esto indica que el ensayo puede comenzar. En este momento, se empieza a grabar la señal recogida del valor de la intensidad, a una velocidad de 2 datos por segundo.
10. Transcurridos unos 5 - 10min, se cierra el circuito del agua a  $25^{\circ}\text{C}$  y se aplica el gradiente de temperatura, entorno a  $\Delta T = 8\text{K}$ .
11. La adquisición de datos continuará hasta que termine el ensayo, es decir, hasta que la separación de la muestra llegue al estado estacionario.
12. Se analiza la señal; se extrae de la señal el desfase producido por la aplicación del  $\Delta T$  en el inicio del ensayo, y contando el número de periodos se obtiene  $\Delta\phi$ , con la que se obtiene  $D_T$ , empleando la ecuación (4.9).

En la Figura 4.27 se aprecia el resultado de un experimento de tolueno-hexano al 50%. Analizando los periodos de esta señal, se obtiene el valor de la separación. Como se puede ver, el ensayo comienza con una señal estable donde no existe desfase alguno. A continuación, se aplica el gradiente de temperatura, y surge un desfase que puede verse en detalle de la Figura 4.28. Una vez que se produce esa inestabilidad inicial, durante al menos un minuto, el sistema se equilibra brevemente y comienza a producirse la separación. Cuando la separación finaliza, la señal se estabiliza, indicando que se ha llegado al estado estacionario donde no habrá más modificación en cuanto a la concentración.

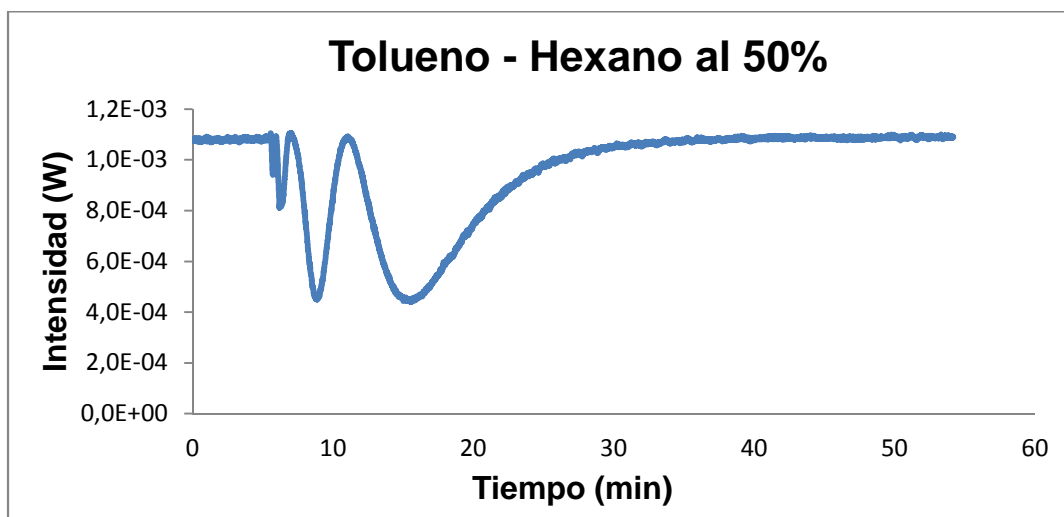


Figura 4.27: Ensayo Tolueno-Hexano al 50% a una temperatura media de  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

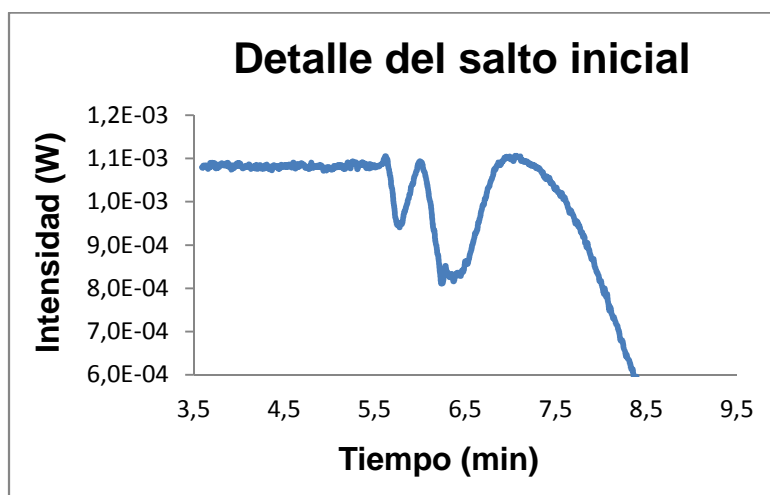


Figura 4.28: Detalle del inicio del ensayo.

En la Figura 4.29 se pueden ver gráficas de cada uno de los demás sistemas analizados, THN-C12 al 50% (Figura 4.29a), IBB-C12 al 50% (Figura 4.29b) y THN-IBB al 50% y a  $T=25^{\circ}\text{C}$  (Figura 4.29c). Como se puede observar, dependiendo del factor de contraste ( $\partial n/\partial c$ ) y de la separación, los periodos de la señal varían notablemente de una mezcla a otra. Por ello, al realizar la medida de la señal manualmente, el error sistemático producido en señales con poca separación o periodo, puede llegar a ser considerable, ya que un pequeño error en la medida, se convierte en una gran desviación respecto a la determinación del coeficiente de termodifusión correspondiente.

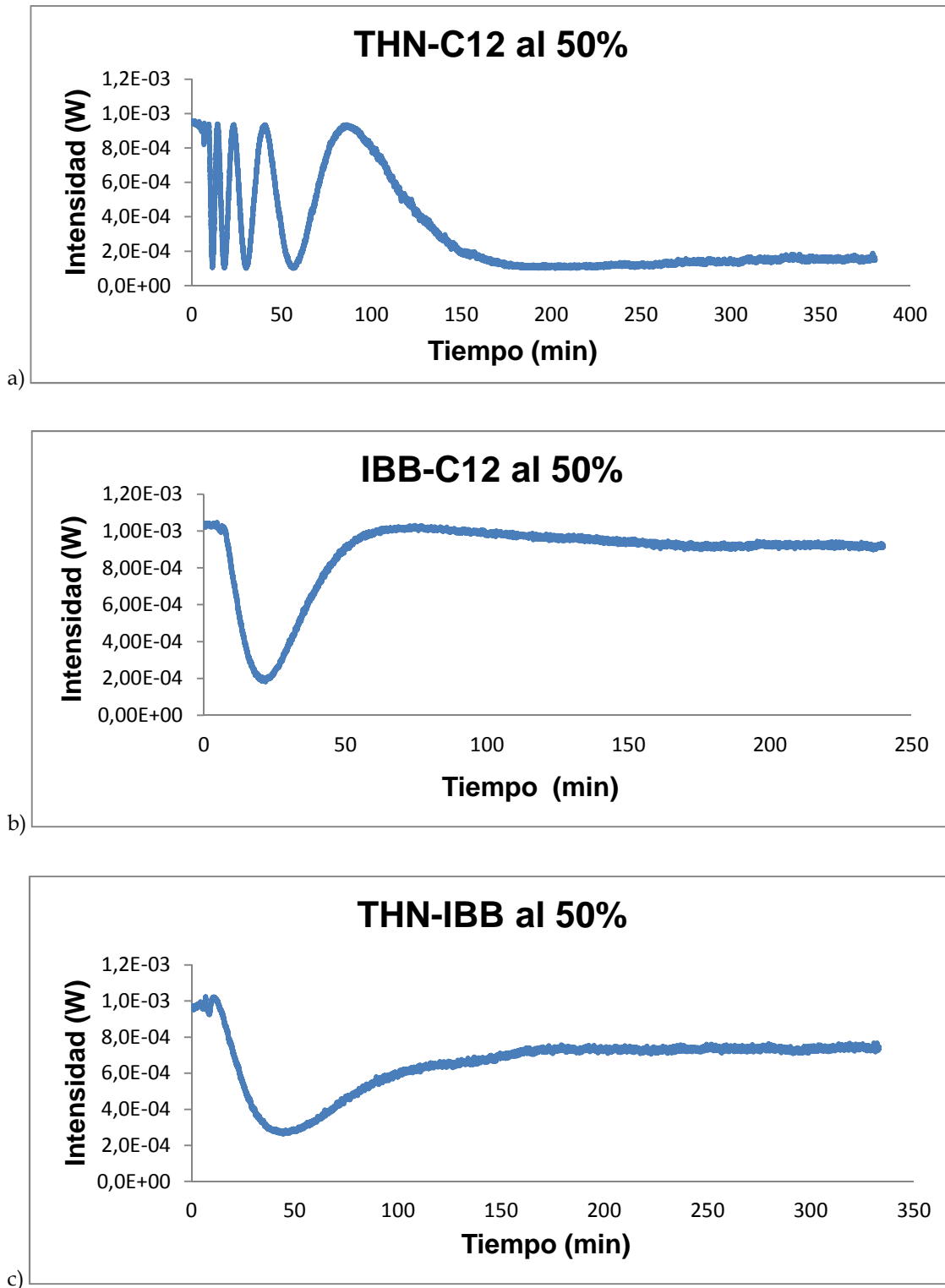


Figura 4.29: Resultados obtenidos para los demás sistemas analizados, a) THN-C12, b) IBB-C12 y c) THN-IBB.

#### 4.9.4.-Resultados experimentales en MGEP

En total, se han analizado cuatro muestras diferentes: Tolueno-hexano, IBB-C12, THN-IBB y THN-C12, todas al 50% en fracción másica y a una temperatura media de 25°C. Todas las mezclas han sido analizadas al menos 5 veces. Los resultados se resumen en la siguiente Figura 4.30.

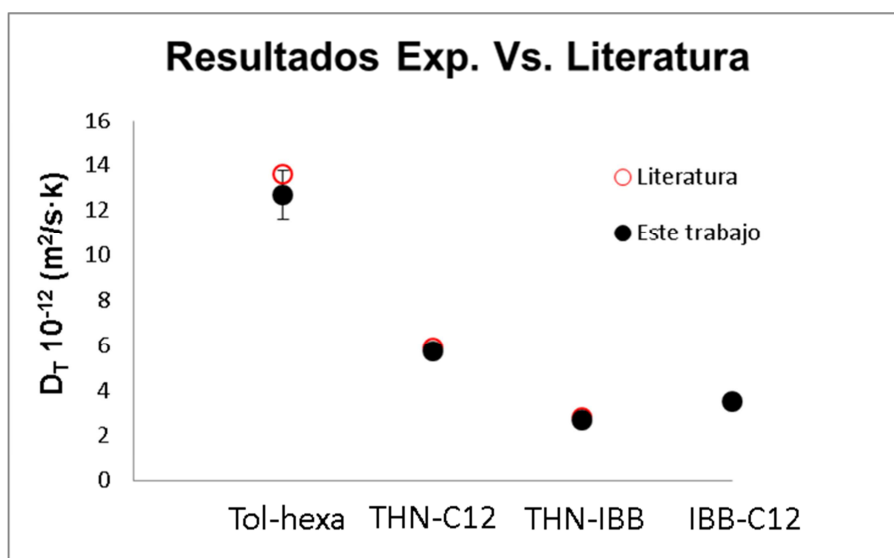


Figura 4.30: Resultados del coeficiente  $D_T$  para los sistemas de referencia analizados, donde en puntos cerrados se representan los resultados de este trabajo y en círculos abiertos los de la literatura.

En la Tabla 4.6 se incluyen todos los resultados obtenidos. Los datos obtenidos para el coeficiente de termodifusión muestran en general una buena concordancia con los valores de la bibliografía, con una desviación media de entorno al 4%. Se puede observar que de todos los valores obtenidos para el coeficiente de termodifusión, la mayor desviación encontrada de la media de los resultados respecto a la bibliografía, ha sido del 6,6%.

Tabla 4.6: Resultados experimentales de las mezclas de Tol-Hexa, IBB-C12, THN-IBB, THN-C12 al 50% y una temperatura media de 25°C.

Mezcla	$D_T$ (este trabajo) ( $\text{m}^2/\text{K}\cdot\text{s}$ ) ( $10^{-12}$ )	$D_T$ (Literatura) ( $\text{m}^2/\text{K}\cdot\text{s}$ ) ( $10^{-12}$ )	Desviación (%)
Tol-hexa	$12,7 \pm 1,1$	13,6 [media 19, 27, 38]	-6,6
THN-C12	$5,76 \pm 0,13$	5,90 [31]	-2,4
THN-IBB	$2,69 \pm 0,14$	2,80 [31]	-3,9
IBB-C12	$3,50 \pm 0,2$	3,70 [31]	-4,9



#### 4.10.- Conclusiones

A lo largo de este proyecto de tesis, se ha diseñado y construido una microcolumna termogravitacional dentro de los límites de validez de la teoría FJO y apta para el estudio de fluidos de interés biotecnológico. La microcolumna ha sido validada numéricamente, así como experimentalmente, tanto en las instalaciones del centro Forschungszentrum Jülich GmbH como en la nueva instalación desarrollada a lo largo de esta tesis doctoral en el laboratorio de Mecánica de Fluidos de MGEP. Los resultados muestran una desviación media respecto a los valores de la bibliografía, de entorno al 4,5%. Para mejorar la sensibilidad del sistema de medición, se deberá aislar mejor de las fluctuaciones de la temperatura, así como mejorar su control. Para las muestras con un bajo contraste y/ o con poca separación, mediante el sistema actual de medida, su análisis es complicado, ya que un pequeño error en la medida del desfase, puede llegar a ser un gran desfase en el resultado final de  $D_T$ . Para mejorar el rendimiento de esta instalación, en el futuro, quizá, se tenga que instalar un sistema de control de fase activo. También, se ve la posibilidad de introducir en nuestro sistema de medición, el método de análisis ODI (*Optical Digital Interferometry*) [40], con el cual sería posible analizar el cambio de concentración en toda la célula. De esta manera, se obtendría mayor información sobre el comportamiento de las muestras a lo largo de toda la microcolumna, pudiendo plantearse la posibilidad de obtener incluso el coeficiente  $D$  mediante medidas de separación no estacionarias.



#### 4.11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. A. Putnam and D. G. Cahill, "Transport of nanoscale latex spheres in a temperature gradient", *Langmuir*, **21**, pp. 5317-5323, (2005).
- [2] H. Ning, J. Buitenhuis, J. K. G. Dhont and S. Wiegand, "Thermal diffusion behavior of hard-sphere suspensions", *J. Chem. Phys.*, **125**, pp. 204911, (2006).
- [3] S. A. Putnam, D. G. Cahill, and G. C. L. Wong, "Temperature dependence of thermodiffusion in aqueous suspensions of charged nanoparticles", *Langmuir*, **23**, pp. 9221-9228, (2007).
- [4] A. Martin, M. M. Bou-Ali, "Determination of thermal diffusion coefficient of nanofluid: Fullerene-toluene", *C. R. Mec.*, **339**, pp. 329-334, (2011).
- [5] D. Braun and A. Libchaber, "Trapping of dna by thermophoretic depletion and convection", *Phys. Rev. Lett.*, **89**, pp. 188103, (2002).
- [6] R. Piazza, S. Iacopini and B. Triulzi, "Thermophoresis as a probe of particle-solvent interactions: The case of protein solutions", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, pp. 1616-1622, (2004).
- [7] P. Blanco and S. Wiegand, "Study of the soret effect in monosaccharide solutions", *J. Phys. Chem. B*, **114**, pp. 2807-13, (2010).
- [8] P. Blanco, H. Kriegs, B. Arlt and S. Wiegand, "Thermal diffusion of oligosaccharide solutions: The role of chain length and structure", *J. Phys. Chem. B*, **114**, pp. 10740-10747, (2010).
- [9] A. Martin, M. M. Bou-Ali, H. Barrutia, D. A. de Mezquia, "Microfluidic separation process by the Soret effect in biological fluids", *C. R. Mec.*, **339**, pp. 342-348. (2011).
- [10] R. D. Astumian, "Coupled transport at the nanoscale: The unreasonable effectiveness of equilibrium theory", *PNAS*, **104**(1), pp. 3-4, (2007).
- [11] D. Braun and A. Libchaber, "Thermal force approach to molecular evolution", *Phys. Biol.*, **1**, pp. 1-8, (2004).
- [12] P. Baaske, F. M. Weinert, S. Duhr, K. H. Lemke, M. J. Russell and D. Braun, "Extreme accumulation of nucleotides in simulated hydrothermal pore systems", *PNAS*, **104**(22), pp. 9346-9351 (2007).

- [13] C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun and S. Duhr, "Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis", *Nat. Commun*, **1(100)**, (2010).
- [14] H.R. Jiang, H. Wada, N. Yoshinaga and M. Sano, "Manipulation of colloids by nonequilibrium depletion force in temperature gradient", *Phys. Rev. Lett.*, **102**, pp. 208301, (2009).
- [15] D. Vigolo, R. Rusconi, H. A. Stone and R. Piazza, "Thermophoresis: microfluidics characterization and separation", *Soft Matter*, **6**, pp. 3489-3493, (2010).
- [16] S. Duhr and D. Braun, "Why molecules move along a temperature gradient", *PNAS*, **103**, pp. 19678, (2006).
- [17] S. Iacopini and R. Piazza, "Thermophoresis in protein solutions", *Eur. Phys. Letter*, **63**, pp. 247, (2003).
- [18] M. Braibanti, D. Vigolo and R. Piazza, "Does Thermophoretic Mobility Depend on Particle Size?", *Phys. Rev. Lett.* **100**, pp. 108303, (2008).
- [19] K. J. Zhang, M. E. Briggs, R. W. Gammon, and J. V. Sengers, "Optical measurement of the Soret coefficient and the diffusion coefficient of liquid mixtures", *J. Chem. Phys.*, **104**, pp. 6881, (1996).
- [20] P. Kolodner, H. Williams, and C. Moe, "Optical measurement of the soret coefficient of ethanol/water solutions", *J. Chem. Phys.* **88**, pp. 6512, (1988).
- [21] S. A. Putnam and D. G. Cahill, "Micron-scale apparatus for measurements of thermodiffusion in liquids", *Rev. Sci. Instrum.*, **75**, pp. 2368, (2004).
- [22] S. Wiegand and W. Köhler, "Measurement of transport coefficients by an optical grating technique", *Lect. Notes Phys.*, **584**, pp. 189-210, (2002).
- [23] S. Duhr, S. Arduini, and D. Braun. "Thermophoresis of dna determined by microfluidic fluorescence", *Eur. Phys. J. E. Soft Matter*, **15**, pp. 277-286, (2004).
- [24] P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr and D. Braun, "Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding", *Angew Chem Int Ed Engl.*, **49(12)**, pp. 2238-41, (2010).
- [25] W. H. Furry, R. C. Jones, L. Onsager, "On the theory of isotope separation by thermal diffusion", *Physical Review*, **55**, pp. 1083-1095, (1939).

- [26] O. Ecenarro O, J .A. Madariaga, J Navarro, C. M. Santamaría, J. A. Carrión and J. M. Savirón, "Fickian and thermal diffusion coefficients from liquid thermogravitational columns", *J. Phys.: Condens Matter*, **2** pp. 2289-2296, (1990).
- [27] M. M. Bou-Ali, O. Ecenarro, J. A. Madariaga, C. M. Santamaria, J. J. Valencia, "Thermogravitational measurement of the Soret coefficient of liquid mixtures", *J. Phys.: Condens. Matter*, **10**, pp. 3321-3331, (1998).
- [28] J.J. Valencia, M.M. Bou-Ali, O. Ecenarro, J.A. Madariaga, C.M. Santamaría, "Validity limits on the FJO thermogravitational column theory", in: "Thermal nonequilibrium phenomena in fluid mixtures", S. Wiegand, W. Köhler (Eds.), *Lectures Notes in Physics*, **584**, Springer, Berlin, pp. 233-249, (2002).
- [29] J.J. Valencia, M.M. Bou-Ali, J.K. Platten, O. Ecenarro, J.M. Madariaga and C.M. Santamaria, "Fickian Diffusion Coefficient of Binary Liquid Mixtures in a Thermogravitational Column", *J. Non-Equilib. Thermodyn*, **32**, pp. 299-307, (2007).
- [30] J. A. Madariaga, C. Santamaria, H. Barrutia, M. M. Bou-Ali, O. Ecenarro, J. J. Valencia, "Validity limits of the FJO thermogravitational column theory: Experimental and numerical analysis" *C. R. Mec.*, **339**, pp. 292-296, (2011).
- [31] J. K. Platten, M. M. Bou-Ali, P. Costeseque, J. F. Dutrieux, W. Köhler, C. Leppa, S. Wiegand, S. G. Wittko, "Benchmark values for the Soret, thermal diffusion and diffusion coefficients of three binary organic liquid mixtures", *Philos. Mag.*, **83**, pp. 1965-1971 (2003).
- [32] C. L. Choy, K. W. Kwok, W. P. Leung, F. P. Lau, "Thermal conductivity of poly (ether ether ketone) and its short-fiber composites", *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **32**, pp. 1389-1397, (1994).
- [33] C. L. Choy, W. P. Leung, "Thermal expansion of poly (etherether-ketone) (PEEK)", *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **28**, pp. 1965-1977, (1990).
- [34] S. Burghartz, B. Schulz, "Thermophysical properties of sapphire, AlN and MgAlO, down to 70 K", *J. Nucl. Mater.*, **212**, pp. 1065-1068, (1994).
- [35] Ansys Inc., (2010), Ansys-Fluent 13.0, Lebanon, USA.
- [36] Ansys inc., (2010), Gambit 2.4.6, Lebanon, USA.
- [37] J. K. Platten, G. Chavepeyer, "Instabilité et flux de chaleur dans le problème de Bénardé deux constituants aux coefficients de Soret positifs", *Int. J. Heat Mass Transf.*, **19**, pp. 27-32, (1976).

[38] W. Köhler, B. Müller, "Soret and mass diffusion coefficients of toluene/n-hexane mixtures", *J. Chem. Phys.*, **103**, pp. 4367–4370, (1995).

[39] P. Naumann, A. Martin, H. Kriegs, M. Larrañaga, M. M. Bou-Ali and S. Wiegand, "Development of a thermogravitational  $\mu$ -column with an interferometric contactless detection system", enviado.

[40] A. Mialdun, V. Shevtsova, "Development of optical digital interferometry technique for measurement of thermodiffusion coefficients", *Int. J. Heat Mass Transfer.*, **51**, pp. 3164–3178, (2008).

## Capítulo 5

---

### **Diseño, Construcción y Validación de una Microcélula de separación**





## 5. Diseño, Construcción y Validación de una Microcélula de separación

Desde hace más de dos décadas se ha demostrado que la miniaturización de los sistemas y procesos de ensayo aportan una gran ventaja en diferentes sectores industriales, especialmente, en el sector biotecnológico [1]. De esta miniaturización ha surgido la necesidad de emplear plataformas microfluídicas para desarrollar toda una variedad de dispositivos en la preparación de muestras, detección y diagnóstico, principalmente enfocados al sector salud. Muchos de estos dispositivos necesitan procesos de mezclado y de separación eficientes, sean aplicados a moléculas, analitos o partículas [2]. Por ello, a lo largo de estos años, han sido innumerables la cantidad de nuevas técnicas y procesos desarrollados para este fin. Estos dispositivos se pueden dividir en dos categorías: i) los dispositivos pasivos, cuyo proceso de separación o mezclado lo llevan a cabo sin ningún tipo de fuerza externa, y ii) los dispositivos activos, que emplean actuadores o fuerzas externas para su fin. A continuación, se hace un pequeño repaso tanto de unos como de otros.

Los dispositivos de mezclado, son de gran aplicabilidad, sobre todo en reacciones químicas donde se necesita el mezclado entre el reagente y la muestra, ya sea para análisis químicos, biológicos o médicos.

Las dimensiones submilimétricas de los canales empleados en los microdispositivos, afecta negativamente en el proceso de mezclado, ya que los flujos son puramente laminares [3]. La ausencia de convección conlleva a realizar el proceso de mezclado bajo un régimen difusivo. Con el fin de optimizar el proceso de mezclado, en la mayoría de los microdispositivos, se ha tomado la geometría en forma de T o Y como referencia [4-6]. Asimismo, se ha analizado el efecto de múltiples entradas respecto al dispositivo inicial [7]. De la misma manera, se ha empleado la abyección caótica, que se basa en romper el flujo laminar mediante cambios de geometría bruscos [8], o bien, introduciendo obstáculos en el canal principal, en forma de postes [9] o surcos [10]. También se ha analizado la posibilidad de mejorar el mezclado forzando un vórtice transversal denominado "*Dean Flow*" introduciendo una curvatura en el canal principal [11].

En cuanto a los sistemas de mezcla activo, existen los que emplean flujos de entrada pulsátiles para generar perturbaciones en el flujo laminar [12]. Otros más sofisticados emplean campos acústicos [13], así como campos eléctricos [14] o magnéticos [15] entre otros [16, 17].

Los dispositivos activos son muy eficientes, no obstante, la necesidad de emplear actuadores externos los hacen en ocasiones demasiado sofisticados y difíciles de integrar en otros microdispositivos. Por otro lado, los mezcladores pasivos emplean geometrías complicadas para

conseguir grandes eficiencias de mezclado, que encarecen el producto final. La necesidad de una mezcla eficiente en un espacio de tiempo reducido, hace que los dispositivos activos sean más atractivos. No obstante, la mejor opción es un dispositivo pasivo sencillo, eficiente y de fácil integración.

La detección, cuantificación y el análisis de muestras de interés clínico como ADN, proteínas o aminoácidos [18, 19], necesitan de procesos de separación eficientes, por lo que se ha realizado un notable esfuerzo para desarrollar este tipo de microtecnologías. Así, los dispositivos de separación pasivos se proyectan en aplicaciones relacionadas con el acondicionamiento de muestras biológicas como por ejemplo, aplicando el efecto capilar en la separación del plasma sanguíneo [20], la sedimentación [21] o efecto Zweifach-Fung [22]. Para la extracción de analitos de diferentes tamaños, se han desarrollado filtros en H, donde los analitos se extraen por la diferencia en el coeficiente de difusión molecular [23]. También se han empleado fuerzas hidrodinámicas controlando las condiciones de entrada, en canales curvos [24], y en canales rectos [25], para la separación de partículas.

A su vez, se han desarrollado microseparadores activos, que emplean como método de separación la fuerza centrífuga [26], campos ultrasonidos [27], eléctricos [28] o magnéticos [29].

Al igual que sucede en los dispositivos de mezclado, los dispositivos activos han sido más eficaces que los pasivos, pero también más complicados de integrar en otros dispositivos. En la separación pasiva, sin embargo, aun siendo poco eficiente y compleja, se está realizando grandes avances [30].

Una de las aplicaciones que se le han atribuido a los dispositivos microfluídicos, es la limpieza de células criogenizadas, extrayendo el crio protector mediante difusión molecular [31, 32]. Uno de estos crio protectores es el DMSO que se emplea para criogenizar tanto células, como tejidos u órganos [33]. Aunque el DMSO protege a la célula en el congelamiento, su exposición a un periodo de tiempo elevado puede dañarlas debido a su toxicidad, incluso hasta matarlas. Se han asociado también reacciones adversas a la infusión de estas células debido al porcentaje de DMSO adherido en ellas [34, 35]. Por ello, antes de implantar las células, es necesaria su limpieza. La técnica habitual de limpieza es el centrifugado, sin embargo, este sistema puede dañar hasta un 30% de las células [36] haciendo a los microdispositivos una alternativa a este método.

No obstante, los microdispositivos presentados para la extracción del DMSO de las células, podría tener una aplicabilidad limitada, ya que la separación por difusión molecular podría ser demasiado lenta. En este trabajo se propone un estudio experimental y numérico en los microdispositivos para optimizar la eficiencia de separación de estos fluidos biológicos, mediante fuerzas térmicas aplicando gradientes de temperatura y haciendo uso del efecto de la termodifusión.

## 5.1.- Modelo numérico

En este apartado se va a analizar numéricamente [37] el proceso de separación bajo el efecto de la termodifusión en base al microdispositivo empleado por Mata et. al [32] para la separación del DMSO por difusión molecular. Este dispositivo que se muestra en la Figura 5.1a se compone principalmente de una cavidad central de sección constante rectangular donde se produce la separación por difusión molecular del DMSO. Los flujos se introducen a través de dos entradas opuestas. Estos dos flujos están separados por una placa divisora que redirige el flujo e impide la mezcla entre ellos, de modo que fluyen en paralelo hasta la cavidad central. La extracción del flujo se realiza mediante dos salidas, idénticas al diseño de entrada. De la entrada superior se introduce el líquido de limpieza, en este caso es el PBS, mientras que desde la entrada inferior se introduce una mezcla de 10% de DMSO en PBS. Debido al bajo coeficiente de difusión molecular de las células ( $\sim 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ ), respecto al del DMSO ( $\sim 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ), se ha supuesto que estas no emigrarán hacia la salida superior, por lo que no se han tenido en cuenta en este estudio. El modelo utilizado en la simulación numérica representa las partes principales del dispositivo, es decir, la cavidad central y la transición en la entrada y en la salida (Figura 5.1b). La cavidad central consiste en dos placas planas que generan una cavidad rectangular constante. Las dimensiones de la misma son exactamente las que se utilizan en [32], 25 mm de ancho, 500  $\mu\text{m}$  de altura y 75 mm de largo. La longitud total de las entradas hasta las salidas es de  $L = 125 \text{ mm}$ . El divisor de entrada permite lograr un flujo parabólico totalmente desarrollado a la entrada de la cavidad central. Mientras que, el divisor de salida es para obtener una extracción de muestras sin perturbaciones.

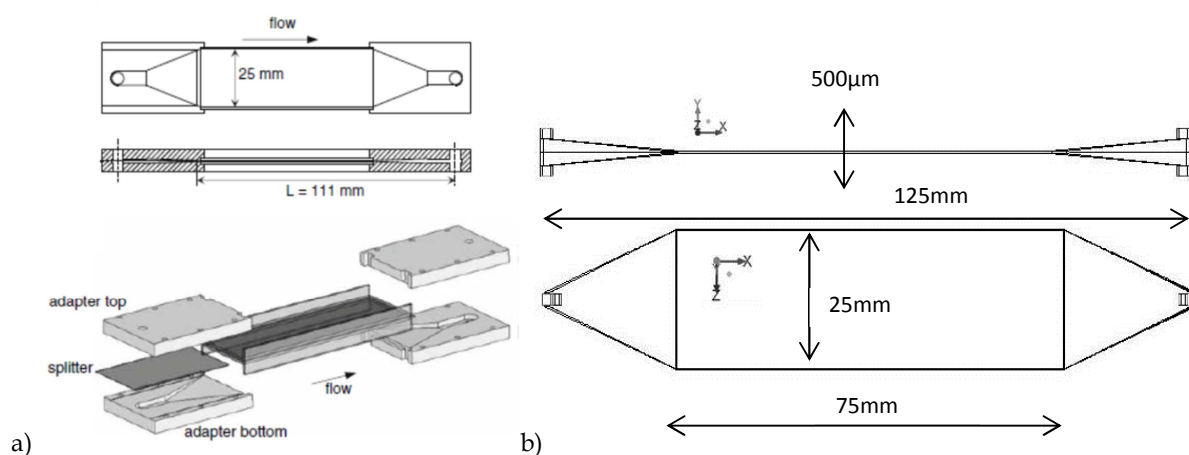


Figura 5.1: Dispositivo empleado para la extracción del DMSO. a) Esquema del dispositivo [32], b) modelo empleado para el estudio numérico.

Se ha utilizado un método numérico implícito en 3D suponiendo un caso incompresible y de flujo laminar a presión atmosférica. Para obtener resultados de mayor precisión se ha empleado el método de doble precisión. Para evitar inestabilidades, se ha utilizado una discretización de segundo orden para la presión, densidad, velocidad, flujo de masa y energía. El criterio de convergencia residual se ha establecido en un orden de magnitud de  $10^{-14}$ . De esta manera se asegura alcanzar el estado estacionario. Para el pre-procesamiento en 3D del dominio computacional, integrado por una malla de celdas hexaedrales espaciadas de manera no uniforme, se ha empleado el software Gambit [38]. Se ha utilizado una resolución de malla muy fina de 1125000 celdas para tener una representación realista de los gradientes de concentración.

El modelo cubre la difusión molecular de Fick, así como la termodifusión mediante el modelo "*Species Transport*", mientras que los cambios de densidad en el fluido con la concentración y temperatura están cubiertos por la aproximación de Boussinesq, como se describe en la ecuación (4.2). Para conocer la contribución del gradiente de temperatura, está habilitada la opción de "*Thermodiffusion*". El transporte de masa se describe según la ecuación (3.1). La diferencia de temperatura aplicada es de 10 K, que se impone entre la parte superior e inferior de las paredes de la cavidad central. Se ha impuesto la condición de "no-slip" en las paredes.

### 5.1.1.-Validación del modelo numérico

En este estudio, se ha analizado numéricamente el efecto difusivo sobre el proceso de separación de la mezcla en ausencia del gradiente de temperatura. Con el fin de validar el modelo numérico desarrollado se han reproducido los resultados de separación en [32] para diferentes condiciones de trabajo [39]. Para realizar el modelo numérico se han utilizado las propiedades termofísicas y de transporte de la mezcla biológica que han sido determinadas en el apartado 3. Estos datos se representan en la Tabla 3.2. Los resultados obtenidos para los 16 casos analizados se exponen en la Tabla 5.1, donde se representa la variable dependiente adimensional de la concentración en la salida inferior  $c_c/c_0$  donde  $c_0$  es la concentración másica inicial de DMSO (10%), y  $c_c$  la concentración másica del DMSO a la salida. De la misma manera, se representa el ratio entre los flujos de entrada, de acuerdo con la ecuación (5.1):

$$f_q = \frac{Q_{DMSO - PBS}}{Q_{TOT}} \quad (5.1)$$

Donde  $Q_{DMSO-PBS}$  es el caudal de la mezcla de DMSO-PBS a una fracción másica de DMSO del 10% y  $Q_{TOT}$  el caudal de entrada total. El caudal de entrada del PBS se denomina  $Q_{PBS}$ , por lo que  $Q_{TOT} = Q_{PBS} + Q_{DMSO-PBS}$ .

**Tabla 5.1: Comparación del ratio de separación en ausencia de gradientes de temperatura, para mezclas de DMSO-PBS con una fracción másica del 10% de DMSO a una temperatura media de 25°C.**

$f_q$	$Q_{TOT} (m^3/min)(10^{-8})$	$c_c/c_0$ [32]	$c_c/c_0$ (Este trabajo)	Desviación (%)
0,1	3,3	0,13	0,132	1,53
0,1	5,4	0,17	0,173	1,76
0,1	7,5	0,20	0,202	1
0,1	13,3	0,26	0,257	-1,15
0,15	3,3	0,20	0,204	2
0,15	5,4	0,25	0,255	2
0,15	7,5	0,29	0,296	2,06
0,15	13,3	0,37	0,373	0,81
0,23	3,3	0,30	0,304	1,33
0,23	5,4	0,36	0,373	3,6
0,23	7,5	0,41	0,426	3,9
0,23	13,3	0,52	0,524	0,77
0,37	3,3	0,46	0,457	-0,65
0,37	5,4	0,53	0,534	0,75
0,37	7,5	0,59	0,591	0,17
0,37	13,3	0,69	0,689	-0,15

Estos resultados se muestran en un diagrama neutral (Figura 5.2) de la variable adimensional dependiente  $c_c/c_0$  en función de  $(1/Pe)(L/d)$ , donde  $Pe$  es el número de Peclet,  $L$  la longitud y  $d$  la altura de la zona de difusión. El número de Peclet se determina como  $Pe = U \cdot d/D$ , donde  $U$  es la velocidad media. Estas variables están parametrizadas por  $f_q$ , en donde los resultados de [32] se comparan con los obtenidos en este trabajo. La afinidad entre los resultados concluye que el modelo desarrollado reproduce fielmente el comportamiento de separación en el régimen puramente difusivo, quedando así validado.

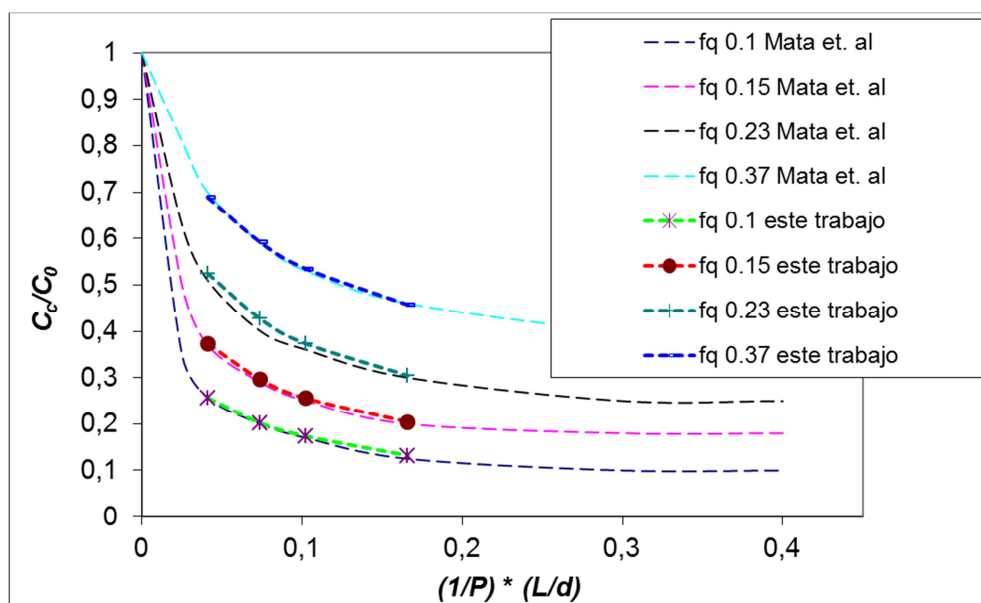


Figura 5.2: Fracción de extracción de DMSO  $c_c/c_0$  en función de  $(1/Pe) (L/d)$ .

## 5.2.- Dispositivo experimental

### 5.2.1.-El dispositivo

El dispositivo empleado para el estudio experimental de la extracción de DMSO, ha sido construido en aluminio y se ha mecanizado mediante arranque de viruta. La huella superior e inferior son de idéntica geometría, donde por la parte interior se ha mecanizado el volumen por donde fluirá la muestra y por la parte exterior se ha mecanizado una cavidad para el circuito hidráulico encargado de generar el gradiente de temperatura. La geometría interna es idéntica a la empleada en el modelo numérico, para que los resultados numéricos y experimentales puedan ser contrastados. Asimismo, las entradas y salidas superiores e inferiores se encuentran enfrentadas. Se han empleado puertos de entrada/ salida enroscables de teflón. Para los separadores se ha empleado una lámina aislante de 100 micras de grosor. Para generar el gradiente térmico se han empleado dos baños atemperados termostáticamente (LAUDA Proline RP-855). La medición de la temperatura se ha llevado a cabo mediante PT100 a una distancia del *gap* de 1mm, donde las tomas de medida se encuentran a ambos lados, al principio y al final de la cavidad central, para poder controlar tanto el gradiente vertical como horizontal. El *gap* se ha delimitado con Polieterecetona (PEEK), de gran estabilidad química y con baja conductividad y expansión térmica [40, 41]. Para lograr la estanqueidad de todos los elementos, se ha empleado un hilo tórico de vitón.

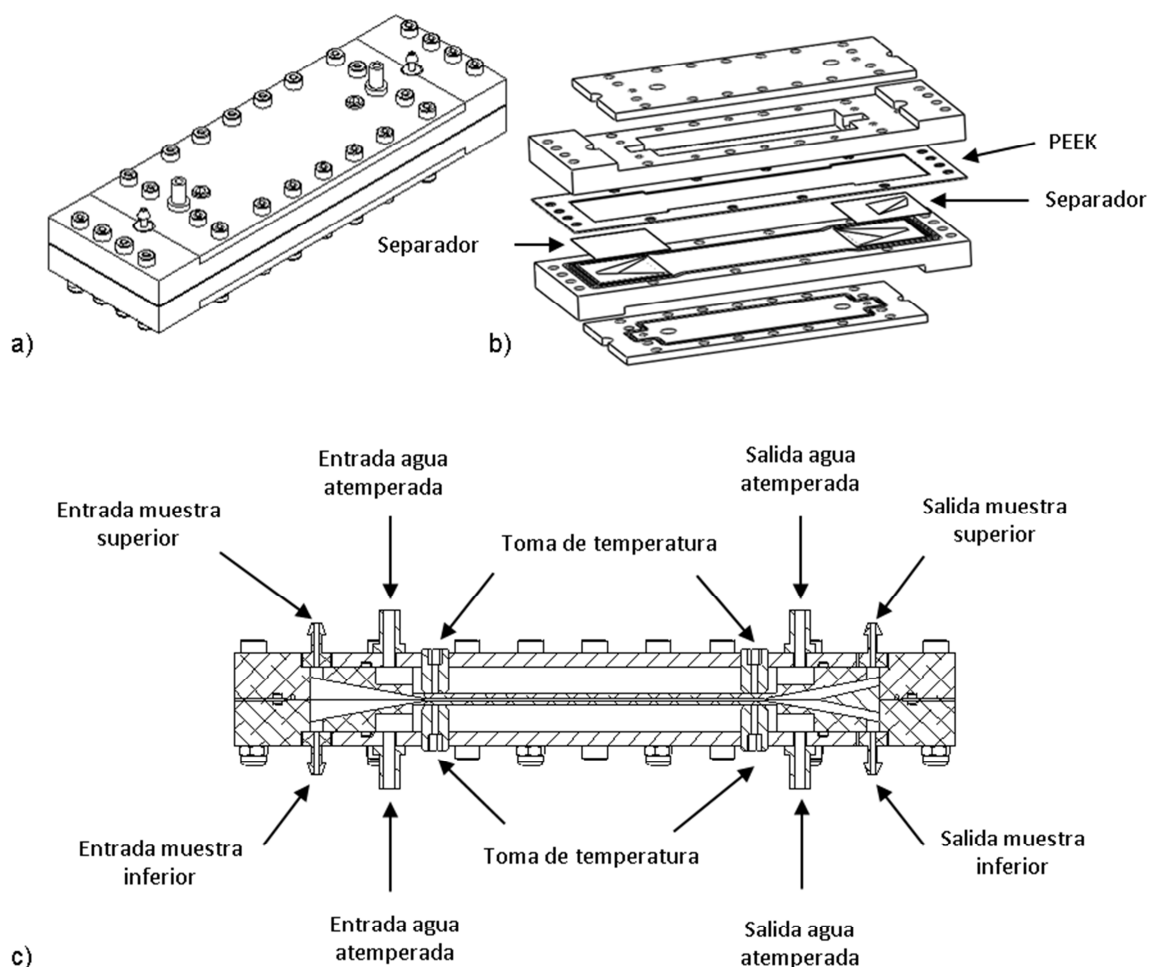


Figura 5.3: Dispositivo experimental diseñado y construido. a) Dispositivo ensamblado. b) Dispositivo explosionado. c) Corte central del dispositivo.

Para conseguir un buen acabado superficial, se ha pulido toda la cavidad interna con pasta de polvo de diamante de  $1\mu\text{m}$ , (STRUERS, DP-Paste M). En la Figura 5.3 se puede apreciar el conjunto completo del microdispositivo diseñado (Figura 5.3a), así como los detalles internos del mismo (Figura 5.3b y c).

### 5.2.2.- Control de flujo

El control de flujo se ha conseguido mediante el dispositivo MFCS-8C-1000mbar (*Microfluidic Control System*) y *Flowell-1000 $\mu\text{L}/\text{min}$*  con el software *Maesflow* de la empresa Fluigent. El primero, se encarga del control de presión con una resolución de un 1mbar y una presión máxima de 1034mbar. El control de presión se realiza, tanto a las dos entradas, como a las dos salidas. El *Flowell* se encarga de

controlar el flujo. Consta de tres flujómetros, por lo que el control de las dos entradas y salidas está garantizado. La máxima medida de flujo, es de 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$  con una resolución de 0,1 $\mu\text{L}/\text{min}$ , teniendo un margen de error de  $\pm 5\%$ .

### 5.3.- Validación numérica y experimental del dispositivo

Para corroborar el buen funcionamiento de la separación del microdispositivo construido, se han analizado experimentalmente los resultados, en el régimen puramente difusivo mediante una mezcla cuyas propiedades termofísicas y de transporte son conocidas. La mezcla de referencia es H<sub>2</sub>O-Isopropanol a una fracción másica del 50%. En la Tabla 5.2 se resumen las propiedades necesarias para realizar este estudio [42].

**Tabla 5.2: Propiedades termofísicas y de transporte de la mezcla H<sub>2</sub>O-Isopropanol a una fracción másica del 50% y a T=25°C.**

H <sub>2</sub> O	$\rho(\text{kg}/\text{m}^3)$	$\mu(\text{mPa}\cdot\text{s})$	$\beta$	$\alpha(\text{K}^{-1})(10^{-3})$	$D(\text{m}^2/\text{s})(10^{-10})$
50%	902,37	3,055	0,2606	0,9004	1,68

Se ha analizado la evolución de la mezcla por difusión molecular en función del caudal de flujo. Para ello, y teniendo en cuenta que el componente más denso en la mezcla H<sub>2</sub>O - Isopropanol es el H<sub>2</sub>O, se ha introducido por la entrada inferior una mezcla de 53% de H<sub>2</sub>O, y por la parte superior, una de 47% de H<sub>2</sub>O, para evitar la convección. El rango de caudales de cada entrada ha sido desde 50 $\mu\text{l}/\text{min}$  hasta 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ , donde el caudal de ambas entradas ha sido el mismo. Todos los ensayos se han realizado a una temperatura de 25°C. Para determinar las características de las muestras a la salida, se ha utilizado el método de análisis basado en la medida de la densidad. En la Figura 5.4 se muestra el esquema del sistema de medición experimental, mientras que en la Figura 5.5 se muestra el sistema de medición experimental.



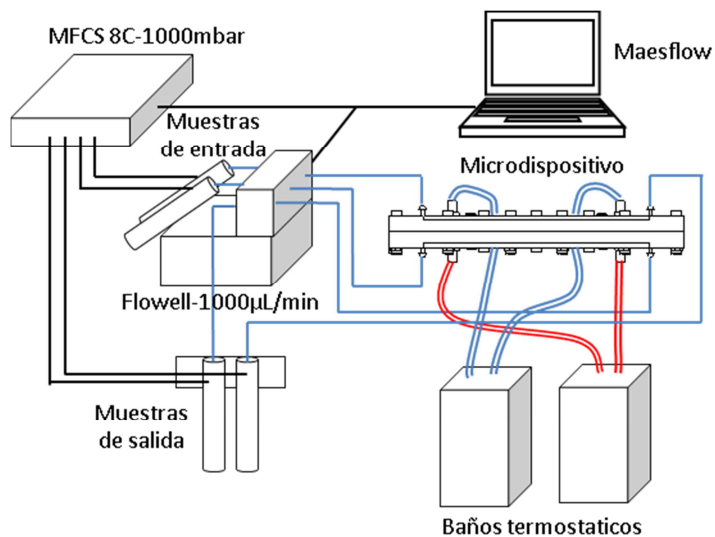


Figura 5.4: Esquema del sistema de medición experimental.

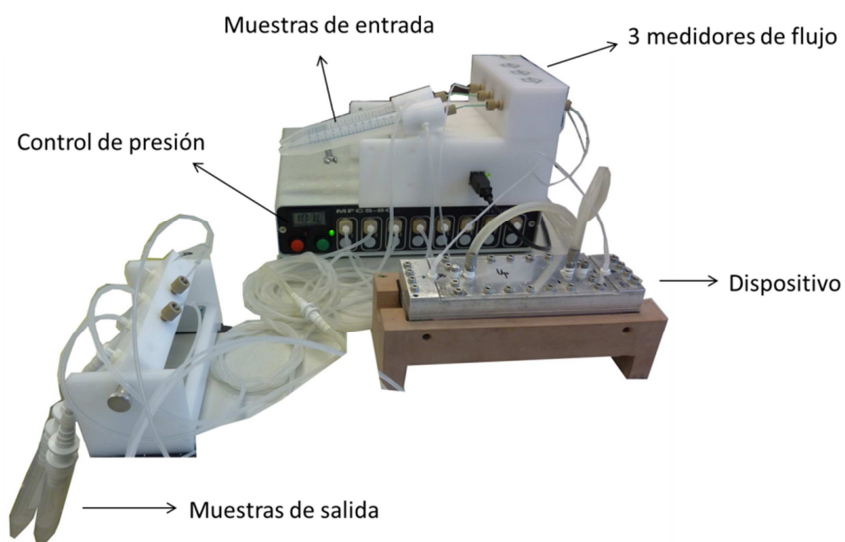


Figura 5.5: Sistema de medición experimental.

En total, se han analizado 10 casos de diferentes caudales. En la Figura 5.6 se muestran los resultados obtenidos.

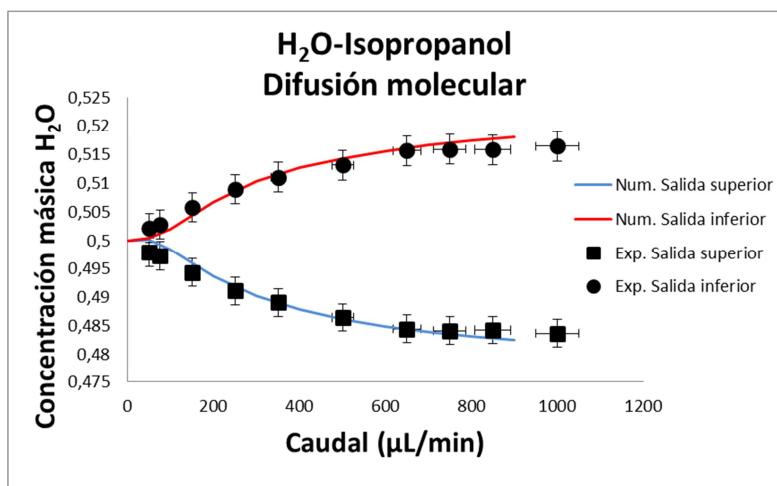


Figura 5.6: Comparativa entre resultados experimentales y numéricos de la mezcla H<sub>2</sub>O-Isopropanol por difusión molecular en función del caudal a T=25°C.

En la Figura 5.6 se representan con líneas sólidas los resultados numéricos, donde el color azul representa los resultados de la concentración de H<sub>2</sub>O de la salida superior, y en rojo, los de la salida inferior. Los cuadrados llenos representan los datos experimentales de la concentración de la salida superior, y los círculos rellenos, los de la salida inferior. Tal y como se aprecia en la Figura 5.6, el buen acuerdo entre los resultados experimentales y numéricos, valida el funcionamiento del microdispositivo experimental.

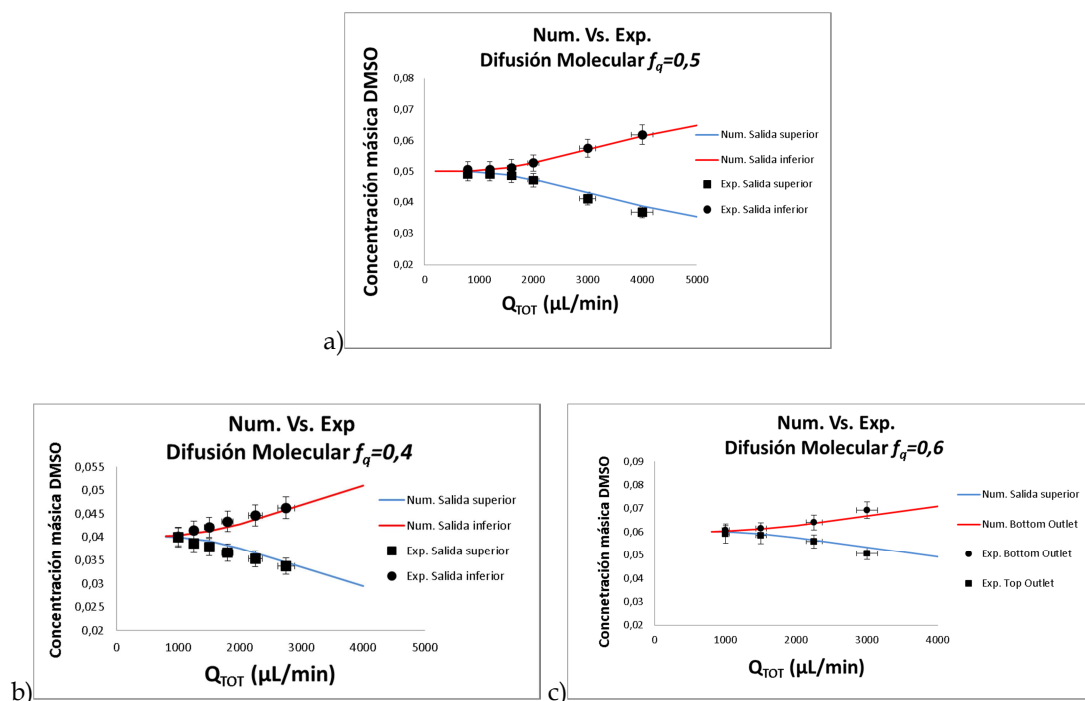
#### 5.4.- Resultados experimentales

Para analizar el comportamiento termohidrodinámico del microdispositivo, es imprescindible determinar las propiedades termofísicas y de transporte de la mezcla de interés. Esta mezcla corresponde a DMSO-PBS a un fracción másica del 10% de DMSO. En concreto, se ha determinado la densidad, viscosidad, coeficiente de expansión másica y térmica y los coeficientes de difusión molecular y termodifusión. Estos resultados se representan en la Tabla 3.2.

Tal y como se puede ver en la Tabla 3.2, el signo del coeficiente de termodifusión de la mezcla analizada es positivo, lo que quiere decir que obedece a un comportamiento de Soret positivo. Ya que el componente más denso de la mezcla es el DMSO, éste será el que se verá atraído hacia la pared más fría. Así, para que el proceso de extracción del DMSO sea satisfactorio bajo el gradiente de temperatura, la dirección del gradiente de temperatura aplicado debe ser en la dirección de la aceleración gravitacional, es decir, calentando la pared inferior del dispositivo y enfriando la superior. La estabilidad de un sistema calentando la pared inferior y enfriando la superior de una célula horizontal estanca, ha sido comprobada con anterioridad en [43]. De esta manera, el DMSO introducido desde la entrada inferior, será enriquecido hacia la salida superior.

En primer lugar, se ha analizado el comportamiento de la mezcla, solamente en el régimen difusivo a 25°C. Para ello, se han analizado diferentes condiciones de ratio de flujos de entrada;  $f_q = 0,4$ ,  $f_q = 0,5$  y  $f_q = 0,6$ . Así, se introduce un 40% del flujo total de la entrada inferior, para el caso de  $f_q = 0,4$ , 50% para el caso de  $f_q = 0,5$  y 60% para el caso  $f_q = 0,6$ .

En la Figura 5.7 se comparan los resultados experimentales conjuntamente con los numéricos, donde se representa la fracción másica del DMSO tanto de la salida superior como de la inferior en función del caudal total. La concordancia de los resultados, demuestra que las propiedades termofísicas y de transporte determinadas, así como el modelo numérico empleado, son los correctos. Las barras de error horizontales, corresponden al error de medida del flujómetro, que en el peor de los casos es del 5%, mientras que el error vertical corresponde a la diferencia entre los resultados obtenidos de los diferentes ensayos realizados, que en el peor de los casos es del 6%.



**Figura 5.7: Comparativa entre la separación de DMSO por difusión molecular representado como fracción másica del DMSO a las salidas en función del caudal total. a) Caso  $f_q = 0,5$ , b) caso  $f_q = 0,4$  y c) caso  $f_q = 0,6$ .**

Analizando los resultados, se observa que la capacidad de extracción máxima de DMSO en cada caso está determinada por los caudales de entrada. La mínima concentración de DMSO a la salida es directamente proporcional a  $f_q$ .

Como paso final de este estudio, se ha analizado numérica y experimentalmente la optimización de la extracción del DMSO bajo un gradiente de temperatura de 10K para el caso  $f_q = 0,5$ . Se ha analizado este caso para poder comprobar la influencia del gradiente de temperatura directamente en los resultados de separación. En los casos con diferentes caudales de entrada, la interface de difusión tiene una velocidad relativa, por lo que la lectura del análisis de la influencia de  $\Delta T$  en el nivel de separación, sería más complicada.

En la Figura 5.8 se representa la comparativa numérica de la extracción del DMSO, donde en línea discontinua se representa el caso de extracción por difusión molecular, y con línea sólida, el caso empleando el gradiente de temperatura. Como se puede apreciar, se observa una mejoría en la extracción del DMSO incluso para los de mayor caudal. Esta mejoría se establece en torno al 10% para todos los caudales analizados, llegando a una extracción másica por la parte superior de un 55% del DMSO y por la parte inferior de un 45%.

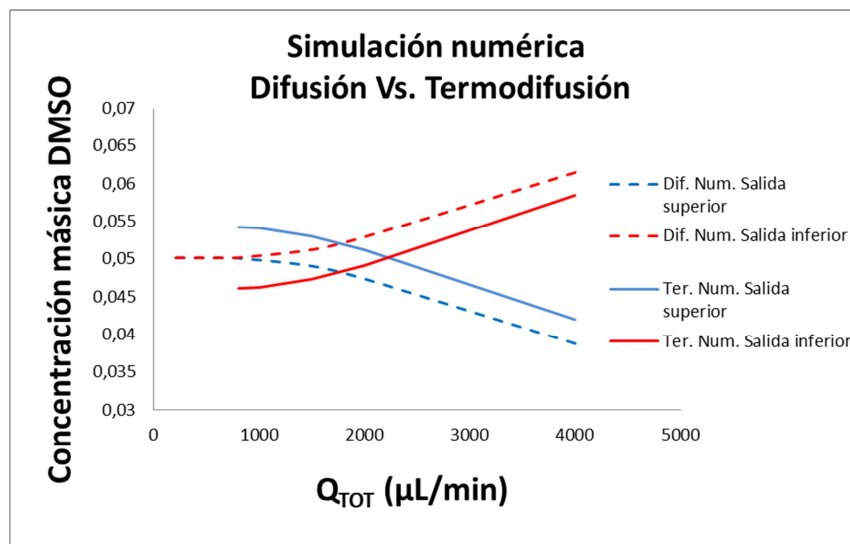


Figura 5.8: Comparativa de la fracción másica extraída a las salidas superior e inferior en función del caudal total para los casos de extracción por difusión molecular (en líneas discontinuas) y aplicando el gradiente de temperatura (líneas sólidas), para el caso  $f_q = 0,5$  a una temperatura media de  $T=25^{\circ}\text{C}$

De los resultados numéricos obtenidos, se puede analizar la eficiencia de separación, entendida como el porcentaje necesario para alcanzar la mezcla homogénea:

$$Eficiencia_{Extracción} = 100 \cdot \frac{(c_0 - c_c)}{f_q \cdot c_0} \quad (5.2)$$

En la Figura 5.9, se representa esta eficiencia en función del caudal para el caso puramente difusivo y termodifusivo. Como se puede observar, mientras que el caso difusivo llega a su eficiencia máxima en torno a 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$ , en el caso termodifusivo, esta cota se alcanza en torno a 2250  $\mu\text{L}/\text{min}$ , por lo

que se consigue acelerar el proceso de separación. Para flujos inferiores, los resultados muestran, que el efecto térmico, enriquece el DMSO hacia la salida superior, retando a la gravedad, obteniendo una eficiencia de extracción por encima del 100%, hasta llegar al 110%.

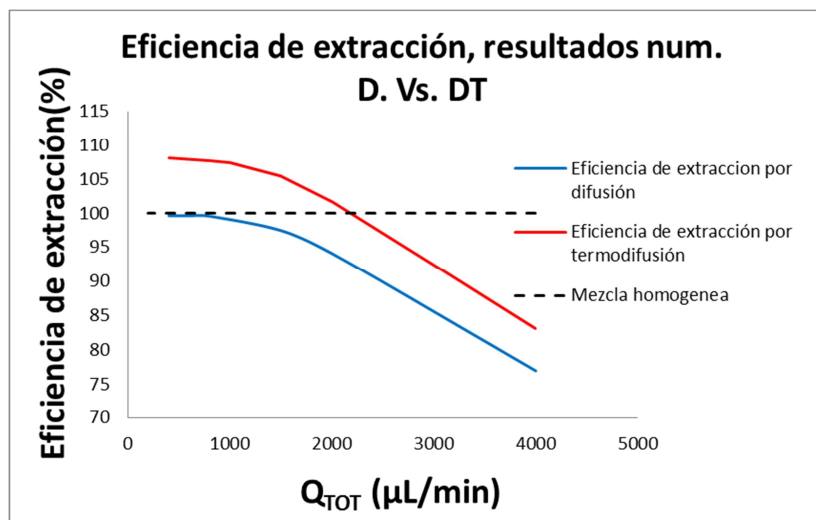


Figura 5.9: Resultados numéricos de la eficiencia de la extracción del DMSO por difusión molecular (azul) y aplicando el gradiente de temperatura (rojo), para  $f_q = 0,5$  a una temperatura media de  $T=25^\circ\text{C}$ .

Finalmente, se han comparado los resultados experimentales con los obtenidos numéricamente en el régimen termodifusivo. Como se puede ver en la Figura 5.10, en líneas solidas se representan los resultados numéricos y en puntos y cuadrados rellenos, los experimentales. Tal y como se puede apreciar el comportamiento de unos y otros es coincidente. Esto reafirma que el efecto térmico es un mecanismo que puede optimizar la eficiencia de separación hasta el 10% para el caso analizado. Por otro lado, también se puede apreciar que en el estudio experimental la homogeneización de la mezcla sucede a mayor caudal. Esta discordancia puede ser originada debido a la desviación existente en la determinación del coeficiente de termodifusión, debido a la aproximación de emplear el PBS como un fluido puro.

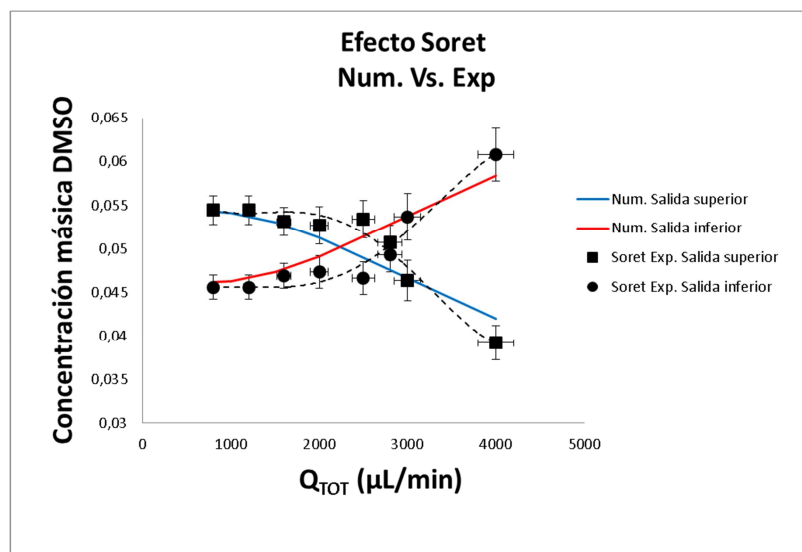


Figura 5.10: Comparativa numérico-experimental de la extracción del DMSO en función del caudal total. En líneas los resultados numéricos y en puntos y cuadrados rellenos los resultados experimentales.

## 5.5.- Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado numérica y experimentalmente que el efecto Soret optimiza el proceso de extracción de especias en torno al 10% para la mezcla DMSO-PBS, respecto a los dispositivos que utilizan únicamente la difusión molecular como mecanismo de transporte. La  $\Delta T$  aplicada ha sido de 10K.

Para poder analizar el comportamiento termodinámico de la mezcla analizada, se han determinado sus propiedades termofísicas y de transporte. Estos resultados han permitido establecer la dirección del gradiente de temperatura para que el proceso de separación sea beneficioso en el enriquecimiento de DMSO.

Se ha diseñado y construido un microdispositivo (Figura 5.3) basado en la geometría del modelo de Mata et. al. Se ha comprobado su buen funcionamiento validando los resultados numérico-experimentales con la mezcla  $\text{H}_2\text{O}$ -Isopropanol a una fracción másica del 50% a  $T=25^\circ\text{C}$ . A su vez, se ha comprobado la concordancia entre los resultados numéricos y experimentales en la extracción del DMSO del PBS por difusión molecular para diferentes casos de flujos de entrada  $f_q = 0,4$ ,  $f_q = 0,5$  y  $f_q = 0,6$ .

Finalmente, se ha analizado para el caso  $f_q = 0,5$  el efecto del gradiente de temperatura y se ha mostrado numérica y experimentalmente que el proceso ha sido optimizado en torno al 10% para los casos de flujos analizados. Además de los resultados obtenidos, se observa que controlando la velocidad del caudal y el régimen termodifusivo, se puede lograr que el proceso de mezclado entre

componentes sea más rápido. Como conclusión final, se puede confirmar que el efecto de la termodifusión puede llegar a mejorar el funcionamiento de los microdispositivos, sea para la separación o para el mezclado. Por ello, en futuros diseños de microdispositivos que tengan fuentes de calor, provenientes de actuadores externos por ejemplo, este efecto debe ser tenido en cuenta para optimizar su rendimiento.





## 5.6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. J. Lee . S. Y. Lee, "Micro total analysis system ( $\mu$ -TAS) in biotechnology", *Appl Microbiol Biotechnol.*, **64**, pp.289-299, (2004).
- [2] N. Pamme, "Continuous flow separations in microfluidic devices", *Lab Chip*, **7**, pp. 1644-1659, (2007).
- [3] T. M. Squires, S. R. Quake, "Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale", *Rev. Mod. Phys.*, **77**, pp. 977-1026, (2005).
- [4] A. E. Kamholz, "Quantitative analysis of molecular interactive in microfluidic channel: the T-sensor" *Anal. Chem.*, **71**, pp. 5340-7, (1999).
- [5] A. E. Kamholz and Paul Yager, "Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels", *Biophys. J.*, **80**, pp. 155-160, (2001).
- [6] R. F. Ismagilov, "Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels" *Appl. Phys. Lett.*, **76**, pp. 2376-78, (2000).
- [7] T. M. Floyd, M. A. Schmidt, K. F. Jensen, "Silicon micromixers with infrared detection for studies of liquid-phase reactions", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**, pp. 2351-2358, (2005).
- [8] R. Vijayendran, K. Motsegood, D. Beebe, D. Leckband, "Evaluation of a threedimensional micromixer in a surface-based biosensor", *Langmuir*, **19**(5), pp. 1824-1828, (2003).
- [9] A. Asgar, S. Bhagat, E. T. K. Peterson and I. Papautsky, "A passive planar micromixer with obstructions for mixing at low Reynolds numbers", *J. Micromech. Microeng.*, **17**, pp. 1017-1024 (2007).
- [10] T. Johnson, D. Ross, L. Locascio, "Rapid microfluidic mixing", *Anal. Chem.*, **74**, pp. 45-51 (2002).
- [11] F. Jiang, K. Drese, S. Hardt, M. Kupper, F. Schonfeld, "Helical flows and chaotic mixing in curved micro channels". *AIChE J.*, **50**(9), pp. 2297-2305, (2004).
- [12] I. Glasgow and N. Aubry, "Enhancement of microfluidic mixing using time pulsing", *Lab Chip*, **3**, pp. 114-120, (2003).
- [13] D. Ahmed, X. Mao, J. Shi, B. Juluri, T. Huang, "A millisecond micromixer via singlebubble-based acoustic streaming", *Lab Chip*, **9**(18), pp. 2738-2741, (2009).

- [14] M.Z. Huang, R.J. Yang, C.H. Tai, C.H. Tsai, L.M. Fu, "Application of electrokinetic instability flow for enhanced micromixing in cross-shaped microchannel", *Biomed. Microdevices*, **8**, pp. 309-315, (2006).
- [15] H. H. Bau, J. Zhong and M. Yi, "A minute magneto hydro dynamic (MHD) mixer", *Sens. Actuators B*, **79**, pp. 207-15, (2001).
- [16] L. Capretto, W. Cheng, M. Hill and X. Zhang, "Micromixing within microfluidic devices", *Top. Curr. Chem.*, **304**, pp. 27-68, (2011).
- [17] N.T. Nguyen and Z. Wu, "Micromixers—a review", *J. Micromech. Microeng.* **15**, pp.1-16, (2005).
- [18] D. R. Gossett, W. M. Weaver, A. J. Mach, S. C. Hur, H. T. K. Tse, W. Lee, H. Amini, D. Di Carlo, "Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems", *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, pp. 3249-3267, (2010).
- [19] C.H. Tai, S.K. Hsiung, C.Y. Chen, M.L. Tsai, G.B. Lee, "Automatic microfluidic platform for cell separation and nucleus collection", *Biomed Microdevices*, **9**, pp. 533-543, (2007).
- [20] D. Kim, J. Y. Yun , S. J. Park, S. S. Lee, "Effect of microstructure on blood cell clogging in blood separators based on capillary action", *Microsys. Technol.*, **15**, pp. 227-233, (2009).
- [21] T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, B. Yoshinobu, "Simultaneous separation, metering, and dilution of plasma from human whole blood in a microfluidic system", *Anal.Chem.*, **81**, pp. 3194-3198, (2009).
- [22] S. Yang, B. A. Undar, Jeffrey D., Zahn, "A microfluidic device for continuous, real time blood plasm separation", *Lab chip*, **6**, pp. 871-880, (2006).
- [23] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, Kristen Helton, Kjell Nelson, Milton R. Tam and Bernhard H. Weigl, "Microfluidic diagnostic technologies for global public health", *Nature*, **442**, pp. (2006).
- [24] S. S. Kuntaegowdanahalli, A. Asgar, S. Bhagat, G. Kumarb and I. Papautsky, "Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral Microchannels", *Lab Chip*, **9**, pp. 2973-2980, (2009).
- [25] A. Asgar, S. Bhagat, S.S. Kuntaegowdanahalli, I. Papautsky, "Inertial microfluidics for continuous particle filtration and extraction", *Microfluid Nanofluid*, **7**, pp. 217-226, (2009).
- [26] S. Haeberle, T. Brenner, R. Zengerle and J. Ducreé, "Centrifugal extraction of plasma from whole blood on a rotating disk", *Lab Chip*, **6**, pp. 776-781, (2006).

- [27] I. González, L. J. Fernández, T. E. Gómez, J. Berganzo, J. L. Soto, A. Carrato, "A polymeric chip for micromanipulation and particle sorting by acoustic fields based on a multilayer configuration", *Sens. Actuators B*, **144**, pp. 310-317, (2010).
- [28] M. T. Badal, M. Wong, N. Chiem, H. Salimi-Moosavi, D. J. Harison, "Protein separation and surfactant control of electroosmotic flow in poly(dimethylsiloxane) coated capillaries and microchips", *J Chromatogr A*, **947**, pp. 277-286, (2002).
- [29] N. Xia, T. P. Hunt, B. T. Mayers, E. Alsberg, G. M. Whitesides, R. M. Westervelt, D. E. Ingber, "Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow", *Biomed. Microdevices*, **8**, pp. 299-308, (2006).
- [30] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels", *PNAS*, **104**, pp. 18892-18897, (2007).
- [31] K.K. Fleming, E.K. Longmire, A. Hubel, "Numerical characterization of diffusion-based extraction in cell-laden flow through a microfluidic channel", *J. Biomech. Eng.*, **129**, pp. 703-711, (2007).
- [32] C. Mata, E.K. Longmire, D.H. McKenna, K.K. Glass, A. Hubel, "Experimental study of diffusion-based extraction from a cell suspension", *Microfluid Nanofluid*, **5**, pp. 529-540, (2008).
- [33] A. Torreggiani, M. Di Foggia, I. Manco, S.A. Markarian, S. Bonora, "Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme: A calorimetric and Raman study", *J. Mol. Struct.*, **891**, pp. 115-122, (2008).
- [34] J. R. O'Donnell, A. K. Burnett, T. Sheehan, P. Tansey and G. A. McDonald, "Safety of dimethylsulphoxide". *Lancet*, **1**, pp. 8218, (1981).
- [35] A. Zambelli, G. Poggi, G. A. Da Prada, "Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion". *Anticancer Res.*, **18**, pp. 4705-4708, (1998).
- [36] V. Antonenas, K. Bradstock, P. Shaw, "Effect of washing procedures on unrelated cord blood units for transplantation in children and adults", *Cytotherapy*, **4**, pp. 16, (2002).
- [37] Ansys Inc., (2010), Ansys-Fluent 13.0, Lebanon, USA.
- [38] Ansys inc., (2010), Gambit 2.4.6, Lebanon, USA.

- [39] A. Martin, M. M. Bou-Ali, H. Barrutia, D. Alonso de Mezquia, "Microfluidic separation process by the Soret effect in biological fluids", *C. R. Mec.*, **339**, pp. 342–348, (2011).
- [40] C. L. Choy, K. W. Kwok, W. P. Leung, F. P. Lau, "Thermal conductivity of poly (ether ether ketone) and its short-fiber composites", *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **32**, pp. 1389–1397, (1994).
- [41] C. L. Choy, W. P. Leung, "Thermal expansion of poly (etherether-ketone) (PEEK)", *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **28**, pp. 1965–1977, (1990).
- [42] A. Mialdun, V. Yasnou, V. Shevtsova, A. Königer, W. Köhler, D. Alonso de Mezquia and M. M. Bou-Ali, "A comprehensive study of diffusion, thermodiffusion, and Soret coefficients of water-isopropanol mixtures", *J Chem Phys.* **24**, pp. 136, (2012).
- [43] B. Elhajar, M.C. Charrier-Mojtabi and A. Mojtabi, "Separation of a binary fluidmixture in a porous horizontal cavity", *Phys. Rev. E*, **77**, pp. 026310, (2008).

## Capítulo 6

---

# **Análisis del Comportamiento Hidrodinámico Sobre la Separación Selectiva de Células Tumoraes**



## 6. Análisis del Comportamiento Hidrodinámico Sobre la Separación Selectiva de Células Tumorales

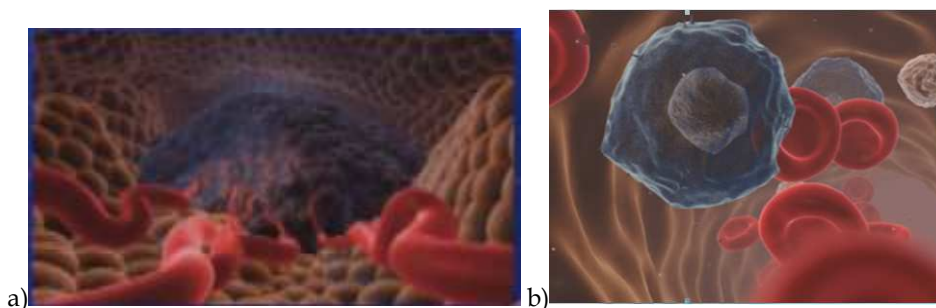
Tras la aparición de las microtecnologías, en la década de los 90, surgieron plataformas microfluídicas. Estas plataformas, con canales comprendidos entre el mm y la  $\mu\text{m}$ , han sido toda una revolución en varios sectores; especialmente, en el biotecnológico. Esta revolución se debe a las ventajas que ofrecen este tipo de microdispositivos, entre los que se encuentra: reducción del volumen de las muestras, mayor rapidez de procesamiento, mayor sensibilidad y resolución espacial, menor coste por dispositivo y mayor portabilidad [1, 2]. Las tecnologías desarrolladas han evolucionado hacia los denominados *Lab-on-chip*; dispositivos capaces de realizar todos los procesos que conlleva un análisis de muestra, desde el tratamiento de muestra, purificado, detección y cuantificación [3, 4]. Un punto de inflexión en el desarrollo de estos microdispositivos, vino de la necesidad de desarrollar tecnologías más precisas y más rápidas para el análisis de biomoléculas, principalmente orientadas hacia la secuenciación del genoma humano [2].

En los últimos años, este tipo de dispositivos, se han orientado en mayor medida hacia la biología celular, para desarrollar microdispositivos para el diagnóstico rápido de gran sensibilidad. Muchos de estos sistemas de diagnóstico necesitan de un fluido corporal, libre de células de sangre, que comúnmente suele ser el plasma. De este plasma, se analizan diferentes analitos que se emplean para el diagnóstico. Para el acondicionamiento de las muestras de sangre, es decir, para la obtención del plasma libre de células, han sido varias las tecnologías miniaturizadas. Entre ellas, se encuentran los microdispositivos, donde el procedimiento de separación se realiza mediante fuerzas capilares [5], sedimentación [6], mediante el efecto Zweifach-Fung [7] o centrifugación [8, 9]. No obstante, para otro tipo de microdispositivos, la separación de una población celular “extraña” de una muestra heterogénea, es esencial para muchas aplicaciones de diagnóstico de enfermedades, análisis del tratamiento de medicamentos o estudios fundamentales sobre crecimiento celular, para la malaria [10], HIV [11], células neuronales para enfermedades como esclerosis múltiple, párkinson, o alzhéimer [12, 13] y células tumorales circundantes en sangre periférica [14, 15]. Tanto para unas, como para otras, es esencial realizar una extracción y selección eficiente de las partículas en una muestra. Los sistemas habituales de extracción, emplean procesos de filtración basados en membranas, donde utilizando tamaños de poro diferentes, se pueden llegar a separar partículas de diferentes tamaños de una muestra multicomponente. No obstante, la fabricación de este tipo de estructuras tridimensionales, unido al problema con las obstrucciones, hacen estos sistemas poco atractivos [16]. A lo largo de los últimos años, se han desarrollado numerosas técnicas microfluídicas para la separación selectiva de

diferentes poblaciones celulares de manera continua [17, 18]. Estos sistemas, por lo general, emplean como método de separación sus propiedades físicas, que pueden ser: tamaño [19], deformabilidad [14], impedancia eléctrica [20], densidad [21], susceptividad magnética [22], movilidad [23], conductividad y permitividad [24], o propiedades hidrodinámicas [25].

El estudio de una población celular concreta, de una muestra biológica, se antoja complicado, ya que ésta suele ser la menos abundante, y por lo tanto “rara o extraña”, dentro del sistema. No obstante, éstas siempre son las más interesantes de estudiar para obtener información importante sobre una enfermedad. Una de estas células, son las denominadas células tumorales circundantes en sangre periférica (CTCs), que se encuentran en pacientes enfermos de cáncer. Éstas, pueden llegar a ser una entre mil millones de glóbulos, y como media, puede llegar a haber en torno a 63 CTCs en un mililitro de sangre [15], dependiendo del paciente. Esto hace que la sensibilidad en su estudio deba ser muy elevada. El número de células tumorales circulantes en sangre de pacientes, ha sido correlacionado con la situación clínica del paciente, mostrando un elevado potencial para la detección precoz, monitorización de la enfermedad y pronóstico [26]. Asimismo, existen estudios preliminares que indican el potencial y la importancia del análisis del número de CTC como marcador temprano de recaídas en cáncer [27].

La muerte de pacientes de cáncer, muchas de las veces, es consecuencia de una metástasis. Esto sucede cuando un tumor cancerígeno lo suficientemente grande, empieza a expulsar células tumorales al riego sanguíneo. Estas células tumorales, al ser de mayor tamaño que las células normales, se quedan obstruidas en los vasos sanguíneos más delgados. Estas células, son a posteriori las causantes de la regeneración del tumor en otro órgano. En la Figura 6.1 se representa un tumor de pulmón, mientras que en la Figura 6.1b se aprecia una CTC en el riego sanguíneo.



**Figura 6.1: Iniciación de Metástasis. a) Representación de un tumor. b) Representación de una CTC de ese tumor.**

Los dispositivos empleados hasta la fecha, utilizan marcadores bioquímicos, fluorescentes o magnéticos, afines a este tipo de células como “CellVeridex”. No obstante, aunque su fiabilidad haya sido contrastada, este tipo de dispositivos sirve únicamente como método de detección. Las células tumorales detectadas nunca pueden ser empleadas para posteriores análisis. Además, el coste de cada



ensayo es demasiado elevado como para generalizar su uso. Otros dispositivos, haciendo uso de la diferencia en forma y deformación, han conseguido aislar este tipo de células sin dañarlas en absoluto, por lo que servirían para posteriores análisis [14]. No obstante, su efectividad no supera el 80%, por lo que su aplicabilidad clínica está muy limitada por este hecho.

En este contexto, parte de este proyecto se ha centrado en el estudio y optimización de un microdispositivo capaz de separar de manera selectiva células tumorales circundantes colorectales en sangre periférica, mediante ultrasonidos. El desarrollo de esta tarea se enmarca en el proyecto LOCUS y LOCUS2 en colaboración con el CSIC, Ikerlan y el Hospital General Universitario de Elche. El microdispositivo desarrollado, está actualmente patentado [28] y su eficacia de separación ha sido demostrada con coloides sintéticos [19]. La gran ventaja que presenta este dispositivo frente a los demás que se emplean para el estudio de las CTCs, es su gran potencial. No sólo de separar eficazmente las CTC; lo cual permite su fácil contaje, sino el hecho de poder disponer de dicha población celular aislada y en estado viable, para su posterior análisis.

El concepto de las CTC como biopsia asequible y no invasiva del tumor, presenta la posibilidad de caracterizar funcionalmente el comportamiento de dichas células, con respecto a su sensibilidad/resistencia a los fármacos, por lo que presenta la posibilidad de personalizar los tratamientos, empleando los fármacos más eficaces para cada paciente. Este dispositivo presenta una utilidad clínica real y potencial, de una gran trascendencia dentro de la oncología.

A continuación, se expondrá el trabajo realizado para el desarrollo y optimización de este microdispositivo de extracción selectiva de población celular.

## **6.1.- Descripción del microdispositivo**

El microdispositivo, se basa en dos entradas de sección  $200\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$ , un canal central de sección  $400\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$  y una longitud de 8mm, donde se unen las dos entradas y donde se produce la separación selectiva, y dos salidas de sección  $200\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$ . La geometría del dispositivo se puede apreciar en la Figura 6.2.

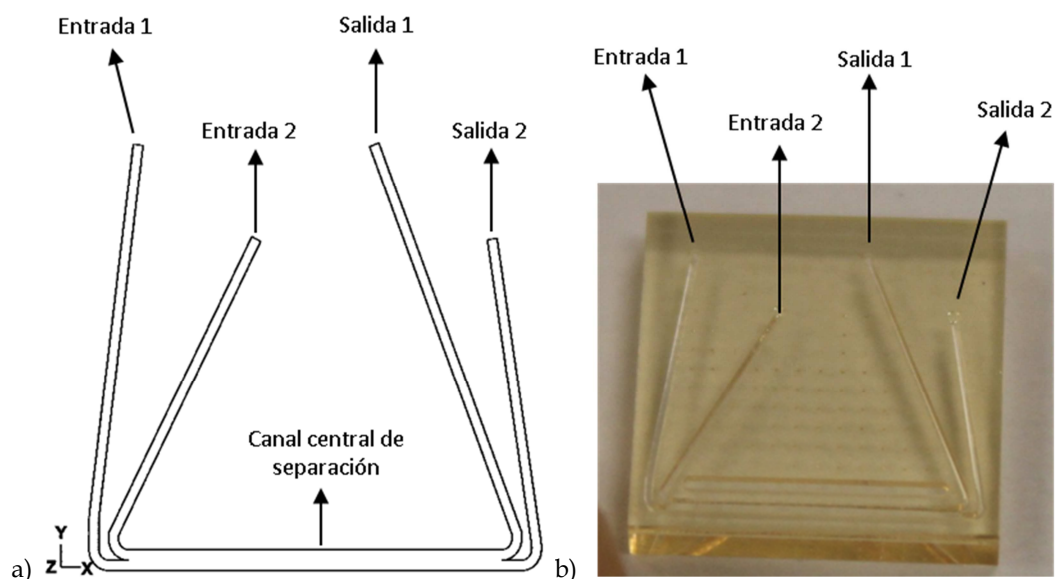


Figura 6.2: Microchip de separación activa. a) Esquema de la geometría del microdispositivo. b) Chip real.

El dispositivo, está compuesto por canales que se consiguen mediante apilamiento de diferentes capas de SU-8, estructuradas por fotolitografía sobre un sustrato rígido de PMMA (poli metacrilato de metilo). El encapsulado en donde se introduce el chip, está realizado en PMMA. Es en éste, donde se conectan los tubos por donde se introducen y extraen las muestras.

El funcionamiento del dispositivo es el siguiente: por una de las entradas, se introduce la muestra con CTCs y glóbulos blancos en PBS 1x (10% de PBS y 90% de H<sub>2</sub>O), y por la otra, como fluido colector, PBS 1x libre de células. Estos dos flujos fluyen en paralelo en el canal central. Mediante un actuador piezoeléctrico (PZ26) adherido al borde del chip, se generan los ultrasonidos. Estos, producen un nodo de presión dentro del canal en una posición concreta (Figura 6.3b), hacia donde conduce las células, en función de su tamaño y densidad ecuación (6.1). En este caso, ya que las células cancerígenas son considerablemente mayores a las demás células, éstas serán las que se vean empujadas hacia ese nodo de presión.

En este caso, el nodo de presión se sitúa a la altura del flujo colector de PBS 1x. De esta manera, a una de las salidas se enviarán las CTCs en PBS 1x, mientras que por la otra salida, se colecta el resto del fluido libre de CTC. En la Figura 6.3 se aprecia la geometría interna del chip, así como su modo de actuación.

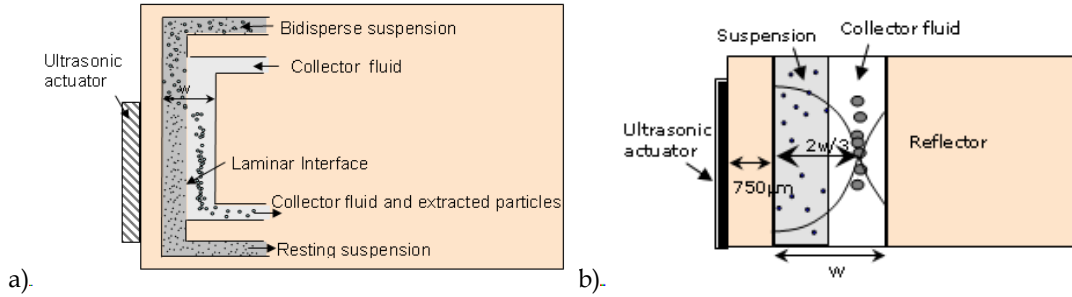


Figura 6.3: Esquema del microdispositivo de separación activa. a) Imagen esquemática del sistema de actuación. b) Modo de actuación.

De acuerdo con el trabajo [29], la fuerza por la cual se ven afectadas las células se describe como:

$$F_R = -\frac{\pi P_0^2 V_p \psi_l}{2\lambda} \phi(\psi, \rho) \sin\left(\frac{4\pi x}{\lambda}\right) \quad (6.1)$$

Donde,

$$\phi(\psi, \rho) = \frac{(5\rho_p - 2\rho_l)}{(2\rho_p + \rho_l)} - \frac{\psi_p}{\psi_l} \quad (6.2)$$

Donde  $P_0$  es el valor de la amplitud de la presión del campo acústico,  $\rho_l$  la densidad del líquido,  $\psi_l$  compresibilidad del fluido,  $V_p$  el volumen de la partícula,  $\rho_p$  la densidad de la partícula,  $\psi_p$  la compresibilidad de la partícula,  $\lambda$  la longitud de onda y  $x$  la distancia de la partícula al nodo de presión.

## 6.2.- Procedimiento experimental

### 6.2.1.- Ensayos con el chip de separación selectiva

Los ensayos experimentales se han realizado tanto en el hospital General de Elche, como en Ikerlan y en el CSIC. El material necesario para la realización de los experimentos es el siguiente:

- Chip de separación, donde se encuentran grabados los canales (Figura 6.4b), así como el porta chip (Figura 6.4a), donde se encuentran las tomas de las diferentes entradas y salidas.

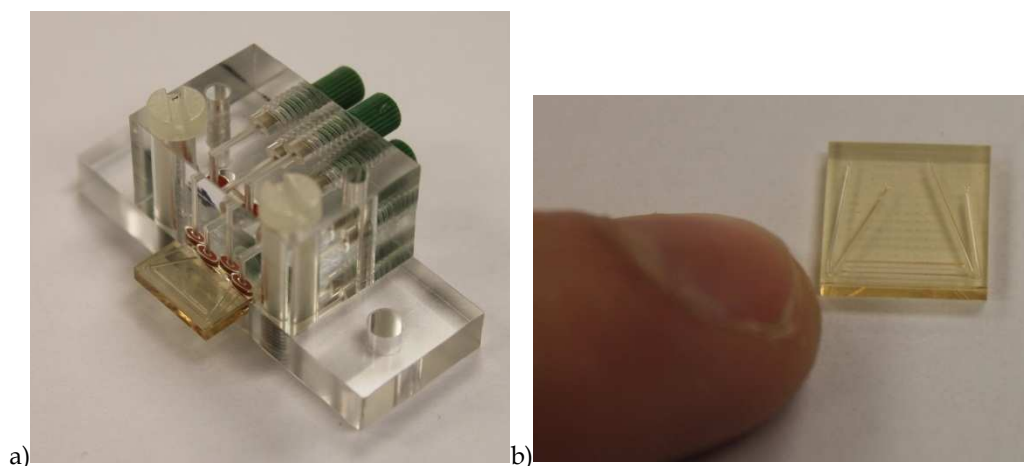


Figura 6.4: Microdispositivo empleado. a) Chip y portachip. b) Chip.

- El piezoeléctrico encargado de generar la actuación ultrasónica, es de material cerámico PZ26. Debido a sus dimensiones, de 2mm x 4mm y 15mm de longitud, su resonancia de excitación se encuentra a diferentes frecuencias. Debido a esto, la ubicación del nodo de presión dentro del canal de separación puede ser controlado. La frecuencia de excitación empleada ha sido entorno a 1023Hz, en donde el nodo de presión se ha ubicado en torno a 266 $\mu$ m del borde del canal; es decir, a  $w/6$  del centro del canal.
- El control de flujo se ha conseguido mediante el dispositivo MFCS-8C-1000mbar (*Microfluidic Control System*) y Flowell-1000 $\mu$ L/min con el software *Maesflow*. Debido al tipo de manipulación de flujo, los perfiles de velocidad, una vez evolucionados completamente, serán parabólicos. Algo a tener en cuenta para estudiar el comportamiento de los flujos, así como de los coloides.
- Para generar la actuación piezoeléctrica, es necesario emplear, tanto un generador de señal para el control del voltaje y frecuencia de excitación, así como un osciloscopio para la visualización del mismo. En este caso, se ha empleado un generador de señal Yokogawa FG 120.
- Para la visualización del efecto de separación en el dispositivo, se emplea un microscopio con unos aumentos de 10x y fotoduplicador. Al mismo tiempo, se han podido filmar diferentes vídeos, mediante una cámara CCD (Charge Coupled Device). También se ha empleado un microscopio de fluorescencia, para mejorar la visualización del movimiento de los coloides.

En la Figura 6.5, se puede ver el procedimiento experimental realizado, donde la Figura 6.5a muestra el MFCS y el Flowell, con las diferentes conexiones fluídicas y eléctricas necesarias. En la Figura 6.5b se puede ver el chip con el piezoeléctrico, conectado al controlador de flujo, así como a los depósitos de salida, donde se recogen las muestras.

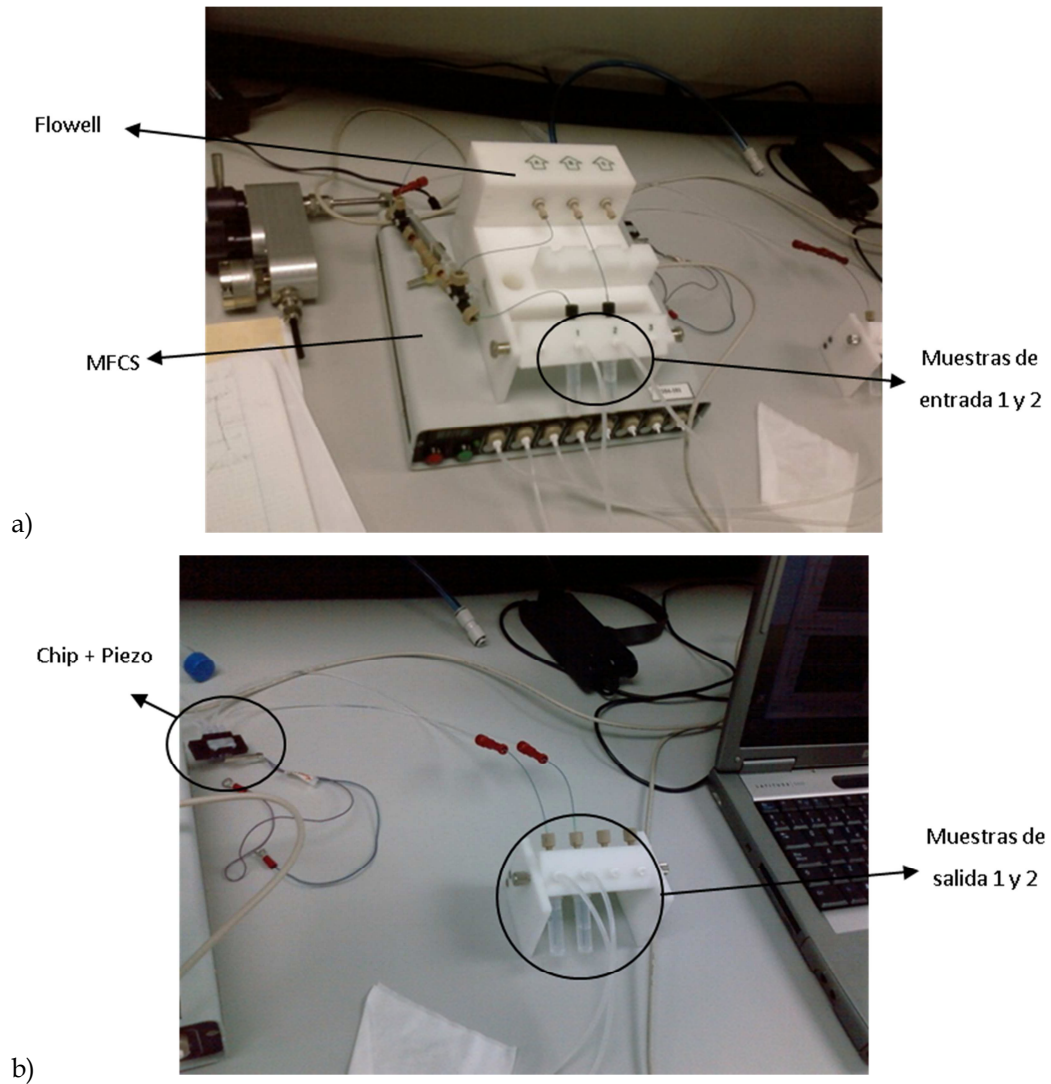


Figura 6.5: Diferentes dispositivos para el procedimiento experimental. a) MFCS y Flowell. b) Chip conectado al piezoeléctrico y al controlador de flujo.

En la Figura 6.6, se representa el esquema de todos estos dispositivos, para realizar el procedimiento experimental. Los pasos a seguir son los siguientes: en primer lugar, se deben llenar los depósitos de las muestras de entrada (Figura 6.5a) representados como 1 y 2 en la Figura 6.6. A continuación, mediante el software del MFCS, se introduce una presión a los depósitos, por lo que la muestra comienza a fluir por el circuito. Cuando el fluido pasa a través de los caudalímetros A y B, se recibe la información del caudal a través del software Maesflow. En caso de querer un mayor caudal, se subiría la diferencia entre las presiones de entrada y de salida; en caso contrario, se reduciría dicha diferencia. Una vez pasados los caudalímetros, las muestras se introducen en el interior del chip por los canales de entrada. Una vez que el fluido atraviesa el chip, se activa el generador de señal, para que el piezoeléctrico actúe sobre la muestra. Mediante el microscopio y la cámara CCD, se observa el

comportamiento de las células por el ordenar. Una vez que las muestras pasan a través del chip, se dirigen a los depósitos de salida (Figura 6.5b). Estas muestras, serán las que a posteriori se analicen para determinar el grado de separación de las muestras. Los dispositivos “upchurch” (Figura 6.6) se emplean para realizar la conexión fluidica entre tubos de diferentes secciones, mientras que el dispositivo “by-pass” (Figura 6.6), se emplea para duplicar el caudal de las muestras si fuese necesario.

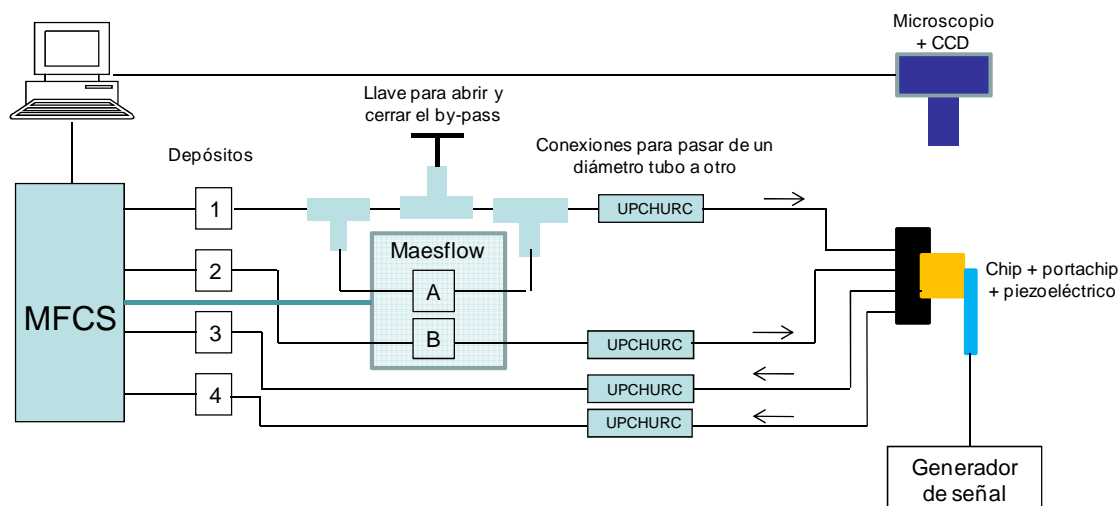
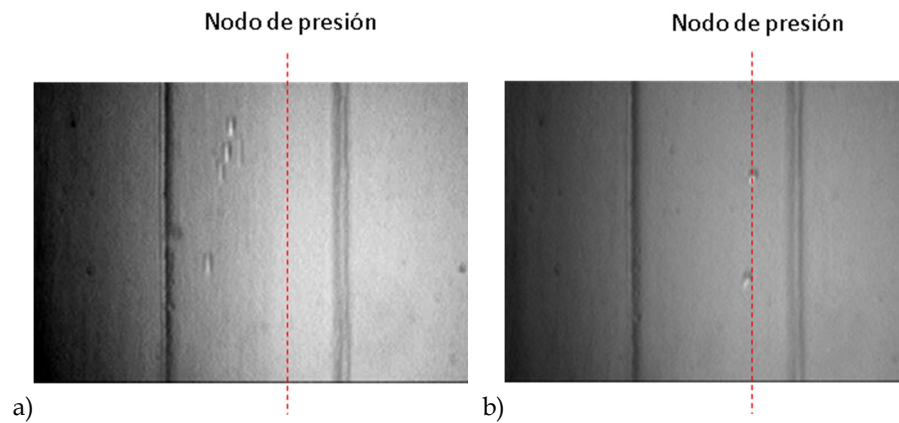


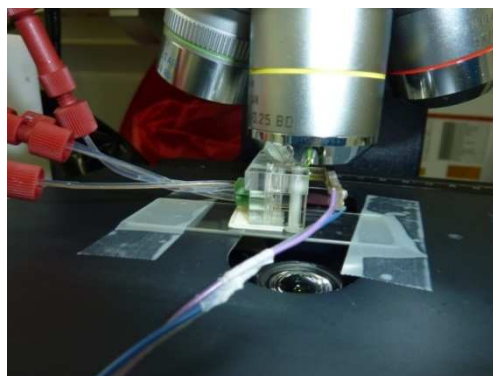
Figura 6.6: Esquema del procedimiento experimental.

El primer estudio experimental para determinar la eficacia del sistema de separación selectiva de partículas por su tamaño, se ha realizado mediante coloides sintéticos de poliestileno de  $6\mu\text{m}$  y  $20\mu\text{m}$  de diámetro. De esta manera, se ha caracterizado el piezoeléctrico, así como los parámetros de control del voltaje, frecuencia y posición del nodo, en los que se obtuvieron unos rangos de valores óptimos. El voltaje, se determinó en torno a 10 voltios; mientras que la frecuencia, entorno a 1023Hz, para este tipo de chip y encapsulado. En la Figura 6.7 se puede apreciar el flujo de las partículas, tanto sin excitación (Figura 6.7a), como con excitación (Figura 6.7b).



**Figura 6.7: Separación selectiva en el microcanal [19]. a) Flujo de partículas sin excitación y b) con excitación.**

Los ensayos experimentales con células, se han realizado con leucocitos (entorno a  $15\mu\text{m}$  de diámetro) y células tumorales colorectales (entorno a  $30\mu\text{m}$  de diámetro). Estos ensayos experimentales mediante este método, han resultado muy complejos, debido a las características viscoelásticas de las células. No obstante, aun así, se ha logrado la separación selectiva mediante la identificación de los parámetros de control; como el voltaje y la frecuencia. La elección de un voltaje adecuado es importante, ya que el límite de empuje entre las células cancerígenas y no cancerígenas es muy estrecho. De hecho, debido al carácter elástico de las células, se ha comprobado que el voltaje adecuado para ser arrastradas hacia el nodo, es de entorno a 15V. Por otra parte, también se ha establecido un caudal máximo de  $50\mu\text{L}/\text{min}$ , ya que a mayores caudales, las células son dañadas. En la Figura 6.8 se aprecia el chip de separación en el porta chip, con el piezoeléctrico pegado en un extremo, en el transcurso de un experimento.



**Figura 6.8: Experimentación mediante el chip de separación.**



El análisis de las muestras extraídas, ha sido realizado por el grupo del Hospital General de Elche. Para ello, se han empleado diferentes marcajes fluorescentes, con el fin de identificar el grado de separación de las células cancerígenas. En concreto, se ha empleado un marcaje DGRAG5 (rosa fluorescente), para el núcleo de todas las células, CK (verde fluorescente), que marca específicamente células CTC y CD45 (naranja fluorescente), que marca específicamente leucocitos. En la Figura 6.9 se aprecia uno de esos análisis, donde se ve a la izquierda, el recuento de las CTCs y a la derecha, el de leucocitos.

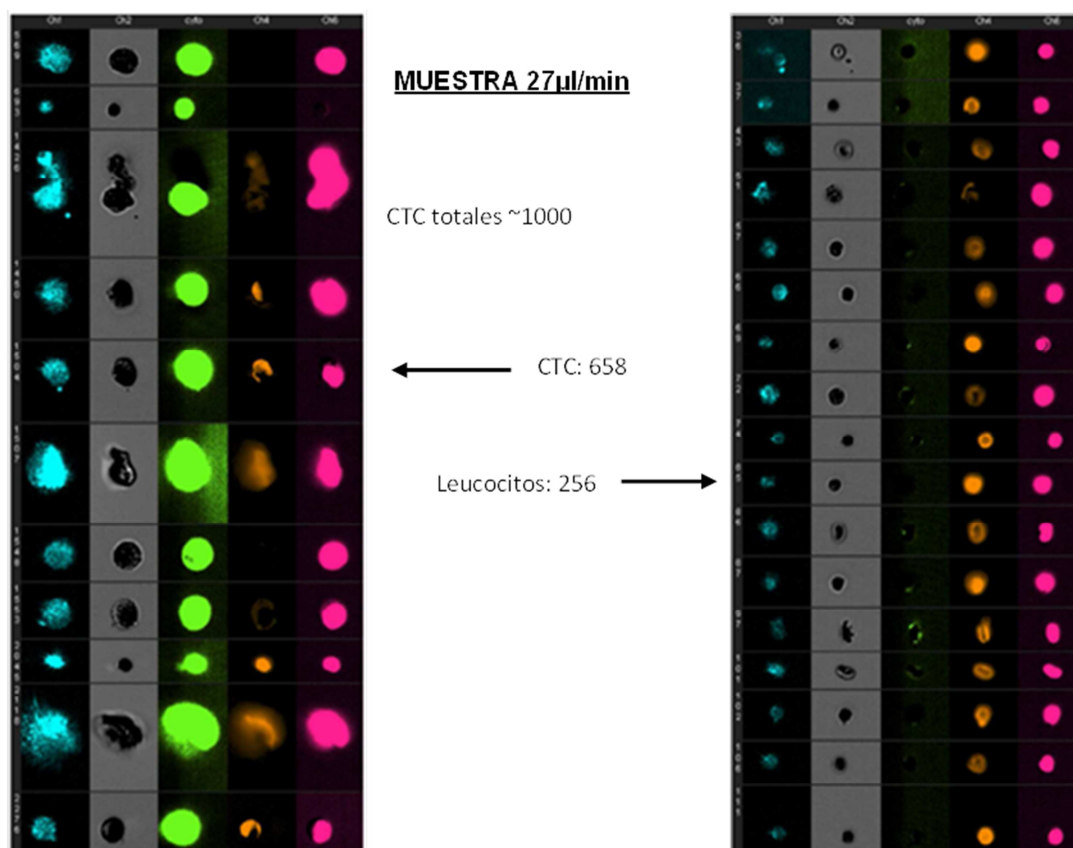


Figura 6.9: Representación de un análisis de la separación de muestras.

En los ensayos con células, hasta la fecha, se ha logrado una eficacia de separación del 70%. Algo no asequible para la aplicación de este método en la detección precoz, monitorización de la enfermedad y pronóstico. Por lo tanto, se debe trabajar para obtener una separación superior al 95%. Para llegar a este punto de satisfacción, se ha visto la necesidad de realizar estudios numéricos de la hidrodinámica del dispositivo, así como de las fuerzas hidrodinámicas sobre las muestras celulares; con el fin de optimizar el dispositivo de separación en cuanto a su diseño y a su vez, determinar las condiciones óptimas de trabajo. Para conseguir este objetivo, se han determinado las diferentes propiedades termofísicas de los fluidos biológicos relacionados con este estudio.



### 6.3.- Propiedades termofísicas de muestras biológicas celulares.

Los experimentos de separación selectiva, se están llevando a cabo con una población celular de leucocitos y CTCs, diluida en una mezcla de PBS 1x en una concentración de CTCs respecto a leucocitos de entorno al 10%. Por ello, se han determinado la densidad, viscosidad dinámica y el coeficiente de expansión térmica y másica para la mezcla PBS-H<sub>2</sub>O, para una fracción másica de PBS del 10% (PBS 1x), ya que éste será el fluido portador en el microdispositivo (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1: Propiedades termofísicas y de transporte de la mezcla PBS-H<sub>2</sub>O a una fracción masica de PBS del 10% a T=25°C.**

PBS	$\rho(\text{kg}/\text{m}^3)$	$\mu(\text{mPa}\cdot\text{s})$	$\beta(10^{-1})$	$\alpha(\text{K}^{-1})(10^{-3})$
10%	1003,98	0,9205	0,706	2,699

Las propiedades de las poblaciones celulares, tal y como el diámetro y la densidad, se han tomado de la bibliografía. En la Tabla 6.2 se resumen los datos característicos más relevantes de las poblaciones celulares empleadas.

**Tabla 6.2: Diámetro y densidad de los leucocitos y las CTCs**

Células	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	$\rho(\text{kg}/\text{m}^3)$
Leucocitos	5-20 [30]	1062-1082 [30]
CTCs	>30 [31]	1025-1056 [31-33]

### 6.4.- Estudio numérico

#### 6.4.1.-Análisis hidrodinámico de la geometría

Este análisis numérico se ha centrado en el estudio hidrodinámico del dispositivo, por lo que no se han tenido en cuenta las excitaciones ultrasónicas. Se ha analizado la interface entre flujos, distribución de presión, y los perfiles de velocidad. En la fase experimental, se ha comprobado lo importante que resulta controlar la interface entre los dos fluidos, ya que la difusión de las células a través del canal, es perjudicial para la separación selectiva. Además, en la entrada al canal, algunas células tienden a invadir el flujo contiguo, violando el flujo laminar en el que supuestamente se rigen. De la misma manera, a la salida del canal de separación, células que se dirigen claramente hacia una de las salidas, cambian su rumbo drásticamente, saliendo por la salida opuesta. Estos efectos, bajan

considerablemente la eficacia de la separación, por lo que hay que subsanarlos. Para el estudio numérico, se han empleado las propiedades termofísicas y de transporte determinadas experimentalmente representadas en la Tabla 6.1. Hay que señalar que para estos estudios numéricos, no se han empleado multifases; es decir, no se han modelizado las células. Se han utilizado las propiedades de las muestras, como si se tratara de un fluido como una primera aproximación. Las condiciones de trabajo analizadas están representadas en la Tabla 6.3:

**Tabla 6.3: Diferentes condiciones de trabajo analizadas en el estudio numérico. Para todos los casos, la condición de presión de la salida 1 es de  $P_{sal1} = 1 \text{ atm}$ .**

Casos de simulación nº	Modelo	Flujo volumétrico		Condición de salida 2 $P_{sal2}$ (atm)
		Entrada 1 $Q$ ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Entrada 2 $Q$ ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	
1	2-D	20	20	1
2	2-D	20	20	1,00005
3	2-D	10	10	1
4	2-D	10	10	1,00005
5	2-D	20	10	1
6	2-D	20	10	1,00005
7	2-D	10	20	1
8	2-D	10	20	1,00005
9	3-D	20	20	1
10	3-D	20	20	1,00005

Mediante estas condiciones de trabajo, se ha analizado la influencia de la velocidad de los flujos en la interface; tanto en la entrada como en la salida del canal de separación. De la misma manera, se ha estudiado la influencia de las diferencias de presiones en los canales de salida, que pueden darse por posibles obstrucciones. El estudio se ha centrado en las bifurcaciones de entrada y salida del canal de separación, debido a que éstas son las zonas más críticas para la separación selectiva.

### ***Entrada al canal de separación***

El primero de los estudios, se ha centrado en conocer la distribución de velocidades a lo largo del canal. Se ha comprobado numéricamente, que las velocidades se homogeneizan parabólicamente en una distancia inferior a las  $500\mu\text{m}$ , independientemente de las condiciones de entrada, tal y como se puede apreciar en la Figura 6.10. En dicha figura, está representado el canal de separación del dispositivo con un corte longitudinal (Figura 6.10a y b), y dividido en secciones transversales (Figura 6.10a). Se representa la velocidad en diferentes colores, donde el azul, es la menor velocidad y el rojo, la mayor. Debido al “*non slip boundary condition*” la velocidad es  $0 \text{ m/s}$  en las paredes.

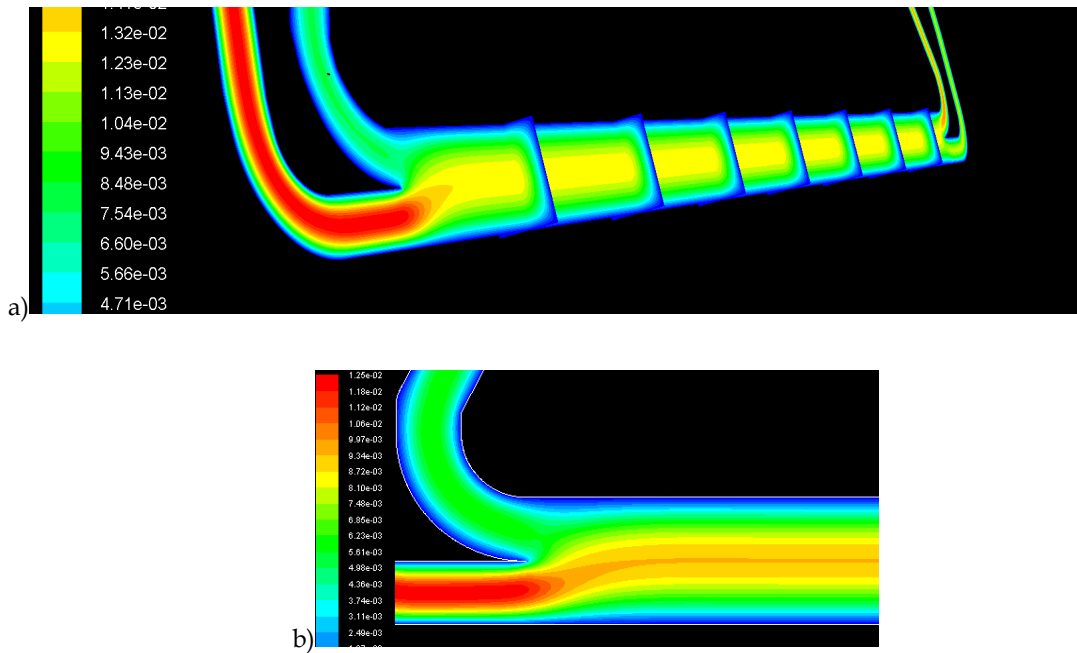


Figura 6.10: Representación de la distribución de velocidad. a) A lo largo de todo el canal con cortes transversales y b) a la entrada del canal de separación.

Analizando los resultados en la entrada al canal de separación, se ha identificado una depresión en la unión de los canales de entrada, originada por la misma geometría. Esta depresión podría generar una succión de las partículas más cercanas a la unión, desviándolas considerablemente de su trayectoria inicial. Este fenómeno afecta negativamente en la separación selectiva, ya que ambas células, tumorales y no tumorales, afectadas por la depresión, salen de su flujo invadiendo el flujo del fluido colector y por lo tanto, imposibilitando la separación selectiva. En la Figura 6.11 puede observarse dicha depresión (Figura 6.11a), así como los vectores de velocidad en dicha zona (Figura 6.11b).

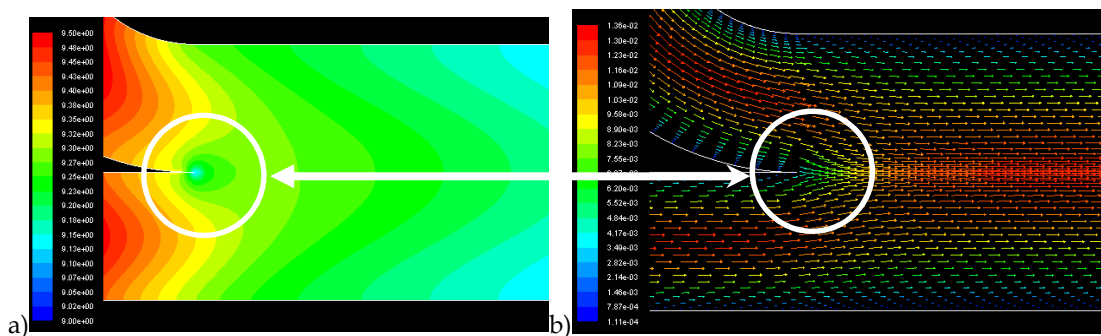
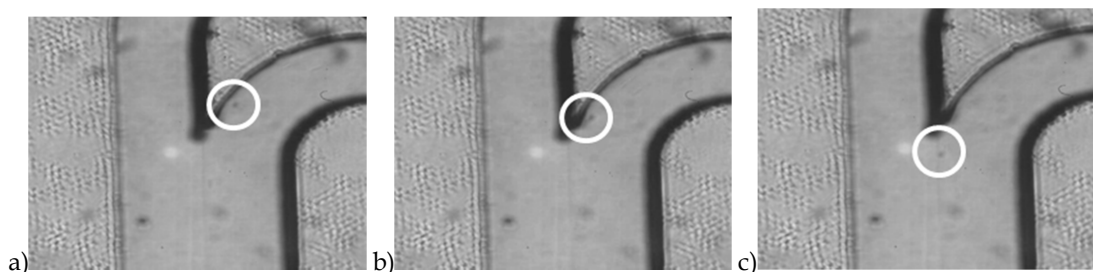


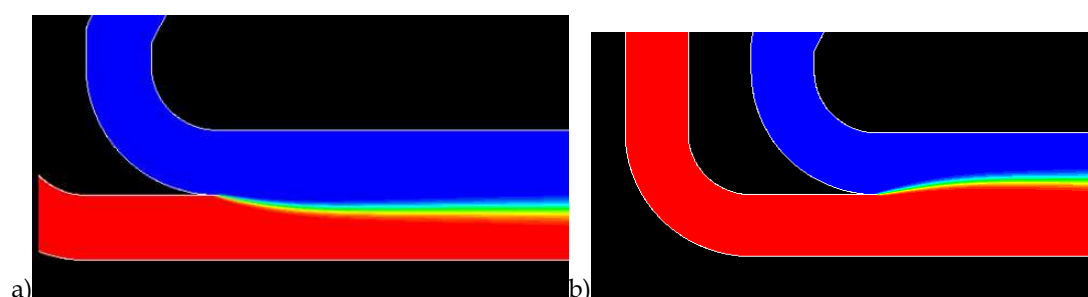
Figura 6.11: Análisis de flujo en la entrada. a) Depresión generada. b) Vectores de velocidad.

Este desvío se ha confirmado experimentalmente, en donde se ha visto que las células cercanas a este punto de depresión, no siguen su trayectoria laminar natural, tal y como se puede apreciar en las fotos mostradas en la Figura 6.12.



**Figura 6.12: Trayectoria de una partícula bajo la influencia de la depresión en la entrada.**

Por otra parte, también se ha analizado la influencia del caudal de flujo en la interfase. Como era de esperar, la interface se desvía en función de dónde esté el caudal más elevado. Así, tal y como se puede observar en la Figura 6.13, el flujo con mayor caudal, empuja la interface hacia el otro flujo, desviando la interface del centro del canal de separación. En la Figura 6.13a, se representa en rojo el flujo cargado de células con un caudal de  $10\mu\text{L}/\text{min}$ , y en azul, el líquido colector, PBS 1x con un caudal de  $20\mu\text{L}/\text{min}$ . En la Figura 6.13b, se representa lo mismo, pero con los caudales invertidos. Tal y como se puede observar, para esta configuración de entrada, es realmente aconsejable emplear mayores caudales para el flujo del fluido recolector (PBS 1x) (el caso de la Figura 6.13a), con el fin de asegurarse de que las células no atraviesen la mitad del canal sin ser separadas selectivamente, bajo el nodo de presión generado por las fuerzas ultrasónicas.



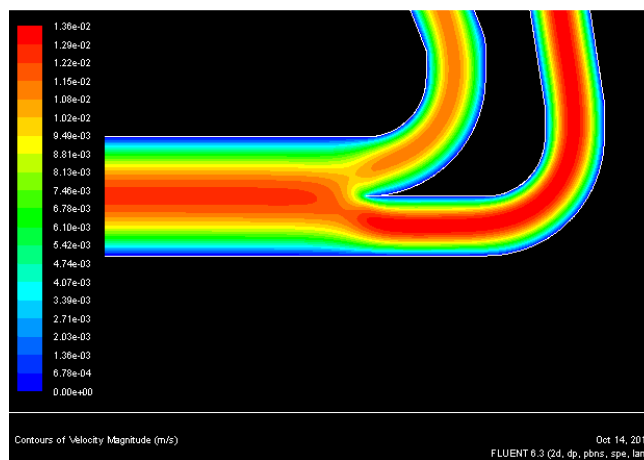
**Figura 6.13: Interface en el canal central. a) Mayor caudal en el canal superior de entrada. b) Mayor caudal en el canal inferior de entrada.**

Por lo tanto, del estudio de la entrada del canal de separación, se concluye que la unión entre los canales de entrada no es la idónea, ya que genera perturbaciones que pueden influir en la eficiencia del dispositivo.

### *Salida del canal de separación*

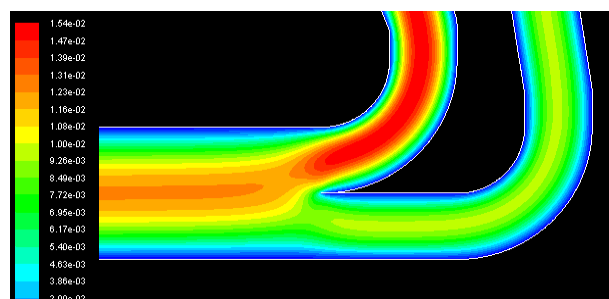
Otra de las claves de la eficacia del dispositivo de separación, es la bifurcación de los conductos de salida, por donde deben salir por una parte, las CTCs con el PBS 1x y por otra, todas las demás células.

En este caso, también se ha estudiado la distribución de velocidades en la salida del dispositivo. Gracias a este estudio, se ha identificado una significativa diferencia de velocidades entre los dos conductos de salida, aun utilizando las mismas condiciones de trabajo. Esta variación de la velocidad, que llega a ser de hasta un 20%, es debida a la geometría de los dos canales de salida, ya que no son geoméricamente idénticos. En la Figura 6.14 se puede apreciar dicha diferencia de velocidades.



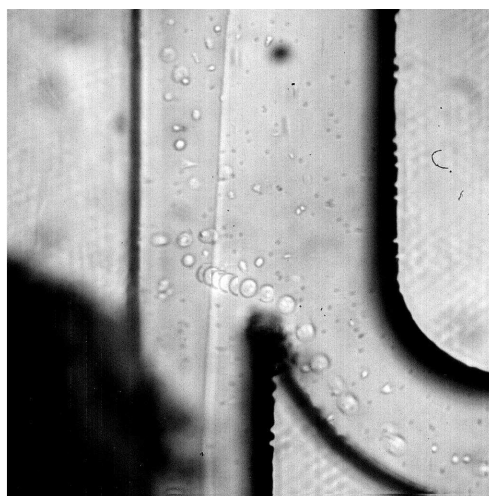
**Figura 6.14: Distribución de velocidades a la salida del canal de separación.**

Tal y como se ha comentado anteriormente, se ha analizado también la influencia de las presiones de salida. Tan solo aplicando una diferencia de presiones de 0,00005 atm, se observa una gran variación en la distribución de velocidad; tal y como se puede apreciar en Figura 6.15, donde al canal inferior se le ha aplicado una mayor presión (1,00005 atm).



**Figura 6.15: Distribución de velocidades con diferentes presiones de salida.**

Esta variación de velocidades, puede ocasionar la succión de las células en la dirección no deseada, como se puede ver en la foto presentada en la Figura 6.16.

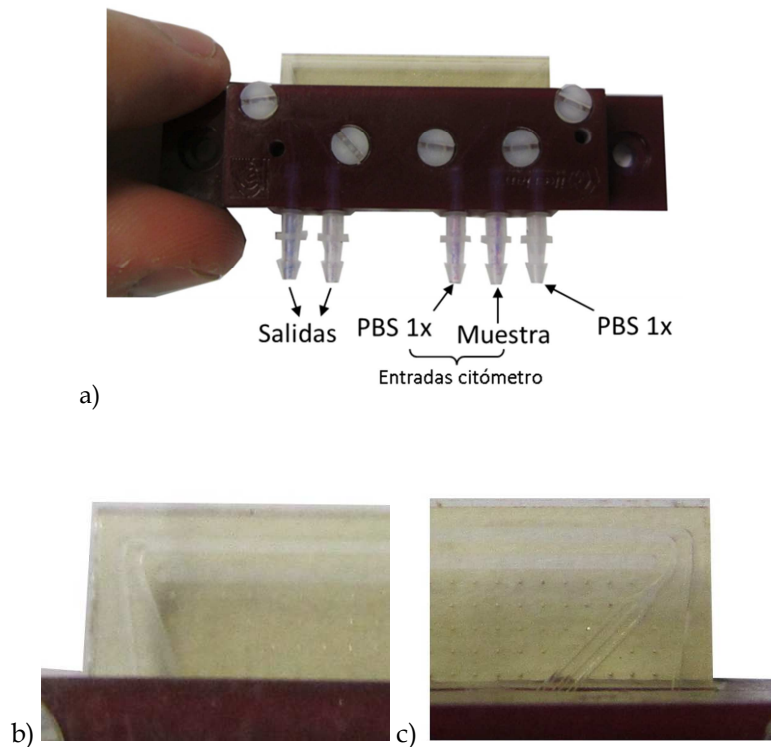


**Figura 6.16:** Trayectoria de una partícula bajo la influencia de la diferencia de velocidad en la salida.

Del estudio hidrodinámico de este primer prototipo, se obtienen dos conclusiones. Por un lado, para mejorar la eficiencia del dispositivo de separación, es de gran importancia evitar las mínimas alteraciones en la presión de salida. Por otro lado, del estudio de la entrada del canal de separación, se concluye que la unión entre los canales de entrada no es la idónea, ya que genera perturbaciones que pueden influir en la eficiencia del dispositivo. Por ello, se va a introducir una mejora geométrica, empleando un citómetro de entrada. Este citómetro se basa en dos canales de entrada laterales por donde fluye el fluido colector (PBS 1x) y otro canal de entrada central, por donde fluye la muestra de interés (Figura 6.17a y c). Al unirse los tres canales, se canaliza la muestra de interés en el centro del canal. Así, se evitará el efecto de las paredes sobre las células, disminuyendo su atracción y adhesión. Además, el citómetro, por donde se introducirá la muestra con las partículas, se ha colocado en la entrada superior. De esta manera, y tal y como se ha comprobado en el capítulo 5, se puede combinar el efecto termodifusivo con el acústico, con el fin de optimizar el proceso de separación. La cerámica piezoeléctrica, es una fuente de calor importante, por lo que las células que no se vean influenciadas por el efecto ultrasónico, tenderán a dirigirse hacia la pared más lejana del foco de calor. Así, tendrán menos posibilidades de colonizar el flujo colector, que está más cercano a la cerámica piezoeléctrica.

## **6.5.- Nuevo chip con geometría optimizada**

Una vez analizado el efecto de la geometría, se ha propuesto un nuevo diseño para la entrada, empleando un citómetro y al mismo tiempo, se ha modificado la longitud del canal central (desde los 8mm hasta los 30mm) para que la distancia de actuación de las fuerzas ultrasónicas sea mayor. El chip se muestra en la Figura 6.17.



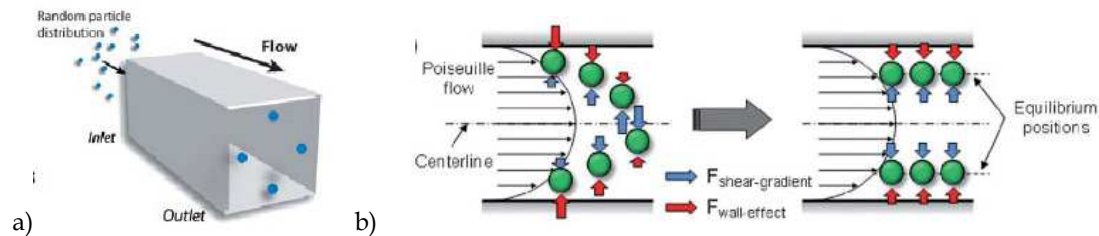
**Figura 6.17: Nuevo chip con geometría optimizada. a) Chip completo, b) detalle de la salida y c) de la entrada.**

Mediante este chip, se ha realizado un estudio sobre las fuerzas hidrodinámicas que actúan sobre las muestras celulares. Este estudio permitirá controlar las condiciones de entrada de tal manera que se optimice el proceso de separación selectiva. Para ello, se ha realizado un estudio numérico - experimental, para el cual, se ha tenido que realizar un modelo numérico más exigente, contemplando el carácter multifásico de las muestras celulares. A su vez, se ha analizado el efecto de las fuerzas inerciales sobre las muestras celulares.

### 6.5.1.- Estudio inercial de las muestras

El flujo en los microdispositivos fluidicos es típicamente laminar y rige bajo las condiciones del número de Reynolds, el cual proporciona la relación entre la inercia y las fuerzas viscosas. Por esto, las fuerzas inerciales son habitualmente despreciables. Esto prevé que las células permanezcan en una línea de corriente, a no ser que sean desviadas por alguna excitación externa. Esta percepción no es del todo correcta, debido a que se han observado comportamientos no intuitivos en células bajo este régimen. En concreto, se han presentado varios dispositivos de separación continua basados en la migración inercial [25]. Las partículas bajo estas fuerzas se posicionan en zonas de equilibrio (Figura 6.18a) [34]. Debido al flujo parabólico, la asimetría del gradiente de velocidades entre la parte superior

e inferior de las partículas, las empuja fuera de la zona central (Figura 6.18b). Por otro lado, las líneas de flujo alrededor de las partículas, se alteran cuando están cerca de la pared. Esta asimetría, genera una mayor presión en la pared empujando las partículas fuera de éstas (Figura 6.18b). Así, las partículas llegan a una zona de equilibrio (Figura 6.18).



**Figura 6.18: Redistribución de partículas. a) Posiciones de equilibrio. b) Fuerzas responsables de las posiciones de equilibrio.**

Para conocer si las partículas dentro de un flujo se redistribuyen en las zonas de equilibrio, se puede emplear el número adimensional de Reynolds ( $Re$ ) para las partículas  $Re_p$ .

$$Re_p = Re \left( \frac{d_p^2}{D_h^2} \right) \quad (6.3)$$

Donde  $Re = (D_h \cdot U \cdot \rho) / \mu$ ,  $d_p$  es el diámetro de las partículas y  $D_h$  es el diámetro hidráulico que se representa como  $D_h = 4 \cdot \text{area}_{transversal} / \text{perímetro}$ . Si  $Re_p \ll 1$  las fuerzas viscosas son las dominantes, por lo que las partículas no se redistribuyen. Mientras que, para valores mayores a la unidad, las partículas se redistribuyen, haciéndolo con mayor rapidez a mayores valores de  $Re_p$ .

En canales curvos, también se ha demostrado que la fuerza centrífuga a microescala, juega un papel importante en la redistribución de partículas. Esta fuerza, generada en canales curvos, forma un flujo laminar secundario denominado "Dean Flow" [16] (Figura 6.19a). Ya que las partículas de diferente densidad y/ o tamaño no se ven afectadas de la misma manera, tienden a posiciones en equilibrios diferentes (Figura 6.19a). Así, estas pueden ser separadas de manera selectiva (Figura 6.19b).



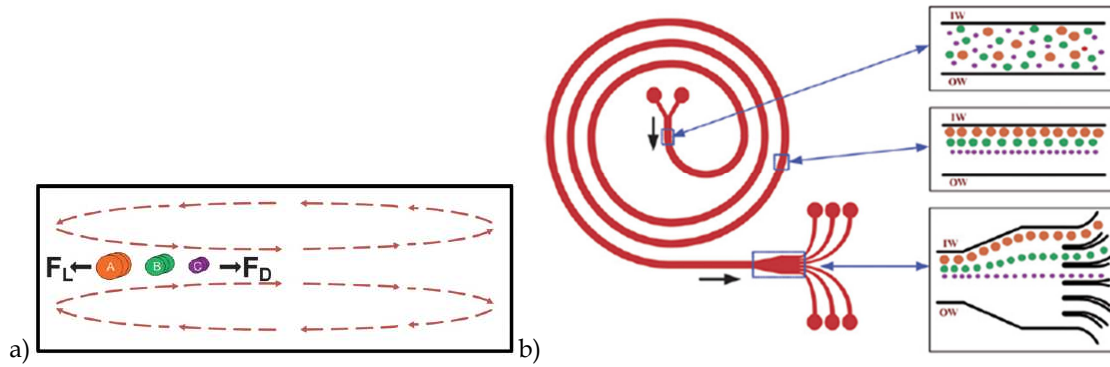


Figura 6.19: Extracción selectiva de células mediante fuerzas inerciales [16]. a) *Dean Flow* y b) Dispositivo empleado para la extracción de partículas en función de su tamaño.

Para conocer si las partículas dentro de un canal curvo, se ven influenciadas por este flujo laminar secundario, se define otro número adimensional  $R_f$ .

$$R_f = \left( \frac{d_p^2 \cdot R}{D_h^3} \right) \quad (6.4)$$

Donde  $R$  es el radio de curvatura. Para  $R_f \ll 1$  las partículas están totalmente afectadas por los flujos secundarios, mientras que si  $R_f \gg 1$ , las partículas no se ven afectadas.

### *Análisis del efecto de las fuerzas inerciales sobre el nuevo chip*

En este estudio, se ha empleado como flujo portador PBS 1x ( $\rho=1003,98 \text{ Kg/m}^3$ ), y como fase discreta, partículas de poliestireno de  $6\mu\text{m}$  y  $20\mu\text{m}$  ( $\rho=1050 \text{ Kg/m}^3$ ). Como se puede apreciar en el esquema del chip representado en la Figura 6.20, éste alberga tres entradas, CH1, CH2 y CH3. Por la entrada CH1, se introduce PBS 1x (Figura 6.17a) para generar el flujo adyacente colector de las CTCs. Desde CH2 también se introduce PBS 1x (Figura 6.17a) para formar los dos flujos externos del citómetro, mientras que desde CH3 se introduce la muestra celular (Figura 6.17a). En los experimentos con el campo acústico aplicado, de CH4 se extrae la muestra celular de CTCs y desde CH5 se extrae el resto del flujo.

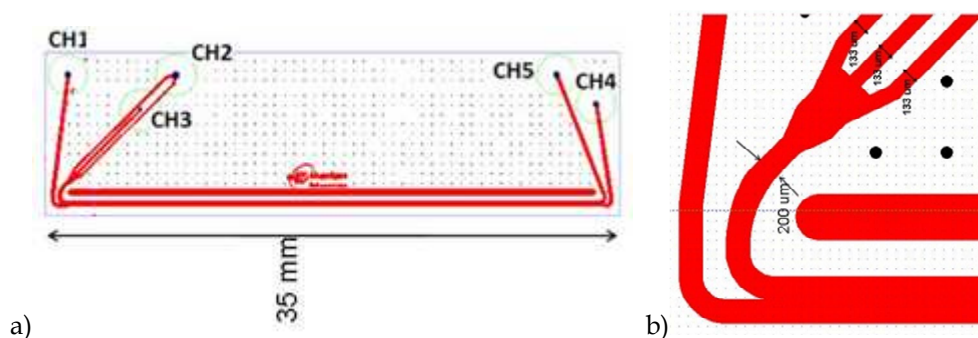


Figura 6.20: Esquema del nuevo chip. a) Esquema completo, b) detalle de la entrada del chip.

Debido al control de flujo basado en bombas de jeringuilla empleado por uno de los grupos involucrados en este trabajo, se han establecido unas mismas condiciones del proceso para que todo el análisis experimental y numérico esté en concordancia y sea comparable entre los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios. Por las limitaciones del controlador de flujo, estos deben emplear una jeringuilla de 1ml para la muestra celular y una única jeringuilla de 5ml de PBS 1x para las entradas CH1 y CH2. Para que la visualización experimental haya podido ser realizada, los flujos empleados para las muestras de células no pueden ser superiores a  $33 \mu\text{L}/\text{min}$ . Teniendo en cuenta que las dimensiones de los canales del citómetro ( $133\mu\text{m}$ ) y de las entradas generales ( $200\mu\text{m}$ ) (Figura 6.20b) son diferentes, el flujo de PBS 1x, ha sido dividido en función de la sección. Así, se han determinado tres casos diferentes para su análisis. En la Tabla 6.4 se muestran las condiciones de caudal de las tres entradas para los tres casos propuestos.

Tabla 6.4: Tres casos analizados numérica y experimentalmente para las entradas del chip.

Casos	CH3 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	CH2 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	CH1 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )
1	5	14,25	10,75
2	11	31,35	23,65
3	33	94,05	70,95

Teniendo en cuenta las condiciones de trabajo que se van a emplear, se han determinado mediante las ecuaciones (6.3) y (6.4) los efectos de las fuerzas inerciales para los dos tipos de partícula que se van a emplear en el estudio numérico y experimental. En la Tabla 6.5 se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla 6.5: Resultado de los números adimensionales  $Re$ ,  $Re_p$  y  $R_f$  para los tres casos analizados con dos dimensiones de partícula, empleando como líquido portador PBS 1x.**

Diámetro partícula ( $\mu\text{m}$ )	Caudal de entrada (CH3) ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	$Re$ (Canal de entrada)	$Re$ (Canal central)	$Re_p$ (Canal de entrada)	$Re_p$ (Canal central)	$R_f$
6	5	0,48	1,712	0,0006	0,0007	0,0014
20	5	0,48	1,712	0,0064	0,0072	0,0153
6	11	1,06	3,425	0,0013	0,0013	0,0014
20	11	1,06	3,425	0,0141	0,0145	0,0153
6	33	3,19	11,3	0,0038	0,0043	0,0014
20	33	3,19	11,3	0,0424	0,0478	0,0153

De los datos obtenidos en la Tabla 6.5 se concluye que para los casos analizados surgirá una redistribución de las partículas en el canal central. No obstante, esta redistribución no será muy notoria ya que los valores de  $Re$  no son muy elevados. Además, en el canal de entrada, debido a la curvatura de  $200\mu\text{m}$  que tiene, las partículas se verán influenciadas por las fuerzas inerciales. En este caso, la redistribución debería ser evidente ya que los valores de  $R_f$  son claramente inferiores a la unidad.

Teniendo esto en cuenta, se ha realizado un estudio numérico y experimental, basándose en la geometría optimizada, de la redistribución de las partículas por fuerzas inerciales. Mediante este estudio, se pretende comprobar y analizar su comportamiento a diferentes caudales, para así poder optimizar las condiciones de entrada.

### **6.5.2.-Estudio numérico - experimental de las fuerzas hidrodinámicas con la geometría optimizada del microdispositivo**

Las características generales del modelo numérico empleado han sido las mismas que en los apartados 4.6 y 5.1. No obstante, en este caso, en lugar de utilizar un modelo basado en “*Species Transport*”, se ha empleado un modelo Euleriano - Euleriano de flujo multifásico granular. Mediante este modelo se introducen las interacciones partícula - partícula como partícula - líquido, proporcionando la concentración de partículas en cada celda del modelo computacional. Se ha considerado que las partículas son esferas rígidas con una distribución de tamaño homogéneo. Para todos los casos se ha establecido una concentración inicial de partículas del 10% y en ambas salidas se ha impuesto como condición de salida la presión atmosférica. En la Figura 6.21 se representa el modelo final empleado.

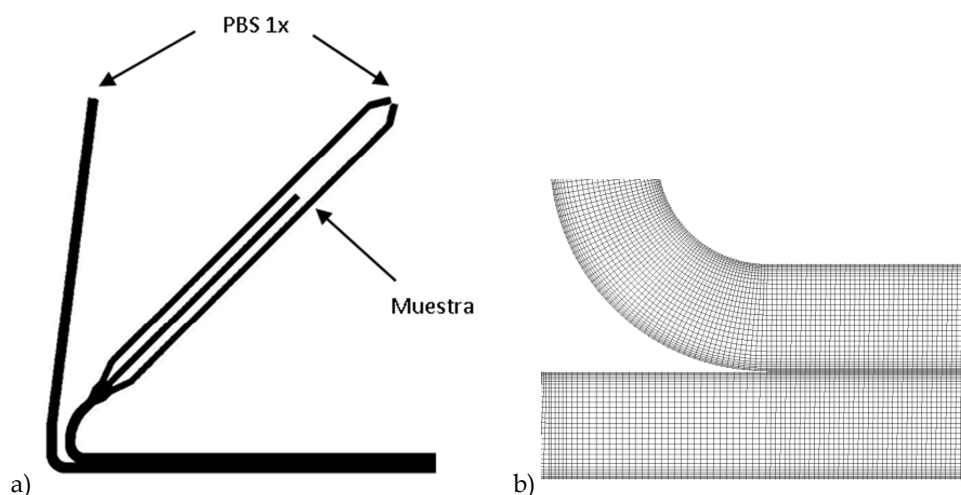


Figura 6.21: Modelo del segundo prototipo del chip, a) geometría de las entradas del citómetro, b) detalle de la malla empleada.

Para realizar el estudio experimental y poder comparar estos resultados con los numéricos, se ha utilizado un microscopio óptico invertido LEICA DM IRM con cámara CCD, para poder fotografiar los diferentes escenarios. En la manipulación de los flujos se ha empleado el controlador de presión (MFCS 1000mBar) y un controlador de flujo (Flowell 1000 $\mu$ L/min) con tres flujómetros. En la Figura 6.22 se representa el esquema del procedimiento experimental utilizado.

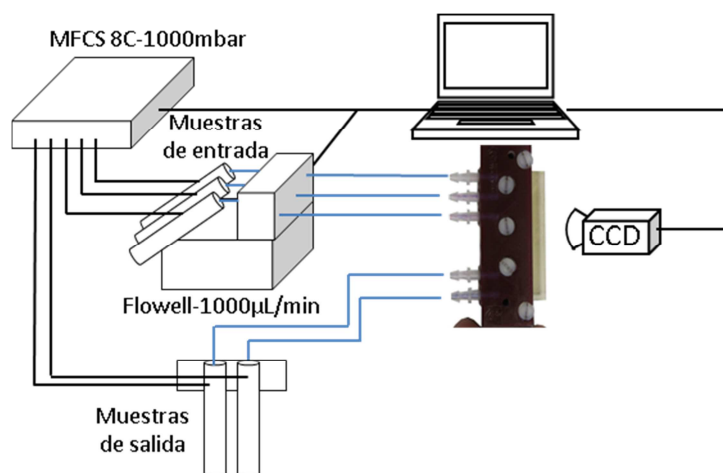


Figura 6.22: Esquema del procedimiento experimental

En la Figura 6.23 se muestra el sistema experimental empleado.

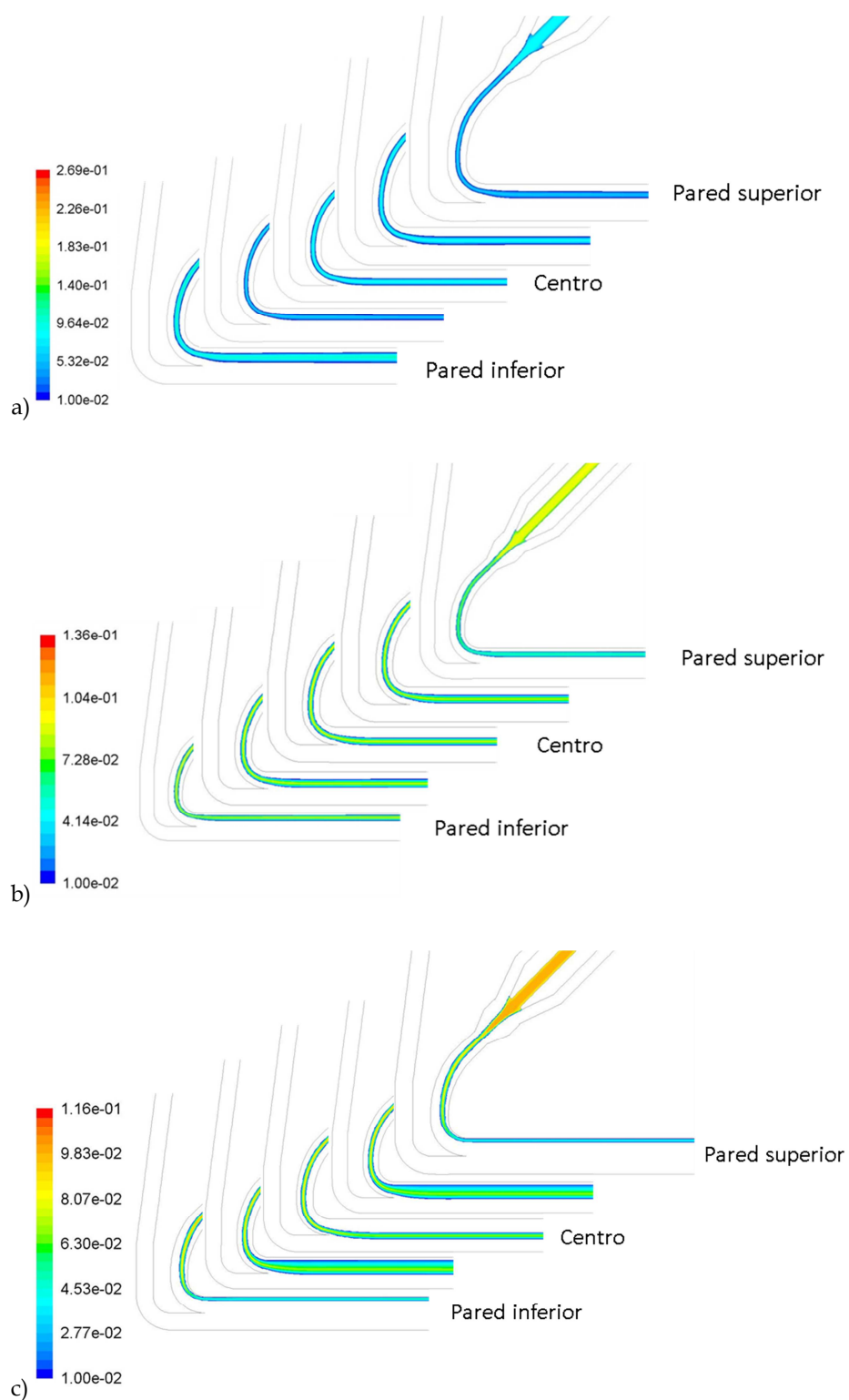


Figura 6.23: Análisis del nuevo chip junto con los dispositivos experimentales.

Las diferentes condiciones de entrada estudiadas son aquellas representadas en la Tabla 6.4 tanto para partículas de  $6\ \mu\text{m}$  como de  $20\ \mu\text{m}$ . Para analizar el comportamiento de las partículas en función de las condiciones de entrada, se ha analizado la distribución de las partículas en el inicio y al final del canal central. Así, se podrá conocer la distribución de las partículas originada tanto en el canal curvo como en el recto.

### *Partículas de 6 micras*

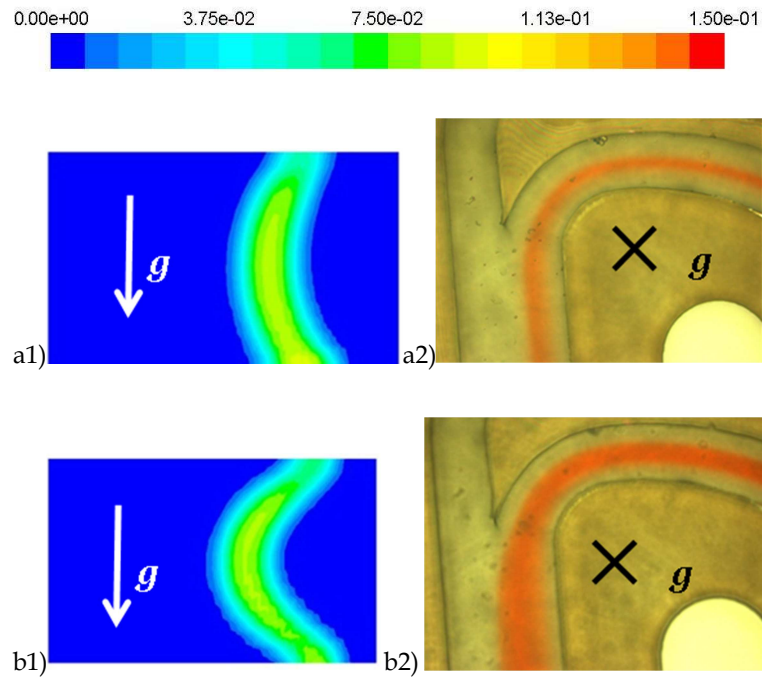
Para examinar el comportamiento en las simulaciones numéricas de estas partículas, se han realizado cortes longitudinales y transversales, para así extraer la concentración en los puntos de interés. En la Figura 6.24, se muestran cortes longitudinales a diferentes alturas, entre la pared superior e inferior de la zona inicial, donde se representa la concentración de partículas de 6 micras para los tres casos analizados,  $Q_{\text{CH}_3} = 5\ \mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 6.24a),  $Q_{\text{CH}_3} = 11\ \mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 6.24b),  $Q_{\text{CH}_3} = 33\ \mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 6.24c).



**Figura 6.24:** Concentración de partículas de 6 micras a diferentes profundidades en la zona inicial del chip. a)  $Q_{CH_3} = 5 \mu\text{L}/\text{min}$ , b)  $Q_{CH_3} = 11 \mu\text{L}/\text{min}$  y c)  $Q_{CH_3} = 33 \mu\text{L}/\text{min}$ .

Como se puede observar, la distribución de las partículas no es homogénea en función de la profundidad del chip, debido a la redistribución surgida en el canal curvo. Además, se verifica que a

mayor caudal la redistribución se intensifica, ya que las fuerzas inerciales actúan en mayor medida sobre las partículas. Para conocer con mayor detalle la distribución de las partículas se ha realizado un corte transversal en el inicio del canal central una vez pasada la bifurcación. Estos resultados se comparan en la Figura 6.25 con los obtenidos en los ensayos experimentales, donde 1) son los resultados numéricos, 2) los experimentales con partículas de 6 micras tintadas de rojo en un fluido portador (PBS 1x), para los tres casos a)  $Q_{CH3} = 5 \mu\text{L}/\text{min}$ , b)  $Q_{CH3} = 11 \mu\text{L}/\text{min}$  y c)  $Q_{CH3} = 33 \mu\text{L}/\text{min}$ . Debido a las características de la cámara CCD empleada, la visualización de las partículas ha sido más complicada según se ha aumentado el caudal de entrada, ya que las partículas circulan a velocidades demasiado elevadas. Además, el análisis de la concentración en función de la altura no ha podido realizarse debido a la complicación técnica relacionada con la focalización del proceso en movimiento, por lo que para todos los casos la captura de imagen se ha focalizado en el fondo del canal. Esto quiere decir, que se ha obtenido la información de la concentración de la totalidad de la altura del canal.



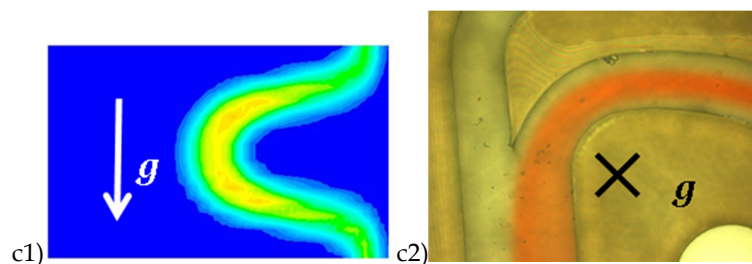
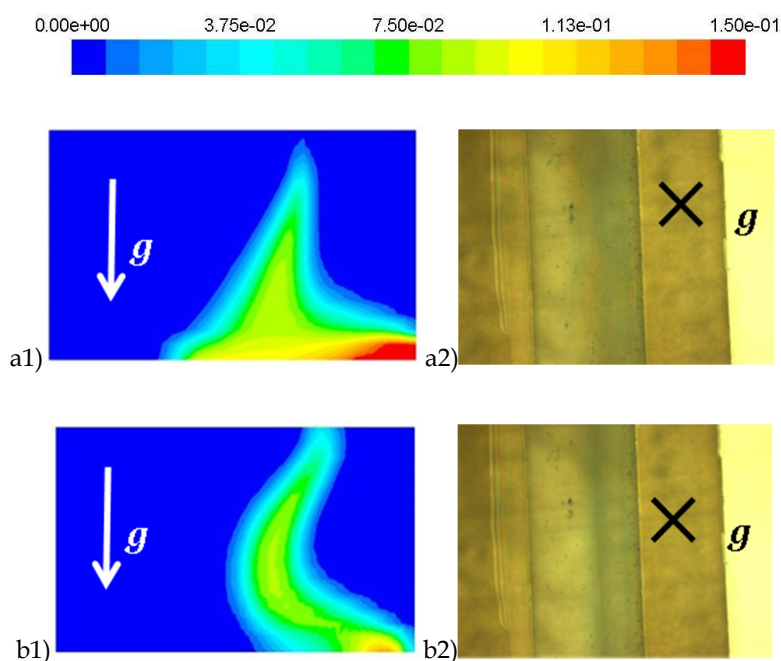


Figura 6.25: Comparativa de los resultados numéricos y experimentales de la distribución de las partículas. Donde a)  $Q_{CH_3} = 5 \mu\text{l}/\text{min}$ , b)  $Q_{CH_3} = 11 \mu\text{l}/\text{min}$  y c)  $Q_{CH_3} = 33 \mu\text{l}/\text{min}$  y 1) simulación con partículas de  $6 \mu\text{m}$ , y 2) experimental con partículas de  $6 \mu\text{m}$  teñidas de rojo con fluido portado.

Como se puede observar, tanto numérica como experimentalmente, las partículas no siguen las líneas de flujo, debido a las fuerzas inerciales. La distribución de las partículas se distancia más de la zona de trabajo cuanto mayor es el flujo, llegando a estar en contacto con la pared interior y llegando hasta la mitad del canal (Figura 6.25c2). Estos resultados, demuestran que las fuerzas inerciales deben tenerse en cuenta, ya que la acción positiva del citómetro, se ve anulada por este efecto. Estos resultados, muestran que para este caso, el caudal de entrada de las células debe ser inferior a  $33 \mu\text{l}/\text{min}$ , para que la redistribución de las partículas no sea tan acusado y además para minimizar los efectos de pared.

En la Figura 6.26 se muestran los resultados numéricos y experimentales de la distribución de partículas en el final del canal central, para los tres casos analizados.





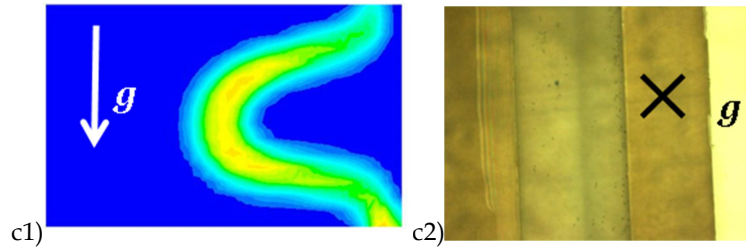


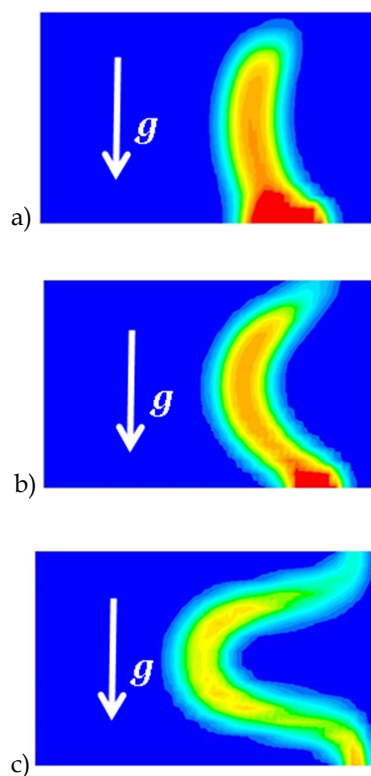
Figura 6.26: Comparación de los resultados numéricos y experimentales de la distribución de las partículas al final del canal central. Donde a)  $Q_{CH_3} = 5 \mu\text{L}/\text{min}$ , b)  $Q_{CH_3} = 11 \mu\text{L}/\text{min}$  y c)  $Q_{CH_3} = 33 \mu\text{L}/\text{min}$  y 1) son los resultados de las simulaciones numéricas y 2) los resultados experimentales.

Para el caso de  $Q_{CH_3} = 5 \mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 6.26a), se observa que al final del canal central, las partículas se concentran en la zona baja del canal, perdiendo la distribución curva. Estas se posicionan desde el córner inferior interno hasta más allá del centro del canal. En el caso  $Q_{CH_3} = 11 \mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 6.26b), no se termina de perder la formación curva. No obstante la distribución de las partículas sigue siendo mayor en el córner inferior interno del canal central. Finalmente, para el caso  $Q_{CH_3} = 33 \mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 6.26c), las partículas no pierden la formación curva. Los resultados experimentales, muestran una buena concordancia con los resultados numéricos. En la Figura 6.26a2 se puede apreciar como las partículas de  $6 \mu\text{m}$  a  $Q_{CH_3} = 5 \mu\text{L}/\text{min}$ , invaden la mitad del canal perdiendo por completo su distribución inicial. En la Figura 6.26b2 se observa como las partículas circulan en su mayoría por el centro del canal y en el borde interior tal y como predicen las simulaciones numéricas. En la Figura 6.26c2 se observa como las partículas circulan en su mayoría por el centro del canal. Debido a la velocidad de las partículas su visualización es más compleja, por ello, es posible visualizar únicamente la zona con mayor concentración de partículas.

### *Partículas de 20 micras*

Al igual que en el caso anterior, se ha analizado la distribución de las partículas, en este caso de  $20 \mu\text{m}$ , para los tres casos analizados,  $Q_{CH_3} = 5 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $Q_{CH_3} = 11 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $Q_{CH_3} = 33 \mu\text{L}/\text{min}$  al inicio del canal central y al final del mismo. En la Figura 6.27, se muestran los resultados numéricos de la distribución de las partículas de  $20 \mu\text{m}$ . En este caso, al no disponer de partículas teñidas de este tamaño no ha sido posible analizar esta zona experimentalmente, ya que su visualización sin tinte no tiene la suficiente resolución.

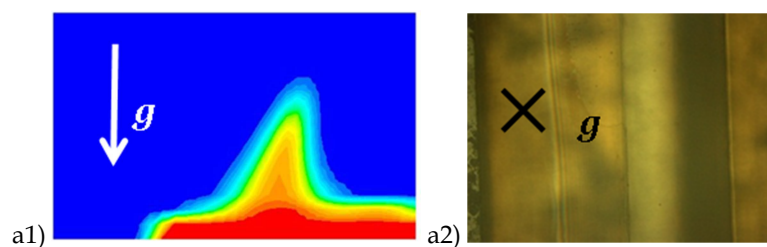


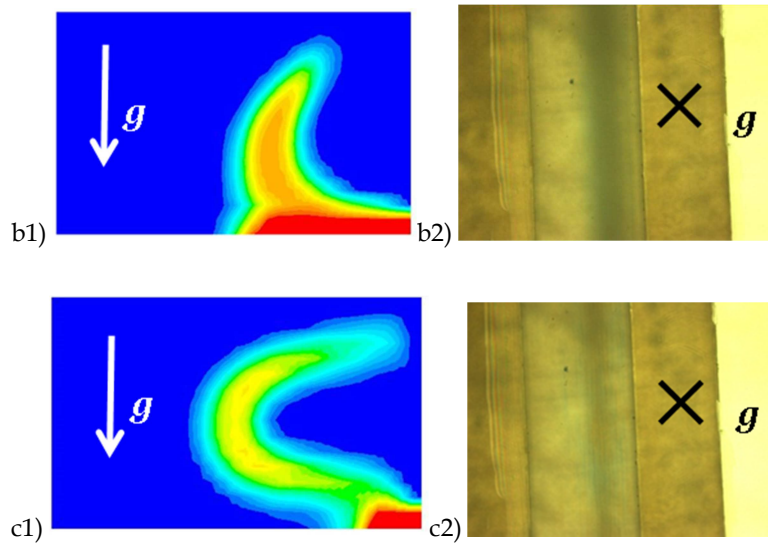


**Figura 6.27: Resultados numéricos de la distribución de las partículas en el inicio del canal central. Donde a)  $Q_{CH_3} = 5 \mu\text{l}/\text{min}$ , b)  $Q_{CH_3} = 11 \mu\text{l}/\text{min}$  y c)  $Q_{CH_3} = 33 \mu\text{l}/\text{min}$ .**

Como se puede ver en la Figura 6.27, la distribución de las partículas de  $20 \mu\text{m}$ , es similar a la de  $6 \mu\text{m}$ , sobre todo a caudales altos (Figura 6.27c). Sin embargo, se puede apreciar la tendencia de estas partículas a concentrarse en mayor medida en la zona baja del canal (Figura 6.27a y b) a caudales inferiores a  $Q_{CH_3} = 33 \mu\text{l}/\text{min}$ , debido a su mayor tamaño.

En la Figura 6.28 se muestran los resultados numéricos y experimentales de la distribución de partículas de  $20 \mu\text{m}$  en el final del canal central, para los tres casos analizados.





**Figura 6.28: Resultados numéricos de la distribución de las partículas al final del canal central. Donde a)  $Q_{CH3}= 5 \mu\text{l}/\text{min}$ , b)  $Q_{CH3}= 11 \mu\text{l}/\text{min}$  y c)  $Q_{CH3}= 33 \mu\text{l}/\text{min}$ .**

Como se puede observar en los casos analizados en la Figura 6.28, al igual que sucedía en el inicio del canal central, las partículas de  $20 \mu\text{m}$  tienden a concentrarse en el fondo del canal. Además, se confirma que la concentración de éstas en el fondo del canal aumenta a medida que circulan por este. Este escenario, se refleja fielmente en los resultados experimentales (Figura 6.28a2, b2 y c2).

### *Condiciones de trabajo optimizadas con el nuevo chip*

De los resultados numérico - experimentales obtenidos se concluye que:

- El caudal de entrada CH3 del chip debe ser inferior a  $33 \mu\text{L}/\text{min}$ , para que el efecto del citómetro no quede anulado.
- El caudal de entrada CH3 del chip debe ser superior a  $5 \mu\text{L}/\text{min}$ , para que todas las partículas no vayan por la zona baja del canal y no se vean influenciadas por los efectos de pared.
- El porcentaje de caudal de CH1 respecto al de CH2 debe ser superior para lograr eliminar las fuerzas inerciales sobre las partículas. Así, se obtendrá una distribución sin curvatura a lo largo del canal central.

Una vez analizados los resultados de los diferentes casos estudiados y comprobado la concordancia entre los resultados numéricos y experimentales, se ha realizado un último estudio numérico para

obtener las condiciones de trabajo óptimas en cuanto a la aplicación experimental del microdispositivo de separación selectiva de CTCs. En la Figura 6.29 se muestran los resultados para el caso optimizado analizado para los dos tamaños de partícula ( $6\mu\text{m}$  y  $20\mu\text{m}$ ), donde se ha empleado un caudal de  $Q_{\text{CH3}} = 11\ \mu\text{L}/\text{min}$ , de  $Q_{\text{CH2}} = 31,35\ \mu\text{L}/\text{min}$  y de  $Q_{\text{CH1}} = 95,5\ \mu\text{L}/\text{min}$ , lo que corresponde al caso 2 de la Tabla 6.4, con un caudal de CH1 cuatro veces superior al original.

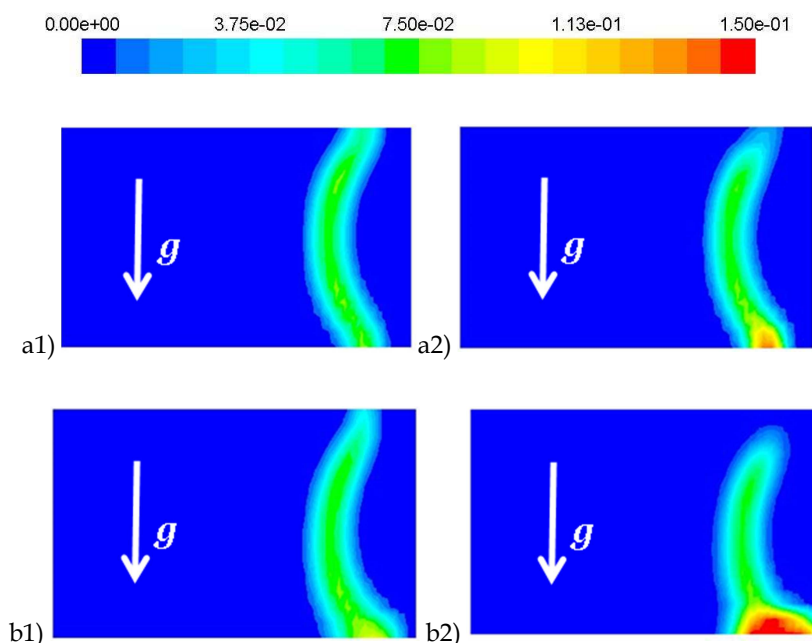


Figura 6.29: Distribución de las partículas para el caso optimizado, donde  $\text{CH3} = 11\ \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $\text{CH2} = 31,35\ \mu\text{L}/\text{min}$  y  $\text{CH1} = 95,5\ \mu\text{L}/\text{min}$ . Se representa a) inicio del canal central, b) final del canal central y en el caso para 1) partículas de 6 micras y 2) de 20 micras.

Como se puede observar en la Figura 6.29 aumentando 4 veces el flujo de CH1, respecto al caso 2 de la Tabla 6.4, se contrarrestan en gran parte las fuerzas inerciales sobre las partículas, consiguiendo una gran disminución en cuanto a la redistribución curva de las mismas. Así, se logran mantener las partículas en la zona de trabajo deseada a lo largo de todo el canal central, optimizando la aplicación del campo acústico y por lo tanto, el funcionamiento del microdispositivo.

Finalmente, se ha comprobado numéricamente el comportamiento de las muestras celulares existentes en la aplicación clínica del microdispositivo; leucocitos ( $12,5\ \mu\text{m}$  de diámetro y  $\rho = 1072\ \text{Kg}/\text{m}^3$ ) y CTCs ( $30\ \mu\text{m}$  de diámetro y  $\rho = 1040\ \text{Kg}/\text{m}^3$ ). En la Figura 6.30 se muestran los resultados para el caso optimizado analizado.

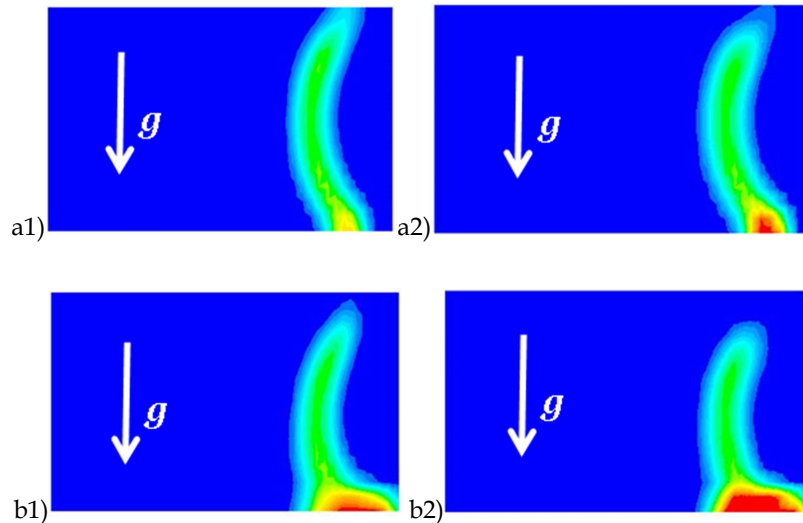


Figura 6.30: Distribución de las células para el caso optimizado, donde  $CH3 = 11 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $CH2 = 31,35 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $CH1 = 95,5 \mu\text{L}/\text{min}$ . Se representa a) inicio del canal central, b) final del canal central y en el caso para 1) leucocitos y 2) CTCs.

Como se puede comprobar en los resultados mostrados en la Figura 6.30, el comportamiento es similar al de las partículas mostradas en la Figura 6.29. No obstante, al ser de mayor tamaño y mayor densidad en el caso de los leucocitos, se observa una mayor tendencia a concentrarse ambas poblaciones en el fondo del canal.

## 6.6.- Conclusiones

El dispositivo en el cual se está trabajando para la separación selectiva de células no invasiva, es de gran impacto socio-económico en el sector de los tratamientos oncológicos personalizados. Hasta la fecha, se ha participado activamente en su desarrollo y caracterización. Además, mediante la determinación de las propiedades termofísicas y de transporte de los fluidos empleados, se ha analizado el aspecto hidrodinámico de la geometría, así como el efecto de las fuerzas inerciales modificando la geometría del microdispositivo, especialmente de la entrada, en beneficio de su rendimiento. En un segundo estudio, se ha podido comprobar que las fuerzas inerciales son relevantes en la geometría y en las condiciones de trabajo empleadas. Por lo que se han sugerido acciones de actuación para mejorar el rendimiento del microdispositivo controlando las condiciones de entrada. Los resultados experimentales, han corroborado los resultados numéricos obtenidos en la distribución de las partículas a lo largo del microdispositivo, por lo que el modelo realizado será de gran ayuda en el desarrollo final de este microdispositivo.



## 6.7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C. D. Chin, V. Linder, S. K. Sia, "Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities", *Lab Chip*, **7**(1) pp. 41-57, (2007).
- [2] A. A. Bhagat, H. Bow, H. W. Hou, S. J. Tan, J. Han, C. T Lim, "Microfluidics for cell separation", *Med Biol Eng Comput.*, **48**(10), pp. 999-1014, (2010).
- [3] S. J. Lee, S. Y. Lee, "Micro total analysis system ( $\mu$ -TAS) in biotechnology", *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, pp. 289-299, (2004).
- [4] P.A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes and A. Manz, "Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications", *Anal. Chem.*, **74**, pp. 2637-2652, (2002).
- [5] D. Kim, J. Y. Yun, S. J. Park, S. S. Lee, "Effect of microstructure on blood cell clogging in blood separators based on capillary action", *Microsyst. Technol.*, **15**, pp. 227-233, (2009).
- [6] T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, B. Yoshinobu, "Simultaneous separation, metering, and dilution of plasma from human whole blood in a microfluidic system", *Anal. Chem.*, **81**, pp. 3194-3198, (2009).
- [7] S. Yang, A. Undar, J. D. Zahn, "A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation", *Lab chip*, **6**, pp. 871-880, (2006).
- [8] S. Haeberle, T. Brenner, R. Zengerle and J. Ducreé, "Centrifugal extraction of plasma from whole blood on a rotating disk", *Lab Chip*, **6**, pp. 776-781, (2006),
- [9] A. P. Wong, M. Gupta, S.S Shevkoplyas, "Egg beater as centrifuge: isolating human blood plasma", *Lab Chip*, **8**, pp. 2032-2037, (2008).
- [10] P. Gascoyne, "Microsample preparation by dielectrophoresis: isolation of malaria". *Lab Chip*, **2**(2), pp. 70-75, (2002).
- [11] X. H. Cheng, "A microfluidic device for practical label-free CD4 + T cell counting of HIV-infected subjects". *Lab Chip*, **7**(2), pp. 170-178, (2007).
- [12] J. A. Korecka, J. Verhaagen, E. M. Hol, "Cell-replacement and gene-therapy strategies for Parkinson's and Alzheimer's disease", *Regen. Med.*, **2**(4), pp. 425-446, (2007).
- [13] Z. G. Wu, "Microfluidic high viability neural cell separation using viscoelastically tuned hydrodynamic spreading", *Biomed. Microdevices*, **10**(5), pp. 631-638, (2008).

- [14] S. Jin Tan, L. Yobas, G. Y. Hoe Lee, C. N. Ong, C. T. Lim, "Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood", *Biomed. Microdevices*, **11**, pp. 883–892, (2009).
- [15] S.L. Stotta, C.H. Hsua, D.I. Tsukrova, M. Yud, D. T. Miyamoto, B. A. Waltmand, S. M. Rothenberg, A. M. Shaha, M. E. Smas, G. K. Korira, F. P. Floyd, A. J. Gilmand, J. B. Lord, D. Winokur, S. Springer, D. Irimia, S. Nagrath, L. V. Sequist, R. J. Leed, K. J. Isselbacher, S. Maheswaran, D. A. Haber and M. Toner, "Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip", *PNAS*, **107**(47), pp. 18392–18397, (2010).
- [16] S. S. Kuntaegowdanahalli, A. Asgar, S. Bhagat, G. Kumar and I. Papautsky, "Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels", *Lab Chip*, **9**, pp. 2973–2980, (2009).
- [17] N. Pamme, "Continuous flow separations in microfluidic devices", *Lab Chip*, **7**, pp. 1644–1659, (2007).
- [18] D. R. Gossett, W. M. Weaver, A. J. Mach, S. C. Hur, H. T. Kwong, T. W. Lee, H. Amini, D. Di Carlo, "Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems", *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, pp. 3249–3267, (2010).
- [19] I. González, J. L. Fernández, T. E. Gómez, J. Berganzo, J. L. Soto, A. Carrato, "A polymeric chip for micromanipulation and particle sorting by ultrasounds based on a multilayer configuration", *Sens. Actuators: B.*, **144**(1), pp. 310–317, (2010).
- [20] H. Chun, T. D. Chung and H. C. Kim, "Cytometry and velocimetry on a microfluidic chip using polyelectrolytic salt bridges", *Anal. Chem.*, **77**, pp. 2490–2495, (2005).
- [21] T. Morijiri, S. Sunahiro, M. Senaha, M. Yamada, M. Seki, "Sedimentation pinched-flow fractionation for size and density-based particle sorting in microchannels", *Microfluid Nanofluid*, **11**, pp. 105–110, (2011).
- [22] N. Xia, T. P. Hunt, B. T. Mayers, E. Alsberg, G. M. Whitesides, R. M. Westervelt, D. E. Ingber, "Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow", *Biomed. Microdevices*, **8**, pp. 299–308, (2006).
- [23] B. S. Cho, T. G. Schuster, X. Zhu, D. Chang, G. D. Smith and S. Takayama, "Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm", *Anal. Chem.*, **75**(7), pp. 1671–1675, (2003).
- [24] C.H. Tai, S.K. Hsiung, C.Y. Chen, M.L. Tsai, G.B. Lee, "Automatic microfluidic platform for cell separation and nucleus collection", *Biomed Microdevices*, **9**, pp. 533–543, (2007).



- [25] A. Asgar, S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, I. Papautsky, "Inertial microfluidics for continuous particle filtration and extraction", *Microfluid Nanofluid*, **7**, pp. 217–226, (2009).
- [26] E. Racila, D. Euhus, A. J. Weiss, "Detection and characterization of carcinoma cells in the blood", *PNAS*, **95**, pp. 4589-4594, (1998).
- [27] N. Garrigós, J. Gallego, C. Guillén-Ponce, P. Guaraz, M. García-Bautista, A. Castillejo, A. Gómez-Martínez, A. Carrato, A. Rodríguez-Lescure, J. L. Soto, "Circulating tumour cell analysis as an early marker for relapse in stage II and III colorectal cancer patients: a pilot study", *Clin Transl Oncol.* **12**(2), pp. 142-7, (2010).
- [28] I. González, T. E. Gómez Alvarez-Arenas, L. J. Fernández Ledesma, A. Carrato Mena, J. L. Soto, J. Berganzo Ruiz, Patente solicitada P200703248, (2007).
- [29] L. Gor'kov, "On the forces acting on a small particle in an acoustic field in an ideal fluid", *SvPAC*, **6**, pp. 773-775, (1962).
- [30] F. Petersson, L. A. berg, A.M. Sward-Nilsson and T. Laurell, "Free flow acoustophoresis: microfluidic-based mode of particle and cell separation", *Anal. Chem.*, **79**, pp. 5117-5123, (2007).
- [31] P. Paterlini-Brechot, N. L. Benali, "Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions", *Cancer Lett.*, **253**, pp. 180–204, (2007).
- [32] B. Savage, P. R. McFadden, S. R Hanson, L. A. Harker, "The relation of platelet density to platelet age: survival of low- and high-density 111indium-labeled platelets in baboons", *Blood.*, **68**, pp. 386-93, (1986).
- [33] R. A. Rhoades, D. R. Bell, "Medical physiology: principles for clinical medicine", Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 0781768527, (2008).
- [34] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins et. al., "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels", *PNAS*, **104**, pp. 18892–18897, (2007).



## Capítulo 7

---

### **Conclusiones**



---

## 7. Conclusiones

A lo largo de este proyecto de tesis:

1. Se han determinado las propiedades termofísicas y de transporte de varias mezclas de interés nano-micro-biotecnológicas, en concreto:
  - DMSO - glucosa a diferentes concentraciones de glucosa.
  - DMSO - sacarosa a diferentes concentraciones de sacarosa.
  - DMSO - PBS a una fracción másica de DMSO del 10%.
  - PBS - H<sub>2</sub>O a una fracción másica de PBS del 10%.
  - Tolueno - Fullerenos C<sub>60</sub> a diferentes concentraciones de C<sub>60</sub>.

Los resultados más relevantes en torno a este estudio, han sido publicados en el siguiente artículo:

- ✓ Alain Martin, M. Mounir Bou-Ali, "Determination of thermal diffusion coefficient of nanofluid: Fullerene-toluene", *C. R. Mec.*, **339**, pp. 329-334, (2011).

Además han sido presentados en los siguientes congresos internacionales:

- ✓ 14th Congress on Biotechnology que se celebró en Barcelona del 13 al 16 de septiembre del 2009.  
Póster: "Separation Processes In Biological Mixtures By The Soret Effect".
- ✓ Congreso International Meeting on Thermodiffusion-IMT-9 celebrado en Toulouse en junio del 2010.  
Póster: "Determination of Thermal Diffusion Coefficient of Nanofluid: Fullerene-Toluene".

2. Se ha diseñado y construido una microcolumna termogravitacional de acuerdo con los límites de validez de la teoría de FJO. Además, se ha diseñado y construido un sistema óptico para el análisis de la separación a lo largo de la microcolumna. Por último, se ha validado el comportamiento termodifusivo de la microcolumna diseñada tanto numérica como experimentalmente.

Los resultados obtenidos en torno a este estudio, han sido recogidos en un artículo en colaboración con el Forschungszentrum Jülich GmbH:

- ✓ Philipp Naumann, Alain Martin, Hartmut Kriegs, Miren Larrañaga, M. Mounir Bou-Ali, and Simone Wiegand, "Development of a thermogravitational  $\mu$ -column with an interferometric contactless detection system", enviado.

Además, los resultados han sido presentados en los siguientes congresos:

- ✓ Congreso: Joint International Thermodynamics Conference 11, (JETC11), celebrado en Chemnitz (Alemania) del 27 Junio al 1 Julio del 2011.

Póster: Design, Construction and Numerical Validation of a Thermogravitational  $\mu$ Column.

- ✓ Congreso: 19th European Conference on Thermophysical Properties (19th ECTP), celebrado en Tesalónica (Grecia) del 28 de agosto al 1 de Septiembre del 2011.

Presentación oral: Thermogravitational microcolumn for thermodiffusion study of biological fluids.

- ✓ Workshop, CIC microGUNE Cooperation Session, celebrado en Mondragón el 14 de febrero del 2012.

Póster: Design and construction of a thermogravitational microcolumn for the determination of the thermodiffusion coefficient in biological fluids.

- ✓ Congreso internacional 10th International Meeting on Thermodiffusion, (IMT10) celebrado en Bruselas del 4 al 8 de junio del 2012.

Póster: Development of a New Thermogravitational  $\mu$ Column.

Por último, debido a la innovación de la microcolumna termogravitacional desarrollada en esta tesis doctoral se ha admitido a trámite una patente española (P201130055) de título:

- ✓ Microcolumna termogravitacional para determinar el coeficiente de difusión térmica de fluidos biológicos y fluidos coloidales sintéticos y biológicos.

Esta patente ha sido extendida a la Unión Europea (EP12382015) con el título:

- ✓ Thermogravitational microcolumn for determining the thermal diffusion coefficient of biological fluids and synthetic and biological colloidal fluids.

3. Se ha diseñado y construido un microdispositivo para el análisis de la influencia de la termodifusión en los procesos de separación a escala micro. Este dispositivo ha sido validado numérica y experimentalmente. Los resultados han demostrado una optimización en el proceso de separación de entorno al 10% para los casos analizados.

Los resultados obtenidos han permitido realizar dos artículos:

- ✓ Alain Martin, M. Mounir Bou-Ali, Haritz Barrutia, David Alonso de Mezquia, "Microfluidic Separation Process by The Soret Effect in Biological Fluids", *C. R. Mec.*, **339**, pp. 342-348, (2011).
- ✓ Alain Martin, M. Mounir Bou-Ali, "Microfluidic Separation process optimization by Thermal Forces". (En elaboración).

Además siendo presentados en los siguientes congresos:

- ✓ Fifth Internacional Conference on Thermal Engineering Theory and Applications-ICTEA, celebrado en Marrakech del 10 al 14 de mayo del 2010.  
  
Presentación Oral: "Soret Effect Separation Processes In Biological Mixtures Focused To Microfluidics".
- ✓ Congreso International Meeting on Thermodiffusion-IMT-9 celebrado en Toulouse en junio del 2010.  
  
Póster: "Microfluidic Separation Process by Soret Effect in Biological Fluids".
- ✓ Congreso internacional Microfluidics2010 que se celebrará del 8 al 10 de diciembre en Toulouse.  
  
Presentación Oral: "Soret Effect Separation in a Cell Laden Flow".
- ✓ Workshop, CIC microGUNE Cooperation Session, celebrado en Mondragón el 14 de Junio del 2011.  
  
Póster: "Microfluidic Separation Process By Thermohydrodynamic Effect In Biological Fluids".

- ✓ Congreso internacional 10th International Meeting on Thermodiffusion, (IMT10) celebrado en Bruselas del 4 al 8 de junio del 2012.

Presentación Oral: "Numerical and Experimental Analysis on Microfluidic Separation Process".

4. Por otro lado, se ha trabajado en la optimización de la separación selectiva de células tumorales de manera no invasiva. Los primeros resultados han demostrado una eficacia en la separación del 75%. Para poder llegar a niveles de separación aptos para la aplicación clínica, se han realizado diferentes estudios numéricos. En primer lugar, se han identificado los aspectos críticos relacionados con la geometría, gracias a los cuales se ha podido rediseñar el prototipo inicial. Así mismo, se ha estudiado el comportamiento de las poblaciones celulares en el interior del microdispositivo analizando la redistribución de éstas debido a las fuerzas inerciales. Estos resultados han sido corroborados experimentalmente, donde se ha podido comprobar su distribución a lo largo del chip en función de las condiciones de entrada. Gracias a este estudio, se ha podido identificar la relación de caudales óptima para obtener la población celular confinada en la zona de trabajo deseada. Se espera que estos resultados ayuden a conseguir una eficiencia de separación apta para la aplicación clínica.

Con los resultados obtenidos en este estudio se está elaborando un artículo en colaboración con los grupos del CSIC, Ikerlan y del Hospital general de Elche:

- ✓ Alain Martin, M. Mounir Bou-Ali, Itziar González, T. Gómez, J. L. Soto, J. Berganzo, M. Tijero, N. Lopez, "Hydrodynamic optimization of a circulating tumor cell sorting microdevice". En elaboración

Además, los resultados obtenidos han sido presentados en los siguientes congresos de carácter internacional:

- ✓ Congreso internacional USWNET 10 que se celebró en Groningen, Holanda en el 2010.

Presentación Oral: "Ultrasonic Extraction Of Tumour Cells From Peripheral Blood In A Plastic Resonator".

- ✓ Lab on a Chip Word Congress celebrado en San Diego en el 2010.

Póster: "A microdevice for ultrasonic extraction of circulating tumor cells in peripheral blood: early detection of metastasis".



- ✓ The 6th International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology, MMB 2011, celebrado del 4 al 6 Mayo del 2011 en Switzerland.

Póster: "Ultrasonic Extraction Of Circulating Tumor Cells From Peripheral Blood - A Noninvasive Method To Keep The Cells Viable For Later Biomolecular Analysis".

- ✓ Workshop, CIC microGUNE Cooperation Session, celebrado en Mondragón el 14 de febrero del 2012.

Póster: "Optimization of a microdevice for the separation of tumor cells from peripheral blood".

El trabajo realizado en esta tesis doctoral puede considerarse como base para la iniciación de una nueva línea de investigación del grupo de Mecánica de Fluidos de MGEP hacia la microfluídica y orientada hacia el sector biotecnológico.

Esta tesis doctoral ha sido financiada gracias a los siguientes proyectos:

- MIVDIRA y MIBIO2, financiados por el programa ETORTEK de Investigación estratégica del Gobierno Vasco.
- LOCUS y LOCUS2, financiado por el programa de proyectos I+D de investigación científica, acción estratégica del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.
- DAAD, financiado por el programa de Acción Integrada del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.
- MICROFLU y OPTTEM, financiados por el programa SAIOTEK del Gobierno Vasco de Industria.
- GOVOSORET2 y GOVSORET3, proyectos de investigación básica del departamento de Educación, Universidad e Investigación del Gobierno Vasco.



## Capítulo 8

---

### **Anexos**



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Thermodiffusion and coupled phenomena / Thermodiffusion et phénomènes couplés

## Determination of thermal diffusion coefficient of nanofluid: Fullerene–toluene

Alain Martin, M. Mounir Bou-Ali \*

MGEP Mondragon Goi Eskola Politeknikoa, Mechanical and Industrial Manufacturing Department, Loramendi 4, Apdo. 23, 20500 Mondragon, Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**

Available online 21 April 2011

**Keywords:**Fullerene  
Nanofluid  
Thermodiffusion  
Biological  
Thermogravitation technique  
Drug delivery

### ABSTRACT

Thermodiffusion coefficient at fullerene mass concentrations of 0.05%, 0.1%, 0.15%, and 0.2% was established for pure fullerene ( $C_{60}$ ) diluted in toluene solutions. For this, the thermogravitation technique has been used in planar configuration with 4 extraction points. The determination of the concentration distribution along the column in steady state is determined by the method of analysis based on density measurements. In order to determine the thermal diffusion coefficient all thermophysical properties such as density, viscosity, thermal expansion coefficient and mass expansion coefficients were determined. All these studies coincide with the importance of the knowledge of the thermophysics and transport properties of the nanofluids to develop new applications and to optimize the existing ones.

© 2011 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of Académie des sciences.

### 1. Introduction

The fullerene is one of the new materials that has attracted more interest from scientists since its discovery in 1985 by Harold Kroto et al. [1]. This material is the third allotropic form known of carbon, thus is part of the family of the graphite and diamond. However, while the graphite and diamond reticular structures are indefinitely extending, fullerenes form a molecular structure, i.e. they are discrete molecules constructed by a number of carbon atoms. Its atomic structure gives unique features, one of the most important is their high symmetry, in fact, it is the most symmetrical molecule known. Its structure consists of 60 atoms, 12 pentagons and 20 hexagons, which form a soccer ball with a diameter of 10 Å and an empty cavity inside.

The fullerene is produced naturally in small quantities by coal-fired power plants [2], lightning and has even been found in the meteorite that impacted in Allende, Mexico [3]. The most common fullerene is called  $C_{60}$ , however more fullerenes have been discovered,  $C_{70}$ ,  $C_{540}$  or nanotubes. Different types of fullerenes can be observed in Fig. 1.

Since its discovery, due to its variety of properties, different applications in different areas have been attributed to it. Thus, although its molecular structure is very resistant (can withstand up to 3000 bar), the attachment of molecules is particularly weak (Van der Waals). This is why it is used as an additive in the lubricants, creating a new generation of nanofluidic lubricants [4]. At chemical level, the  $C_{60}$  is very electronegative, therefore it forms easily compounds with donor atoms. An obvious combination is the  $C_{60}$  with an alkaline metal, as it is very electropositive. Thus it is achieved through the union of potassium (K) or rubidium (Rb) superconducting molecules character [5]. Their potential in optical applications can also be shown because their properties vary with UV light exposure [6].

The fullerene capacity to dissolve in common organic solvents is the property why there have been so many studies. Due to this capacity, it is possible to create many fullerene derivatives maintaining their exceptional properties. Thus, new

\* Corresponding author.

E-mail address: mbouali@eps.mondragon.edu (M.M. Bou-Ali).

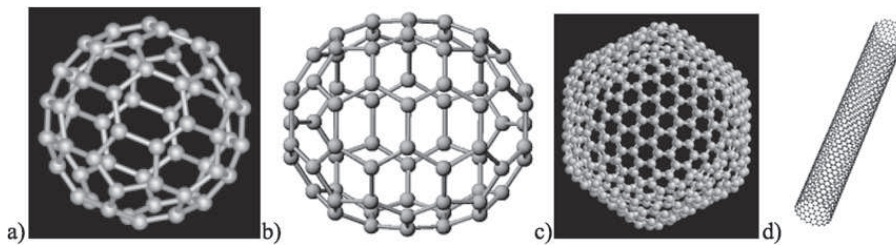


Fig. 1. Different kinds of fullerenes. a)  $C_{60}$ , b)  $C_{70}$ , c)  $C_{540}$  and d) nanotube.

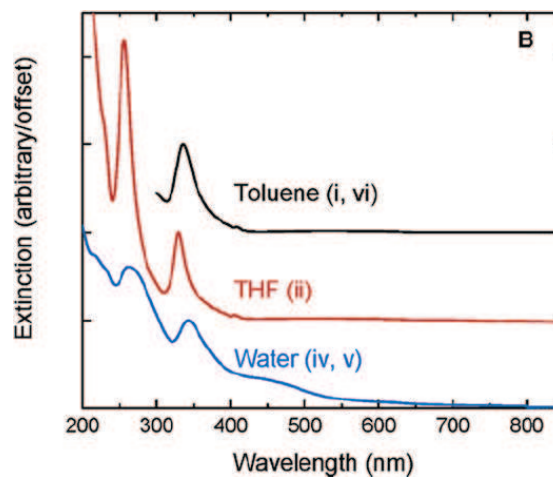


Fig. 2. Spectral analysis of  $C_{60}$  dissolved in toluene, THF and water [13].

polymers were created with additives of  $C_{60}$  providing their properties such as hardness and low density. Besides, through the possibility of dissolving in organic solvents, its dissolution in aqueous media has been achieved [7]. This has ensured its application in biology, arousing great interest in medical applications. Because of its size, some experiments have been carried out in order to use it as an inhibitor of the protease that causes AIDS virus (HIV) [8,9]. Moreover, its similarity in size with common drugs makes it viable as a possible drug carrier [10].

Other scientists have taken advantage of its internal cavity, and they have added up to three different atoms inside. Most of them have introduced metal atoms (metallofullerenes) or noble gases in order to use in MRI or X-ray visualization [11,12]. These applications are of great interest especially against cancer. In addition, the human body can easily tolerate fullerenes as they are composed entirely of carbon. Once they have finished their functionality, the  $C_{60}$  is small enough to be expelled by the body. However, larger fullerenes tend to accumulate in the lung, liver and bones. Some studies have shown some harmful behaviour in the human being with this type of nanoparticles [13]. This adverse situation has its origin in the low solubility of these nanoparticles in aqueous media (approximately 1.6 mg/ml). When they are used in organic solvents such as toluene, the solubility is 2.9 mg/ml, the solution is molecular. However, in aqueous solutions, at certain concentrations of fullerene  $C_{60}$  generates aggregates or nanocrystals [7,13]. It can be concluded that these aggregations are responsible for their toxicity. These structures and their morphology are still ambiguous and questionable, therefore it is important to carry out a study. Fig. 2 shows a spectral analysis of  $C_{60}$  in different solvents, which affords a unique excitation around 340 nm for organic solvents; toluene and THF. This excitation corresponds to  $C_{60}$  molecules. However, in the aqueous solution of  $C_{60}$  spectrum, two excitations can be observed, one around 340 nm ( $C_{60}$ ) and other around 490 nm corresponding to nanocrystals formed by  $C_{60}$  molecules.

It can be concluded the strong interest of fullerene  $C_{60}$  in medical applications. Consequently, this work has focused on the characterization of the first and second order thermophysical and transport properties of nanofluid (toluene–fullerene  $C_{60}$ ) for 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2 mass fractions concentration percentage of fullerene. In particular, it has been determined the density, dynamic viscosity, thermal diffusion coefficient and mass and thermal expansion coefficients. This study will improve the knowledge of the behaviour of these interesting nanoparticles in the presence of a temperature gradient, likewise it can optimize the potential applications related with transport phenomena in this type of nanofluid.

## 2. Material and method

Preparation of the samples are carry out with fullerene  $C_{60}$  (SES Research,  $\geq 99.5\%$  purity) and toluene (Merck, purity  $\geq 99.9\%$ ). Samples have been made at different mass concentrations: fullerene mass fraction percentages of 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2. Due to the difficulties dissolving fullerene in toluene no major mass fractions mixtures were done. For these mixtures, a precision balance Gram VXi-310 of an accuracy of 0.0001 g is used. The dynamic viscosity has been determined by a

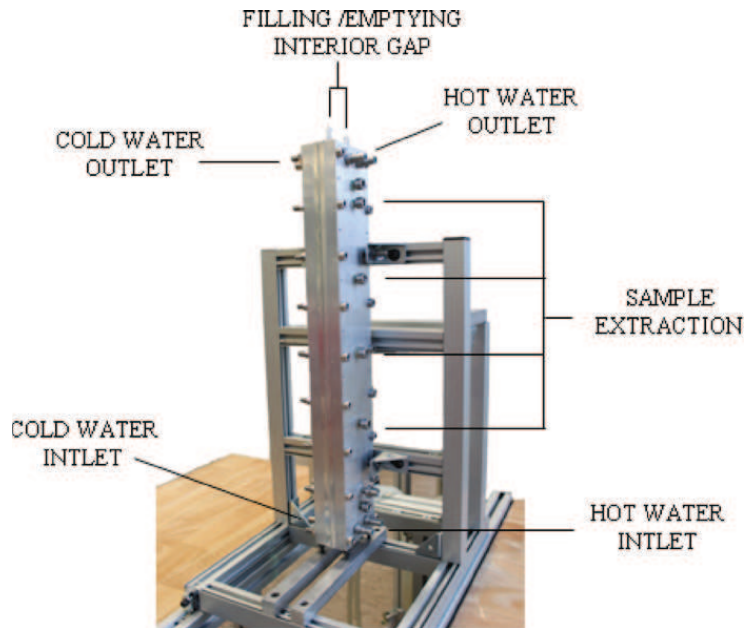


Fig. 3. Thermogravitational column configuration.

ball drop microviscosimeter Anton Paar AMVn with a viscosity accuracy of  $10^{-6}$  Pa s and temperature stability of  $\pm 0.01$  °C. In order to determine density, thermal and mass expansion coefficients, an Anton Paar DMA 5000 vibrating quartz U-tube densimeter is used. It has a reproducibility of  $1 \times 10^{-6}$  g/cm<sup>3</sup> with a temperature accuracy of 0.01 °C. Finally, for the thermal diffusion coefficient, the thermogravitational technique with 4 extraction points has been used. Due to the nanofluidic character of the mixtures, a new experimental protocol has been made, in order to avoid possible contamination in the mixtures. For this aim, we have proposed an experimental procedure that involves the systematic cleaning and calibration for each measurement made in the thermogravitational installation. This procedure avoids possible erroneous measurements due to the contamination. The validation of the proper functioning of the thermodiffusive systematic process has been carried out with toluene-hexane mixture at toluene mass fraction of 0.5167, which thermal diffusion coefficient is well defined in the literature [14,15]

### 3. Experimental procedure

To determine the thermodiffusion coefficient, the thermogravitational column (TC) technique is used. In this case a flat configuration with four-point sample extraction is used (Fig. 3), with a column height of 500 mm and a gap of  $1 \pm 0.005$  mm. For more details about the experimental procedure of this technique the reader is invited to consult [16] where the procedure is fully explained.

The thermodiffusion coefficient can be determined by measuring the change in the density of samples at steady state along the column, as shown in Eq. (1) [15]:

$$D_T = -\frac{gL_x^4}{504} \frac{\alpha}{c_0(1-c_0)\beta\eta} \frac{\partial\rho}{\partial z} \quad (1)$$

where  $L_x$  is the gap between the two vertical walls of the TC, which is  $1 \pm 0.005$  mm,  $c_0$  is the initial mass fraction of the reference component in the initial homogeneous mixture. The thermal expansion coefficient  $\alpha = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial\rho}{\partial T}$  is determined from a calibration curve which relates density with temperature. For this purpose a mixture with the initial mass fraction at five different temperatures close to the average temperature are measured ( $\Delta T = 25 \pm 1$  °C). The mass expansion coefficient  $\beta = \frac{1}{\rho} \frac{\partial\rho}{\partial c}$  is determined from a calibration curve which relates mass fraction and density. In order to make the calibration, five mixtures with known concentration, close to the initial mass fraction ( $c_0 \pm 0.02$ ) are prepared by weighing.  $\rho$  is the density of the mixture with the initial mass concentration  $c_0$ ,  $\frac{\partial\rho}{\partial z}$  is the vertical density gradient along TC in steady state,  $g$  is the gravitational acceleration and  $\eta$  is the dynamic viscosity.

In thermogravitational columns three effects are combined: first, the horizontal thermodiffusion flow generated by the horizontally applied temperature gradient; next, the molecular diffusion flow due to the concentration difference; and finally, the convection flow due to the gravitational field and the horizontal density gradient. The thermodiffusion coefficient of a given component is positive when this component, being the heaviest one, goes toward the cold wall, giving rise to enrichment in this component at the bottom of the column, whereas the other component goes to the hot wall giving rise to enrichment in this second component at the top of the column.



**Table 1**Thermophysics and transport properties of toluene–fullerene C<sub>60</sub> at 25 °C.

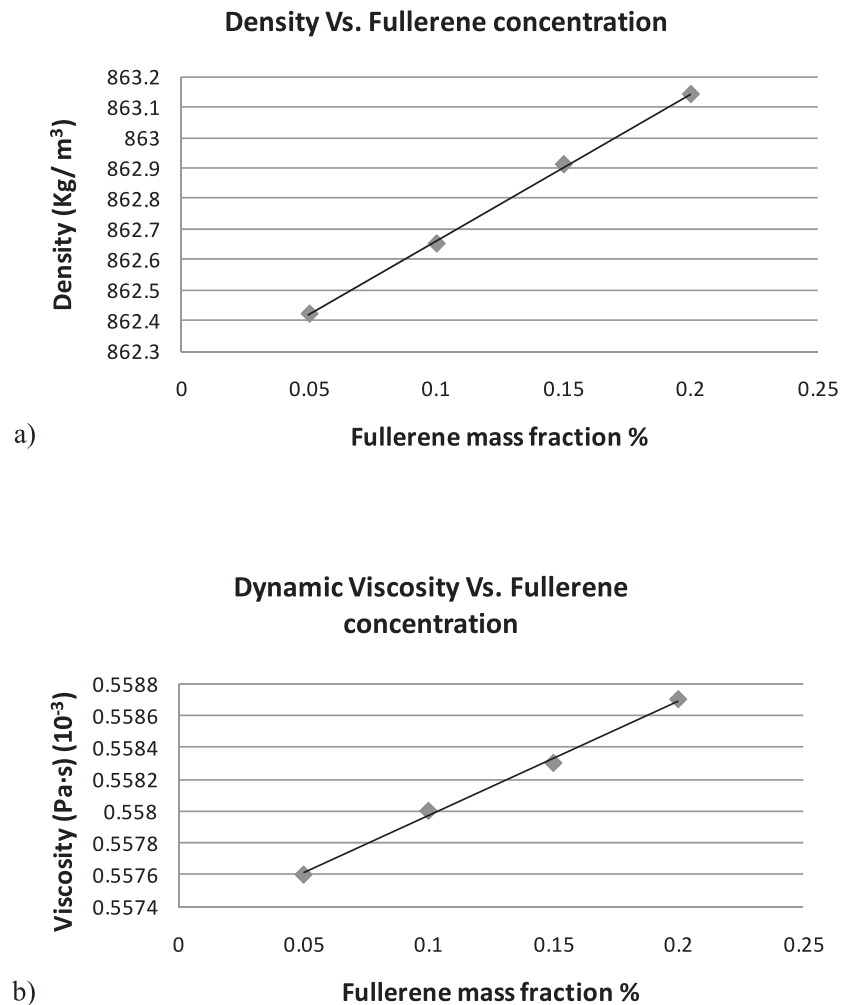
Mass fraction concentration (%)	Density (kg/m <sup>3</sup> )	$\eta$ (Pa s) ( $10^{-3}$ )	$\beta$	$\alpha$ (K <sup>-1</sup> ) ( $10^{-3}$ )	$D_T$ (m <sup>2</sup> /sK) ( $10^{-11}$ )
0.05	862.42	0.5576	0.621	1.079	5.435
0.1	862.65	0.5580	0.608	1.080	3.881
0.15	862.91	0.5583	0.598	1.080	3.415
0.20	863.14	0.5587	0.578	1.079	3.398

#### 4. Experimental results

All experiments are performed at 25 °C. In order to obtain consistent results, all the measurements are conducted at least 4 times under the same working conditions and the deviation of the thermal diffusion coefficient has been below 4%. Table 1 shows the thermophysical and transport properties determined for the toluene–fullerene mixtures at different mass concentrations and at 25 °C. Density, dynamic viscosity  $\eta$ , mass expansion coefficient  $\beta$  and the thermal expansion coefficient  $\alpha$  are represented respectively.

Fig. 4 shows the results of the density, dynamic viscosity  $\eta$ , mass expansion coefficient  $\beta$  and the thermal expansion coefficient  $\alpha$  respectively for different mass concentrations.

Regarding the results, as the concentration of fullerene increases, both the density and the viscosity increase linearly. However, the mass expansion coefficient has an opposite trend, decreases linearly with the concentration of fullerene. On the other hand, it has been demonstrated that the thermal expansion coefficient is constant, i.e., is independent of the concentration of fullerene. Even toluene being one of the best solvents for fullerene, its solubility still remains minimal, about 2.9 mg/ml. Therefore, when using such small concentrations of solute, the variations in thermophysical properties results are minimal. Thus, the development of the mixtures must be very precise because a small variation in the mass of the solute or the solvent makes a huge change in final concentration.



**Fig. 4.** a) Density vs. fullerene mass fraction. b) Dynamic viscosity vs. fullerene mass fraction. c) Mass expansion coefficient vs. fullerene mass fraction. d) Thermal expansion coefficient vs. fullerene mass fraction at 25 °C.

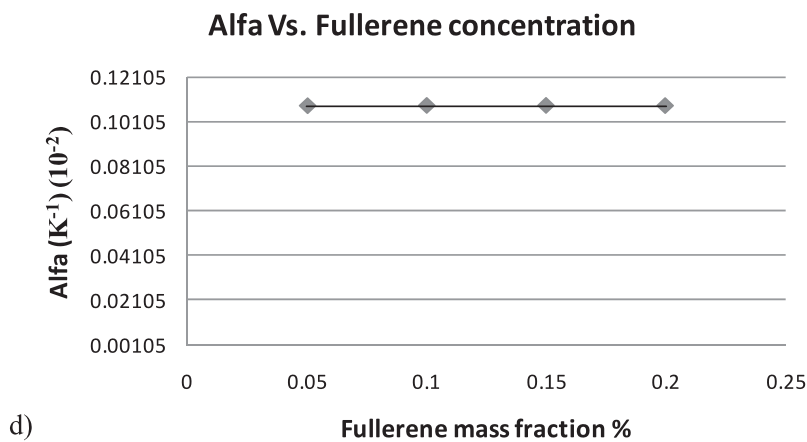
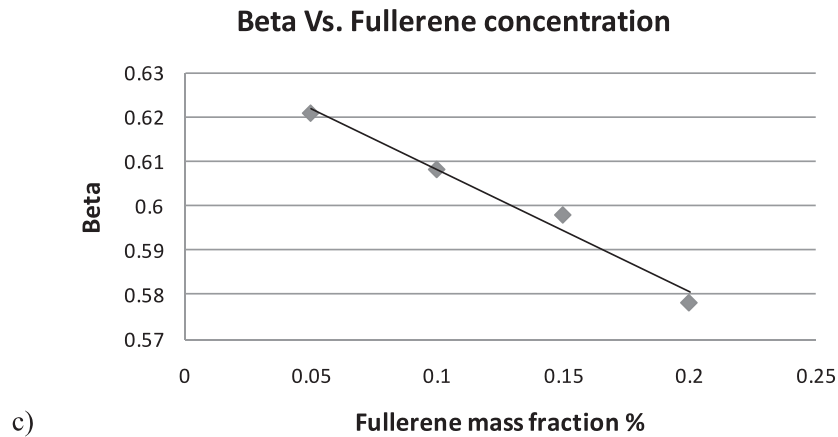


Fig. 4. (continued)

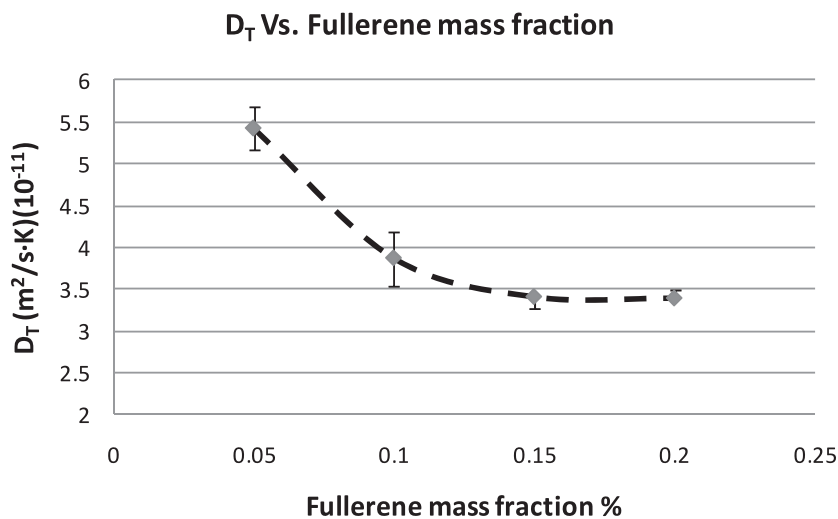


Fig. 5. Thermal diffusion coefficient vs. fullerene mass fraction at 25 °C.

After obtaining all the necessary thermophysical properties, the thermal diffusion coefficient ( $D_T$ ) has been determined for different concentrations of fullerene. These results are represented in Fig. 5.

As it can be seen the thermal diffusion coefficient is at the same range as common binary liquids mixtures coefficients. In this case, the thermal diffusion coefficient decreases in a not linear way with concentration, however, this trend changes close to the solubility limit to a constant value becoming independent of the mass fraction. This behaviour was confirmed in polymers too, where  $D_T$  was found independent of molecular weight [17], i.e. the polymer chain length. Even in simple fluid

mixtures, such as alkanes, the molar mass independent thermodiffusion behaviour was demonstrated [18]. It is verified too, since  $D_T$  is positive, that these kinds of mixtures have a positive Soret effect behaviour, i.e., when a temperature gradient is applied, the heaviest component (fullerene  $C_{60}$ ) goes toward the cold wall.

## 5. Conclusion

We have measured nanofluid (toluene–fullerene  $C_{60}$ ) first and second order thermophysical and transport properties, at fullerene mass fractions percentages of 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2. Due to the results obtained it has been observed that the behaviour of the thermophysical properties is linear in function of concentration. In addition, it was determined that the thermal expansion coefficient is constant, so, independent of the concentration of fullerene. On the other hand, it has been seen that the thermal diffusion coefficient is at the same range of common binary liquids mixtures and tends to a constant value close to the solubility limit. Thanks to these results, an improvement and an optimization of the potential applications related to the transport phenomena in nanofluids can be achieved.

## Acknowledgements

This study was realized with LOCUS project grants from the R+D+I national plan of the Department of Education and Science of the Spanish Government and with GOVSORET, MIVDIRA, DIRAMINA and MICNOFLU projects of the Basque Government.

## References

- [1] H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley,  $C_{60}$ : Buckminsterfullerene, *Nature* 318 (1985) 162.
- [2] L. Becker, T.E. Bunch, Fullerenes, fullerenes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Allende meteorite, *Meteorit. Planet. Sci.* 32 (4) (1997) 479–487.
- [3] S. Utsunomiya, K.A. Jensen, G.J. Keeler, R.C. Ewing, Uraninite and fullerene in atmospheric particles, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4943–4947.
- [4] A. Katz, M. Redlich, L. Rapoport, H.D. Wagner, R. Tenne, Self-lubricating coatings containing fullerene-like WS<sub>2</sub> nanoparticles for orthodontic wires and other possible medical applications, *Tribol. Lett.* 21 (2) (2006) 135–139.
- [5] O. Gunnarsson, Superconductivity in fullerenes, *Rev. Mod. Phys.* 69 (1997) 203–210.
- [6] R. Signorini, M. Zerbetto, M. Meneghetti, R. Bozio, M. Maggini, C.D. Faveri, M. Prato, G. Scorrano, Fullerene derivatives embedded in sol–gel materials for optical limiting, in: Zaky H. Kafafi (Ed.), *Fullerene and Photonics III*, vol. 2854, The International Society for Optical Engineering, 1996, pp. 130–139.
- [7] P. Scharff, K. Risch, L. Carta-Abelmann, I.M. Dmytruk, M.M. Bilyi, O.A. Golub, A.V. Khavryuchenko, E.V. Buzaneva, V.L. Aksenov, M.V. Avdeev, Yu.I. Prylutskyy, S.S. Durov, Structure of  $C_{60}$  fullerene in water: Spectroscopic data, *Carbon* 42 (2004) 1203–1206.
- [8] R. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, J.A. Castoro, C. Wilkins, S.H. Friedman, D.L. DeCamp, G.L. Kenyon, Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 6510–6512.
- [9] S.H. Friedman, D.L. DeCamp, R.P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, G.L. Kenyon, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 6506–6509.
- [10] L. Qingnuan, X. Yan, Z. Xiaodong, L. Ruili, D. Qieqie, S. Xiaoguang, C. Shaoliang, L. Wenxin, Preparation of  $^{99m}Tc-C_{60}(OH)_x$  and its biodistribution studies, *Nucl. Med. Biol.* 29 (2002) 707–710.
- [11] M. Mikawa, H. Kato, M. Okumura, M. Narazaki, Y. Kanazawa, N. Miwa, H. Shinohara, Paramagnetic water-soluble metallofullerenes having the highest relaxivity for MRI contrast agents, *Bioconjugate Chem.* 12 (2001) 510–514.
- [12] A. Miyamoto, H. Okimoto, H. Shinohara, Y. Shibamoto, Development of water-soluble metallofullerenes as X-ray contrast media, *Eur. Radiol.* 16 (2006) 1050–1053.
- [13] J.D. Fortner, D.Y. Lyon, C.M. Sayes, A.M. Boyd, J.C. Falkner, E.M. Hotze, L.B. Alemany, Y.J. Tao, W. Guo, K.D. Ausman, V.L. Colvin, J.B. Hughes,  $C_{60}$  in water: Nanocrystal formation and microbial response, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 4307–4316.
- [14] W. Köhler, B. Müller, Soret and mass diffusion coefficients of toluene/n-hexane mixtures, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 4367–4370.
- [15] M.M. Bou-Ali, O. Ecnarro, J.A. Madariaga, C.M. Santamaria, J.J. Valencia, Thermogravitational measurement of the Soret coefficient of liquid mixtures, *J. Phys.: Condens. Matter* 10 (1998) 3321–3331.
- [16] J.K. Platten, M.M. Bou-Ali, P. Costeseque, J.K. Dutrieux, W. Köhler, C. Leppla, S. Wiegand, G. Wittko, Benchmark values for the Soret, thermal diffusion and diffusion coefficients of three binary organic liquid mixtures, *Philos. Mag.* 83 (2003) 1965–1971.
- [17] M.E. Schimpf, J.C. Giddings, Characterization of thermal diffusion in polymer solutions by thermal field-flow fractionation: Dependence on polymer and solvent parameters, *J. Polym. Sci. B* 27 (1989) 1317–1332.
- [18] P. Blanco, P. Polyakov, M.M. Bou-Ali, S. Wiegand, Thermal diffusion and molecular diffusion values for some alkane mixtures: A comparison between thermogravitational column and thermal diffusion forced Rayleigh scattering, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 8340–8345.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

## Comptes Rendus Mecanique

www.sciencedirect.com



Thermodiffusion and coupled phenomena / Thermodiffusion et phénomènes couplés

## Microfluidic separation process by the Soret effect in biological fluids

Alain Martin, M. Mounir Bou-Ali\*, Haritz Barrutia, David Alonso de Mezquia

MGEP Mondragon Goi Eskola Politeknikoa, Mechanical and Industrial Manufacturing Department, Loramendi 4, Apdo. 23, 20500 Mondragon, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Available online 22 April 2011

## Keywords:

Microfluidics  
Molecular diffusion  
Biotechnology  
Soret effect  
Microseparation

## ABSTRACT

In this article the thermophysical and transport properties of mixtures composed of glucose and sucrose in dimethylsulfoxide (DMSO) are determined. The studied mass concentrations are 5%, 10%, 15%, 20% and 25% of glucose or sucrose in DMSO at an average temperature of 25 °C. The properties studied experimentally are the dynamic viscosity, density, mass and thermal expansion coefficient and thermodiffusion coefficient. The thermogravitational technique in flat configuration is used in order to obtain the thermodiffusion coefficients. Once these properties are known, the work is focused on the numerical study of applying a temperature gradient in microdevices in order to optimize the extraction of DMSO using the CFD Ansys Fluent software. The results show an improvement even of 35% on microfluidic separation techniques that are based on a purely diffusive regime.

© 2011 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

For over a decade, numerous studies have demonstrated the importance of miniaturization in biotechnology [1], since it can perform multiple assays simultaneously in a short period of time and uses less sample and reagent, among others. To this end, microfluidic platforms are used, where the flows are laminar. Because of this, the mix of components, in many cases, is limited by molecular diffusion. This makes the analysis of transport properties essential to determine the efficiency of the mixture.

Within this context, one of the applications that have been attributed to microfluidic devices is the cleaning of cryopreserved cells, removing the cryoprotectant by molecular diffusion [2–4]. However, the microdevices submitted for this purpose are too large or too complicated geometrically. This article presents the possibility of improving the efficiency of these microdevices by the application of temperature gradients. These temperature gradients increase the separation through the Soret effect [5].

One of the cryoprotectants employed is DMSO, which is used to cryopreserve cells, tissues or organs [6]. Some studies have shown that its power of cryopreservation, is improved by adding sugars such as glucose [7]. Although DMSO provides a protective benefit to cells during freezing, a long-term exposure can result in cell death because of its toxicity [4]. Therefore, before implanting the cells it is necessary to clean them. The usual technique is the centrifugation cleaning, however, this technique can damage up to 30% of the cells [8].

This article demonstrates the importance of determining the transport properties in biological mixtures in order to improve on a microscopic scale the separation process without damaging the cells. To determine the transport properties, specifically the thermodiffusion coefficient, the thermogravitational column technique is used [9]. The experimental results are used in the numerical software Ansys Fluent, where the benefits of the Soret effect at the micro-scale is observed, optimizing the microdevices for DMSO extraction.

\* Corresponding author.

E-mail address: mbouali@eps.mondragon.edu (M.M. Bou-Ali).

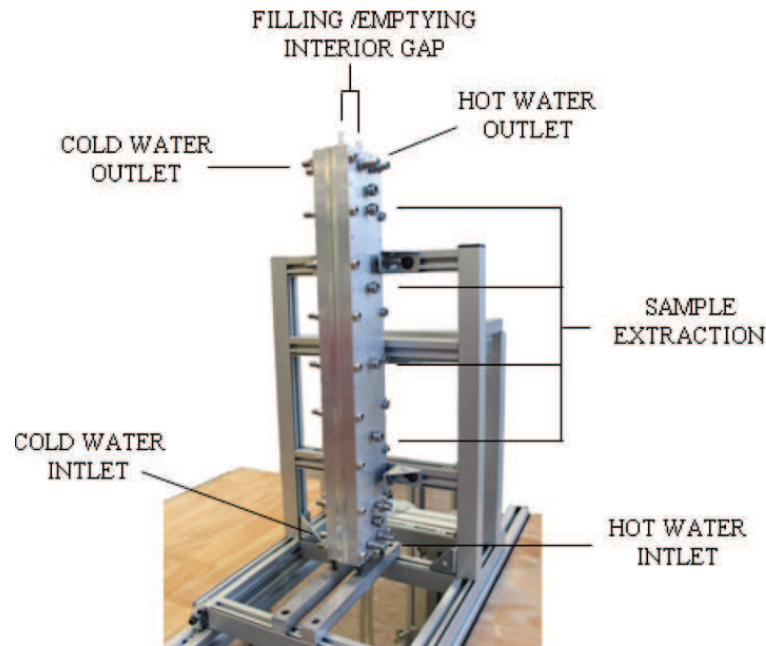


Fig. 1. Thermogravitational column configuration.

The determined properties correspond to biological mixtures of sucrose–DMSO and glucose–DMSO at mass concentrations of 5%, 10%, 15%, 20% and 25% of sucrose and glucose. Similarly, the thermophysical and transport properties for a mass concentration of 10% of DMSO in phosphate buffered saline (PBS) is determined, to discuss the results of work [3] and demonstrate the effectiveness of the Soret effect in separation microdevices in biological mixtures.

## 2. Experimental procedure

To determine the thermodiffusion coefficient, the thermogravitational column (TC) technique is used. In this case a flat configuration with four-point sample extraction is used (Fig. 1). For more details around the experimental procedure of this technique the reader is invited to consult [10] where is fully explained.

The thermodiffusion coefficient can be determined by measuring the change in the density of samples at steady state along the column, as shown in Eq. (1) [11]:

$$D_T = -\frac{gL_x^4}{504} \frac{\alpha}{c_0(1-c_0)\beta\eta} \frac{\partial\rho}{\partial z} \quad (1)$$

where  $L_x$  is the gap of the TC,  $c_0$  the initial mass fraction of the reference component in the initial homogeneous mixture,  $\alpha = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial\rho}{\partial T}$  the thermal expansion coefficient,  $\beta = \frac{1}{\rho} \frac{\partial\rho}{\partial c}$  the mass expansion coefficient,  $\rho$  the density of the mixture,  $\frac{\partial\rho}{\partial z}$  the density gradient along TC,  $\nu$  the kinetic viscosity,  $g$  the gravitational acceleration and  $\eta$  the dynamic viscosity.

## 3. Experimental results

All experiments are performed at an average temperature of 25 °C. All measurements were repeated at least 4 times. In all cases the deviation was less than 4%. Table 1 shows the thermophysical and transport properties determined for mixtures of sucrose–DMSO, glucose–DMSO and DMSO–PBS at different mass concentrations at an average temperature of 25 °C. Fig. 2 shows the thermal diffusion coefficient versus the mass concentration of sucrose (Fig. 2a) and glucose.

Fig. 2 shows how the thermodiffusion coefficient decreases linearly as the solute concentration increases. At solute concentrations on the order of 30% of sucrose and glucose it is expected that the thermal diffusion coefficient changes sign, i.e. in these concentrations the denser component is directed toward the warmest wall. Therefore, at higher concentration of sugars in DMSO, the thermodiffusion coefficient is negative which will mean readjusting the sense of the temperature gradient depending on the range of solute concentration in the mixture in order to optimize the separation.

## 4. Numerical simulation

Through numerical studies performed in a finite volume method (FVM) based fluid flow solver [12], the possibility of optimizing the separation process in the microdevices by Soret effect is analyzed [13]. To this purpose, the geometry proposed by other researchers is used [3], which separates the DMSO only by molecular diffusion. This device shown in Fig. 3 is composed mainly of a central cavity of constant rectangular section where the separation occurs by diffusion of



**Table 1**

Thermophysic and transport properties of sucrose–DMSO, glucose–DMSO and DMSO–PBS mixtures at an average temperature of 25 °C.

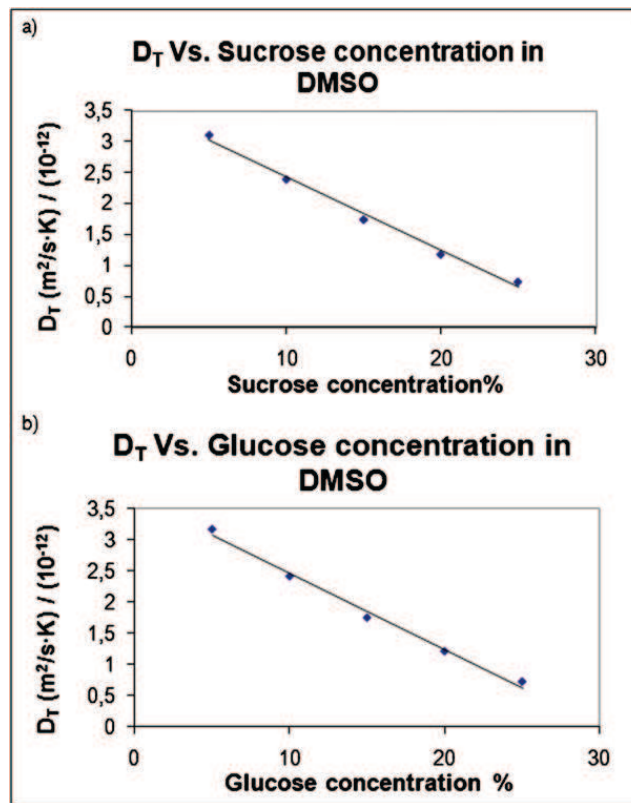
% Sucrose	Density (kg/m <sup>3</sup> )	$\alpha$ (°C <sup>-1</sup> ) (10 <sup>-4</sup> )	$\beta$ (10 <sup>-1</sup> )	$\eta$ (kg/ms) (10 <sup>-3</sup> )
5	1113.85	8.87	3.404	2.73
10	1132.89	8.57	3.41	4.05
15	1152.37	8.28	3.438	6.4
20	1172.38	8.03	3.449	10.95
25	1192.70	7.72	3.532	20.59

% Sucrose	Density (kg/m <sup>3</sup> )	$\alpha$ (°C <sup>-1</sup> ) (10 <sup>-4</sup> )	$\beta$ (10 <sup>-1</sup> )	$\eta$ (kg/ms) (10 <sup>-3</sup> )
5	1114.08	8.86	3.405	2.93
10	1133.12	8.56	3.402	4.06
15	1152.62	8.30	3.4	6.34
20	1172.36	8.01	3.399	10.55
25	1192.41	7.69	3.386	18.73

% PBS	Density (kg/m <sup>3</sup> )	$\alpha$ (°C <sup>-1</sup> ) (10 <sup>-4</sup> )	$\beta$ (10 <sup>-1</sup> )	$\eta$ (kg/ms) (10 <sup>-3</sup> )
10	1070.64	3.97	0.706	1.345



**Fig. 2.** Variation of the thermal diffusion coefficient in mixtures of a) sucrose–DMSO, b) glucose–DMSO versus the mass concentration and at a temperature of 25 °C.

DMSO. The flows are introduced through two opposing inlets. These two flows are separated by a splitter plate that redirects the flow and prevents the mixing between them, so that they flow in parallel to the central cavity. The flow extraction is performed by two outputs identical to the inlet design. From the top entry cleaning liquid is introduced, which in this case is PBS, while from the bottom entry a mixture of 10% DMSO in PBS is introduced.

The model used in the numerical simulation represents the main parts of the device, i.e. the central cavity and the transition to outlets. The central cavity consists of two flat plates that generate a constant rectangular cavity. The dimensions of it are exactly those used in [3], 25 mm wide, 500  $\mu\text{m}$  high and 75 mm long. Downstream of this section, constant area geometry is used as transition to outlets. The overall length from the beginning of the central cavity to the outlets, is  $L = 111$  mm. In Fig. 4a can be appreciated the two inputs coupled to the central cavity in order to achieve fully developed flow in the cavity. In Fig. 4b the whole geometry can be seen, where the transition from the central cavity to the outlets is shown.

A 3-D incompressible implicit numerical method is used. For higher accurate results double precision option is used and to avoid instabilities second order discretization for pressure, density, momentum, mass flux and energy is used too.

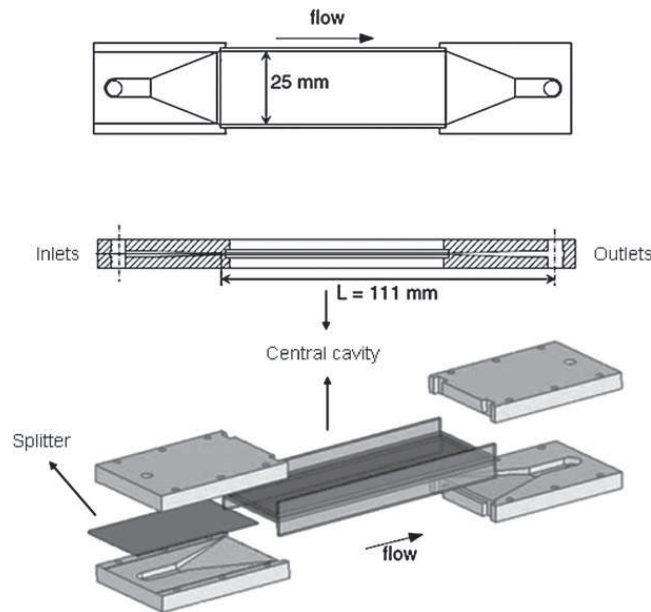


Fig. 3. Diagram of the experimental device used in [3].

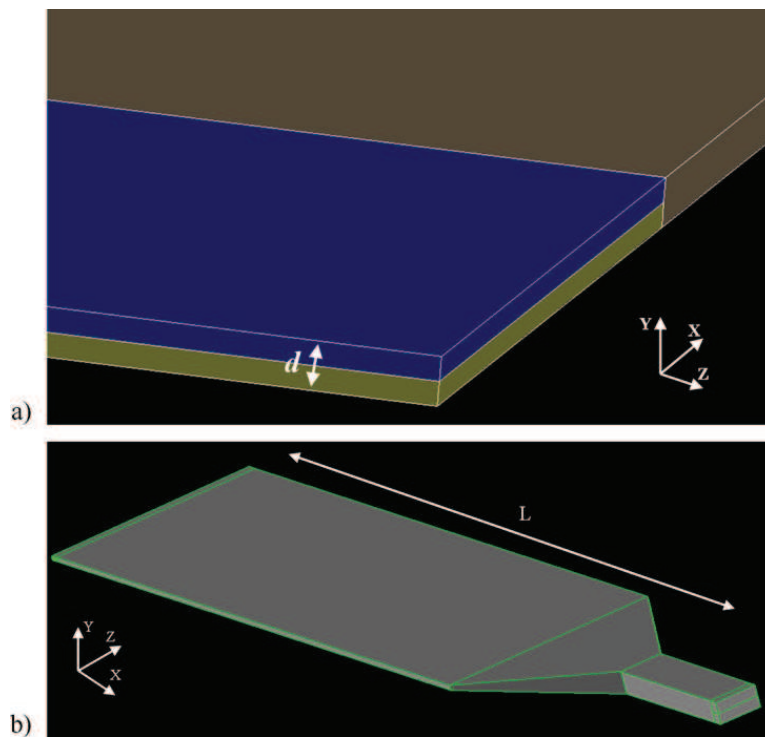


Fig. 4. Model used. a) Detail of the entrance area of the flow, b) general view of the device model.

A fourteen order of magnitude residual level drop is selected to convergence in this study to be sure that the system reaches the steady state. The final mesh configuration consists of 416 000 hexahedral cells.

#### 4.1. Governing equations

The fully developed flow in a microchannel is governed by the Navier–Stokes equations (Eq. (2)) for the geometrical model of the channel depicted in Fig. 4:

$$\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} = \frac{1}{\eta} \frac{dp}{dx}$$



**Table 2**

Comparison of the separation ratio with and without Soret effect for DMSO–PBS mixture with a mass fraction of 10% DMSO at  $T = 25^\circ\text{C}$ .

$f_q$	$q_t$ ( $\text{m}^3/\text{min}$ ) ( $10^{-8}$ )	$c_c/c_0$ [3]	$c_c/c_0$ (Soret)	Improvement (%)
0.1	3.3	0.13	0.08	35.84
0.1	5.4	0.17	0.13	25.12
0.1	7.5	0.20	0.17	17.20
0.1	13.3	0.26	0.24	8.13
0.15	3.3	0.20	0.15	26.40
0.15	5.4	0.25	0.21	15.92
0.15	7.5	0.29	0.26	10.72
0.15	13.3	0.37	0.35	5.68
0.23	3.3	0.30	0.25	15.63
0.23	5.4	0.36	0.33	7.72
0.23	7.5	0.41	0.39	4.22
0.23	13.3	0.52	0.50	3.85
0.37	3.3	0.46	0.42	9.61
0.37	5.4	0.53	0.50	5.23
0.37	7.5	0.59	0.57	3.39
0.37	13.3	0.69	0.67	2.62

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} &= \frac{1}{\eta} \frac{dp}{dy} \\ \frac{\partial^2 \omega}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \omega}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \omega}{\partial z^2} &= \frac{1}{\eta} \frac{dp}{dz} \end{aligned} \tag{2}$$

where  $u$ ,  $v$  and  $\omega$  are the velocity components and  $p$  is the pressure. To study the molecular diffusion between streams “Species Transport” model is necessary. To know the contribution of the temperature gradient the “thermodiffusion” option is enabled too. Mass transport is formulated in Eq. (3) [14]:

$$\vec{j} = -\rho D \nabla c_0 - \rho D_T c_0 (1 - c_0) \nabla T \tag{3}$$

where  $D$  is the molecular diffusion coefficient and  $T$  is the temperature. For molecular diffusion, not having this property the value of order  $\sim 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  used also in [3] has been chosen. To analyze the effect of thermodiffusion, the properties of the mixture determined experimentally are used. Jointly a temperature difference is imposed between the top and the bottom walls of the dispositive. As the DMSO is the heaviest component and the mixture of 10% of DMSO in PBS has a positive Soret effect, the bottom wall is heated and the top wall cooled. This will boost the DMSO to the washing stream (PBS) enhancing the separation. The chosen working temperature difference is 10 K.

As we analyze different density fluid streams and due to diffusion the density varies, the Boussinesq approximation (Eq. (4)) to account those changes in density is used:

$$\rho = \rho_0 (1 - \alpha(T - T_0) - \beta(c - c_0)) \tag{4}$$

where  $\rho_0$  is the density for 10% of DMSO in PBS. User defined function (UDFs) are written in C++ programming language and are successfully incorporated into the present model to account for the changes in density.

#### 4.2. Boundary conditions

No-slip boundary conditions are imposed at walls, which mean:  $u = v = \omega = 0$ . Outflow 0.5 outlet condition is applied at both outlets in order to have same volumetric flow rate conditions at the outlets.

#### 4.3. Numerical results

Table 2 provides a comparison of results obtained in [3] and those obtained in this study using the Soret effect. Sixteen different cases were analyzed in total. At Table 2 the dimensionless variable dependent on the concentration of the bottom plate is represented  $c_c/c_0$ , where  $c_0$  is the initial mass concentration of DMSO (10%) and  $c_c$  the mass concentration of DMSO in the output. In the same way it is represented a fraction of the inflows, defined in Eq. (5):

$$f_q = \frac{q_c}{q_t} \tag{5}$$

where  $q_c$  is the flow of the mixture DMSO–PBS and  $q_t$  the total input flow. The inlet flow of PBS is  $q_w$  and therefore  $q_t = q_c + q_w$ .

As can be seen, the results of Table 2 show a clear improvement in the separation process by the Soret effect, which can reach up to 35% for a total volumetric flow of  $3,33 \times 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$ . In the same way the results are shown in a neutral diagram (Fig. 5) of the dimensionless variable dependent  $c_c/c_0$  as a function of  $(1/P_e) \times (L/d)$ , where  $P_e$  is the Peclet number, and

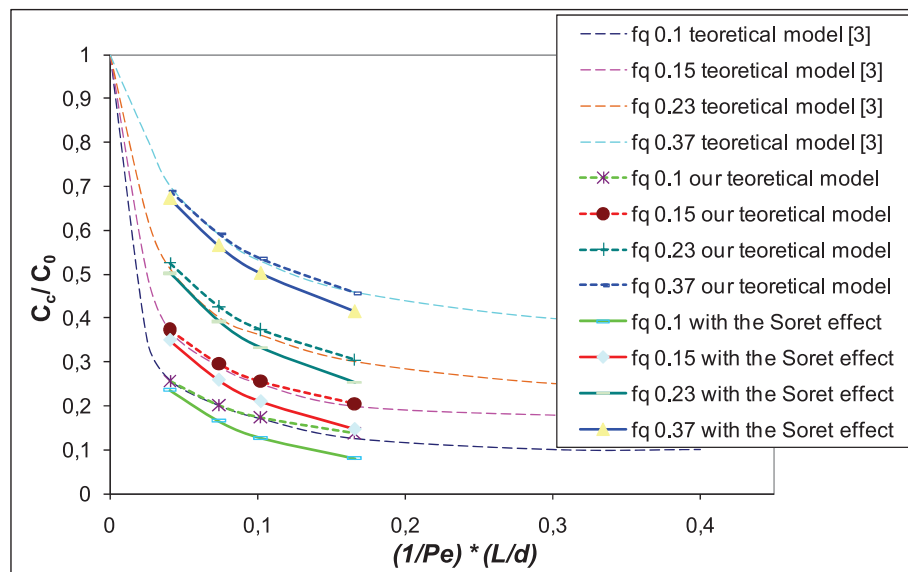


Fig. 5. DMSO extraction fraction  $c_c/c_0$  as a function of  $(1/Pe) \times (L/d)$ .

$L$  and  $d$  are the length and height of the diffusion zone, respectively. The Peclet number is represented as  $Pe = U \cdot d/D$ , where  $U$  is the characteristic velocity. These variables are parameterized by  $f_q$ , where the results of [3] are compared with this work diffusion and Soret effect model.

As shown in Fig. 5, the results obtained for the diffusion model of this work are in well agree with those of [3]. Even the amount of DMSO diffused into the cleaning flow (PBS) is higher due to the temperature gradient applied. As shown in Table 2, the lower the difference between inflows best results are obtained. In the same way, the lower the flow velocity best results are obtained. Thus, for all tested flows an improvement in separation by the Soret effect is achieved.

## 5. Conclusions

This work has highlighted the importance of the transport properties in microfluidics, as well as its applications in biotechnological mixtures. Similarly, it has reflected the importance of experimental data in the numerical study. In this case, we have explored the possibility of the removal of DMSO by molecular diffusion and proposed an improvement by implementing the Soret effect. The results showed an improvement in the process of extracting up to 35%. In this way we can reduce the final size of the device and the extraction time. Therefore, we propose a more efficient and lower cost microdevice due to the decrease in extraction channel length and extraction time.

## Acknowledgements

This study was realized with the grants from the LOCUS project of R+D+I national plan of the Department of Education and Science of the Spanish Government and with GOVSORET, MIVDIRA, DIRAMINA and MICNOFLU projects of the Basque Government.

## References

- [1] J. Köhler, M.T. Henkel, Chip devices for miniaturized biotechnology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69 (2005) 113–125.
- [2] K.K. Fleming, E.K. Longmire, A. Hubel, Numerical characterization of diffusion-based extraction in cell-laden flow through a microfluidic channel, *Journal of Biomechanical Engineering* 129 (2007) 703–711.
- [3] C. Mata, E.K. Longmire, D.H. McKenna, K.K. Glass, A. Hubel, Experimental study of diffusion-based extraction from a cell suspension, *Microfluid. Nanofluid.* 5 (2008) 529–540.
- [4] K.K. Fleming, E.K. Longmire, A. Hubel, Optimization of a microfluidic device for diffusion-based extraction of DMSO from a cell suspension, *International Journal of Heat and Mass Transfer* 51 (2008) 5749–5757.
- [5] J.K. Platten, M.M. Bou-Ali, P. Blanco, J.A. Madariaga, C.J. Santamaria, *Phys. Chem. B* 111 (2007) 11524–11530.
- [6] A. Torreggiani, M. Di Foggia, I. Manco, S.A. Markarian, S. Bonora, Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme: A calorimetric and Raman study, *Journal of Molecular Structure* 891 (2008) 115–122.
- [7] N.H. Chao, C.P. Chiang, H.W. Hsu, C.T. Tsai, T.T. Lin, Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants, *Aquat. Living Resour.* 7 (1994) 99–104.
- [8] V. Antonenas, K. Bradstock, P. Shaw, Effect of washing procedures on unrelated cord blood units for transplantation in children and adults, *Cytotherapy* 4 (2002) 16.
- [9] J.K. Platten, M.M. Bou-Ali, P. Costeseque, J.K. Dutrieux, W. Köhler, C. Leppla, S. Wiegand, G. Wittko, Benchmark values for the Soret, thermal diffusion and diffusion coefficients of three binary organic liquid mixtures, *Philosophical Magazine* 83 (2003) 1965–1971.
- [10] M.M. Bou-Ali, J.J. Valenciga, J.A. Madariaga, C. Santamaria, O. Ecenarro, J.K. Dutrieux, Determination of the thermogravitational coefficient in three binary organic liquid mixtures by the thermogravitational method, *Philosophical Magazine* 83 (2003) 2011–2015.

- [11] M.M. Bou-Ali, O. Ecenarro, J.A. Madariaga, C.M. Santamaría, J.J. Valencia, Thermogravitational measurement of the Soret coefficient of liquid mixtures, *Journal of Physics* 10 (1998) 3321–3331.
- [12] Fluent, Fluent Inc., Version 6.3.26, 2006.
- [13] H. Barrutia, A. Martin, A. Zebib, M.M. Bou-Ali, Thermal diffusion effects in T-shaped micromixers, in: 1st European Conference on Microfluidics, Bologna, 2008.
- [14] S.R. De Groot, P. Mazur, *Non-Equilibrium Thermodynamics*, North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1962.



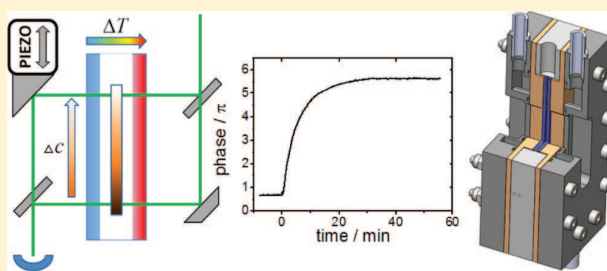
# Development of a Thermogravitational Microcolumn with an Interferometric Contactless Detection System

Philipp Naumann,<sup>†</sup> Alain Martin,<sup>‡</sup> Hartmut Kriegs,<sup>†</sup> Miren Larrañaga,<sup>‡</sup> M. Mounir Bou-Ali,<sup>\*,‡</sup> and Simone Wiegand<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Research Center Juelich, ICS-3 Soft Condensed Matter, 52425 Jülich, Germany

<sup>‡</sup>MGEP Mondragon Goi Eskola Politeknikoa, Mechanical and Manufacturing Department, Loramendi 4, Apdo. 23, 20500, Mondragon, Spain

**ABSTRACT:** We present a new type of thermogravitational (TG) column, a so-called TG microcolumn with transparent windows and a very small sample volume of less than 50  $\mu\text{L}$ . The TG microcolumn has a planar geometry with a thickness of  $0.523 \pm 0.004$  mm, a height of 30 mm, and a width of 3 mm. The concentration difference between two points at different heights is measured with an interferometer using active phase control. From the concentration difference we can determine the thermal diffusion coefficient,  $D_T$ , using the refractive index variation with concentration, which has to be determined independently. We studied the three binary mixtures of dodecane, isobutylbenzene, and 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene with a concentration of 50 wt % at a temperature of 298 K. The thermal diffusion coefficients agree within a few percent with the proposed benchmark values. In addition we investigated also the binary mixture toluene/*n*-hexane and compare the results with literature values. For the investigated mixtures the typical measurement times were between 30 min and 2 h with an applied temperature difference of  $\Delta T = 6$  K.



## INTRODUCTION

One classical method to study the thermal diffusion or thermodiffusion behavior of binary and multicomponent mixtures is the use of a thermogravitational column (TG).<sup>1</sup> Here, a vertical concentration profile develops due to a combination of thermal diffusion and convection. By combining these two effects, the separation ratio increases compared to a method only relying on the thermal diffusion process.<sup>2</sup> To make a precise measurement possible, the experiment needs to be designed carefully to avoid turbulence. The basic principle was first introduced by Clusius and Dickel<sup>3</sup> and has been evolved into different types of columns. Several designs of TG columns, such as annular TGs<sup>1</sup> and vertical parallelepipedic columns with velocity amplitude determination by laser Doppler velocimetry<sup>4</sup> have been successfully validated in a benchmark with other groups and methods. Nowadays, in conventional TGs a fairly large sample volume of 25 mL and more is required,<sup>5</sup> and small samples of the mixture, typically 1.5 mL, are extracted at different heights from the column after the steady state is reached.<sup>6</sup> These samples are analyzed to determine the composition and thus the separation ratio. For ternary mixtures, two additional properties should be determined (such as density and refractive index) in order to deduce the thermal diffusion coefficients.<sup>7,8</sup> With classical TGs an investigation of expensive substances such as biological systems is often not possible due to the relatively large sample volume which is required to measure the refractive index and density from extracted samples with sufficient accuracy.

Therefore, we developed a TG microcolumn with a contactless optical detection system, which works as Mach–Zehnder interferometer. The sample volume is less than 50  $\mu\text{L}$ , so that the investigation of expensive substances or substances which cannot be obtained in large quantities is feasible. Another advantage of the method is the continuous analysis of the concentration profile by measuring the phase difference between two different heights. The possibility to determine the gap width of the microcolumn experimentally once it is mounted is one of the big advantages of our new microcolumn, because the precise knowledge of the width is crucial as the determined thermal diffusion coefficient is proportional to the fourth power of the gap width (eq 5) when calculated from the concentration difference. By use of our optical method,  $D_T$  can directly be determined from the phase difference  $\Delta\phi$  instead of the measured concentration differences as in conventional TG setups. In the resulting working equation for  $D_T$ , the exponent of the gap width reduces to three (eq 6). Therefore, we are less dependent on the precision of fabrication. To validate the new setup, we investigated three binary mixtures of dodecane (DD), isobutylbenzene (IBB), and 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (THN) for a concentration of 50 wt % at a mean temperature of 298 K, which had been used in a benchmark.<sup>9–11</sup> Beside the benchmark systems we investigated also the mixture toluene

**Received:** June 14, 2012

**Revised:** November 5, 2012

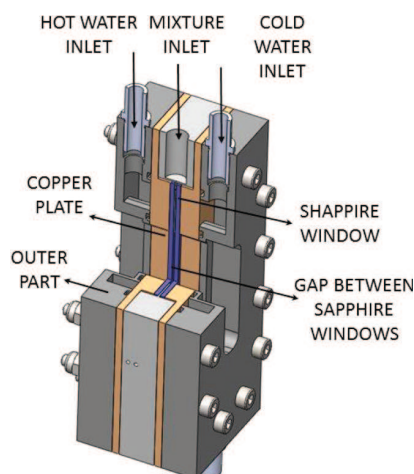
**Published:** November 6, 2012

(TOL)/*n*-hexane (HEX) at 298 K and 50 wt %. This organic mixture has been studied by various groups<sup>12–14</sup> with convective and convective-free methods. In the following we discuss the design, construction, and operation of the microcolumn and the interferometer plus its stability. In the appendix we look into some technical details such as the instant when the temperature gradient is applied and the interferometer is disturbed by temperature inhomogeneities within and close to the column.

## EXPERIMENTAL SETUP

**Materials.** We investigated the three binary mixtures consisting of DD (Aldrich, purity 99%), IBB (Aldrich, purity 99%), and THN (Aldrich, purity 99%) at a mean temperature of 298 K. Additionally, we studied also the binary mixture toluene (Aldrich, purity 99%) and *n*-hexane (Aldrich, purity 99%). All chemicals were used without further purification. The investigated mixtures contained 50 wt % of each component. Each sample has been investigated at least five times.

**Design and Construction of the TG Microcolumn.** The TG microcolumn is composed of two sapphire windows, which are transparent in the visible range of light and have a high thermal conductivity of 34 W/mK at room temperature.<sup>15</sup> The transparency makes it possible to check the cell by eye for defects such as bubbles or dirt. To avoid a distortion of the phase front the material has been cut in the *c* plane (0001). As a thermally insulating gap material we used an advanced polymer material, polyetheretherketone (PEEK), with a very low thermal conductivity of 0.25W/mK,<sup>16</sup> with good chemical resistance and a very low thermal expansion coefficient ( $50 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ ).<sup>17</sup> Figure 1 shows a sketch of the cell. It consists of



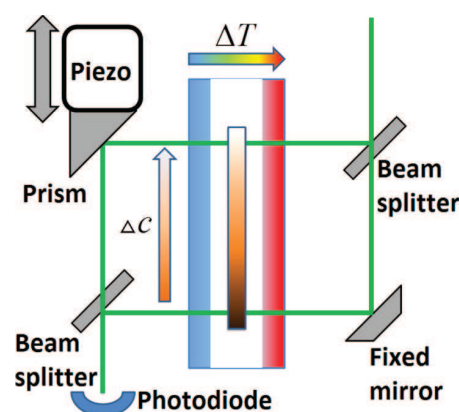
**Figure 1.** A sketch of the composed microcolumn with a cut in the upper part.

two outer parts made of stainless steel with channels for the thermostated water. For better temperature homogeneity two copper plates in good thermal contact with the two sapphire windows are inserted.

The prepared solutions were slowly inserted from below into the TG microcolumn through two bores in the PEEK part by means of a syringe carefully avoiding bubbles. Once the cell was filled, it was closed by Teflon stoppers to avoid evaporation of the mixture.

On each side a thin channel with a length of 14.5 mm and a width of 250  $\mu\text{m}$  is used to fill the gap. These inlets form dead volumes, which influence the concentration difference between the top and the bottom of the gravitational column and will be discussed in the Numerical Simulation section. The dimensions of the TG microcolumn have been mainly determined by the limits of validity of the Furry–Jones–Onsager (FJO) theory,<sup>18</sup> the limitations on the machining process and experimental conditions such as a sufficient separation ratio and equilibration times in the order of several hours for the systems under investigation.<sup>19</sup> These considerations led to a gap width  $L_x = 500 \mu\text{m}$ , a cell height  $L_{\text{total}} = 30 \text{ mm}$ , and a width of  $L_y = 3 \text{ mm}$ , so that the aspect ratio is  $L_{\text{total}}/L_x = 60$ .

**Design and Construction of the Interferometer.** Figure 2 shows a sketch of the interferometer built around the TG



**Figure 2.** Schematic sketch of the interferometer probing the concentration difference at two different heights of the TG microcolumn with a horizontal temperature gradient. The concentration difference results in a phase shift  $\Delta\phi$  of the intensity signal determined by a  $2\pi$  scan of the prism mounted on the piezo stack.

microcolumn. The microcolumn is mounted inside the interferometer which is built up vertically, splitting the source beam in two parallel beams which probe the TG microcolumn at different heights. The positioning of the cell and the beams is done in a way that one beam passes at the lower end of the window and the other at the upper end. Typically the vertical distance of the two beams is adjusted to 22 mm. To measure at other height differences the vertical position of one of the probing beams can be shifted by moving the two opposing optical elements up- or downward. A He–Ne laser (Melles Griot) with a nominal power of 1 mW and a beam width of 1 mm, operating at 543 nm, is used as a beam source. The typical power at the photodiode (Hamamatsu S2386–8K, active diameter 5.8 mm) is 0.25 mW. Thermostated water from two thermostats (Lauda RE-306) flows through two stainless steel plates mounted at the two sides of the TG microcolumn. To achieve homogeneous starting conditions and to determine the initial phase, the water of both thermostats is mixed and both sides are kept at the same temperature. At time  $t_0$  the temperature gradient is applied by separating the flow from both thermostats.

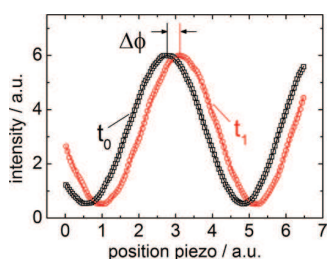
We use a mirror mounted on a piezo stack (PI P-840-10) to control the phase position while measuring. The piezo is ramped with a step rate of 10 kHz so that we determine the phase from a full  $2\pi$  scan 2 times per second. This will yield precise knowledge of the initial and final phase positions,



making the determination of the absolute phase shift more exact than measuring only the intensity. The piezo and the recording of the phase shifts ( $\pi$ ) are controlled by a computer equipped with an interface card (NI PCI-6014).

The beam width of 1 mm is quite broad compared to the distance between the two probing beams, and the question is whether this will influence the measurements. We can do the following *Gedankenexperiment* by splitting artificially an arbitrary narrow laser beam in one center beam and two *edge beams*, one below and one above the center beam. The vertical concentration profile in the cell is linear, so that the phases of the *edge beams* are shifted by the same amount but in different directions. The resulting *interfering beams* show equal phase shifts stemming from the center and the edges. The relative large area of the photodiode averages over the *beams* recording the same phase as the *center beam* with a slightly lower contrast. Because of the fact that we determine the concentration change by measuring the phase difference, the influence on the measurement should be small as long as the concentration profile is linear over the beam width. In our case the concentration profile is even linear over the entire cell height so there is no influence on the measured phase.

**Interferometric Measurement.** In an interferometer the intensity varies when the relative phase between the two beams changes. In a simple analysis the phase change can be measured by counting the number of minima and maxima of the varying intensity. To achieve a higher resolution than  $\pi$  the current intensity can be compared to the intensity extrema. This simple method relies on the intensity stability. Therefore, we added an active phase control to our interferometer to achieve a higher precision and reliability. We change the optical path length of one of the beams with a mirror mounted on a piezo and record the modulated intensity (c.f. Figure 3). The resulting intensity



**Figure 3.** Sketch of the active phase control mechanism. Two intensity scans recorded at two different times  $t_0$  and  $t_1$  (squares and circles) and the fitted sinusoidal curves. The phase shift  $\Delta\phi$  is caused by concentration changes.

is fitted to a sinusoidal function which gives a phase value. The curves shown in Figure 3 correspond to the starting time  $t_0$  and a later time  $t_1$ . Because of a relative phase shift between the two beams, the signal at  $t_1$  is shifted by  $\Delta\phi$  to the right. This full  $2\pi$  scan takes less than 1 s and is therefore much faster than the expected concentration changes in the microcolumn. We can analyze the phase change by using the forward and the backward movement of the piezo. Both scans give the same phase behavior except for a constant offset caused by the known hysteresis effect of piezos. The interferometer with active phase control is less sensitive to intensity fluctuations caused by mechanical disturbances, and we do not need the reference information about the actual intensity extrema to be measured in advance.

**Characterization of the Cell.** The gap width of the microcolumn has been determined with a microscope setup, focusing a probing beam onto the surface and detecting the reflected signal. The objective used (10× Mitutoyo) has a long working distance of 33.8 mm and a very small focus depth of  $3.58 \mu\text{m}$ . A principle sketch of the setup is shown in Figure 4a. When the beam is focused on an interface, the reflected beam forms a sharp focused spot and the intensity is on its local maximum. We record the focus shift from the first window-cell interface to the second via an elevator stage. The precision of the height reading is better than  $0.5 \mu\text{m}$ . With this method we determined the average cell thickness to be  $523 \mu\text{m}$  with an uncertainty of  $4 \mu\text{m}$ . The roughness of the inner walls is smaller than the uncertainty.

## THEORETICAL APPROACHES

**Determination of the Phase Shift due to Concentration.** As sketched in Figure 2 we are probing the relative phase difference along the TG microcolumn at two different heights. The phase  $\phi$  between the two beams corresponds to their optical path lengths  $s_{\text{top}}$  and  $s_{\text{bottom}}$  inside the column gap via

$$\phi = k(s_{\text{top}} - s_{\text{bottom}}) \quad (1)$$

with the wave vector  $k = (2\pi)/\lambda$  and  $\lambda$ , the wavelength of the laser, assuming a perfectly frequency stable laser. A change in the optical path lengths,  $\Delta s_{\text{top}}$  and  $\Delta s_{\text{bottom}}$  at the top and bottom, respectively, leads to a change in the phase  $\Delta\phi$

$$\Delta\phi = k(\Delta s_{\text{top}} - \Delta s_{\text{bottom}}) \quad (2)$$

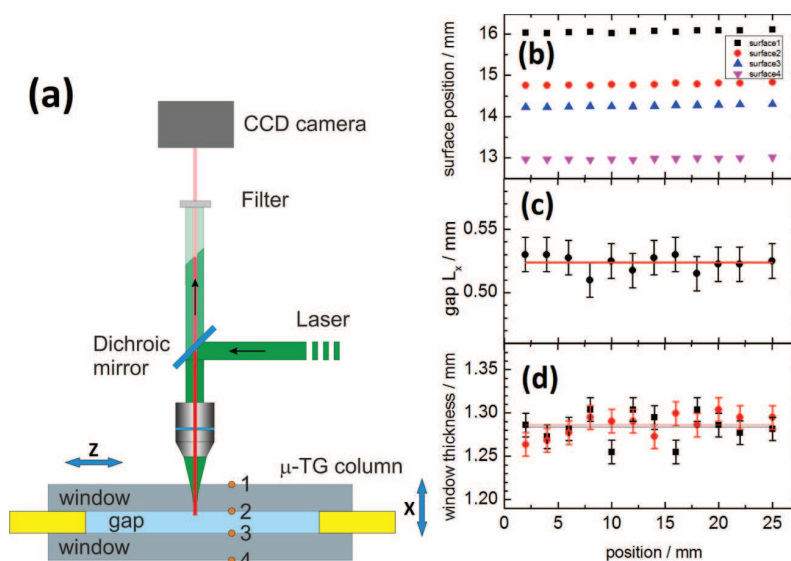
We assume here that the change in refractive index along the column in vertical direction depends only on the concentration difference between top and bottom beam positions. Supported by the simulations we suppose that the temperature changes linearly over the gap). Therefore, the mean temperature is in the middle of the gap, and it is a constant as function of the height. Looking at the horizontal variation of the refractive index we have on the warm side a slightly lower refractive index compared to the middle and at the cold side a slightly higher refractive index compared to the middle. Because of the linearity of the temperature the averaged refractive index probed by the laser beam corresponds to the value in the middle, which is constant over the height of the cell. Therefore we consider that all observed changes in the refractive index are due to concentration changes. Since the change of the optical path results from the change in refractive indices,  $\Delta n_{\text{top}}$  and  $\Delta n_{\text{bottom}}$  at the top and bottom, respectively, one can write

$$\Delta\phi = kL_x(\Delta n_{\text{top}} - \Delta n_{\text{bottom}}) = kL_x\Delta n \quad (3)$$

$$\Leftrightarrow \Delta n = \Delta\phi(kL_x)^{-1}$$

with the gap width  $L_x$  and the refractive index difference  $\Delta n$  between top and bottom. Additionally, we neglect the phase changes between the top and bottom beam caused by refractive index change and thermal expansion of the sapphire windows (c.f. Figure 1) and the air around the cell due to the temperature gradient, since both beams are affected in the same way. Dividing both sides of (eq 2) by  $\Delta c$  and replacing  $\Delta n/\Delta c$  with  $(\partial n/\partial c)_{p,T}$  we obtain an expression for  $\Delta c$

$$\Delta c = \frac{1}{kL_x} \left( \frac{\partial n}{\partial c} \right)_{p,T}^{-1} \Delta\phi \quad (4)$$



**Figure 4.** Optical tweezers setup to determine the position of the sapphire surfaces. The cell can be moved in the  $x$ - and  $z$ -directions on a micrometer stage. (b) Position of the different surfaces along the cell. (c) The calculated gap width and the width of the (d) sapphire windows as function of the cell height.

The refractive index increment  $(\partial n/\partial c)_{p,T}$  can be determined independently. Furthermore, we would like to point out that due to continuous observation of  $\Delta\phi$  also phase differences larger than  $2\pi$  can be detected.

**Determination of the Concentration Change.** We use the FJO theory<sup>18,20</sup> to calculate the concentration difference at the steady state at two points separated by  $L_z$  to

$$\Delta c = 504 \frac{\nu}{\alpha g} D_T c_0 (1 - c_0) \frac{L_z}{L_x^4} \quad (5)$$

where  $c_0$  is the initial mass fraction concentration of the reference component,  $\nu$  is the kinematic viscosity,  $\alpha$  is the thermal expansion coefficient,  $L_z$  is the vertical distance between the probing laser beams (22 mm),  $D_T$  the thermal diffusion coefficient, and  $g$  the gravity acceleration. In the derivation it is used that the initial concentration  $c_0$  changes only slightly, so that  $D_T$  and also  $D$  can still be treated as a constant. This assumption might break down, if large concentration changes occur. Combining eqs 4 and 5 gives the thermal diffusion coefficient

$$D_T = \frac{1}{504} \frac{\alpha g}{k\nu} \frac{1}{c_0(1 - c_0)} \frac{L_x^3}{L_z} \left( \frac{\partial n}{\partial c} \right)_{p,T}^{-1} \Delta\phi \quad (6)$$

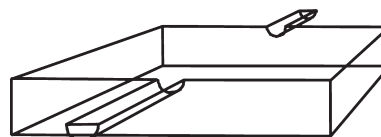
Because of the fact that we do have a method which measures the phase continuously, we might also look at the temporal behavior of the transient concentration difference. This is given by<sup>21</sup>

$$\Delta c = \Delta c_\infty (1 - ae^{-t/t_r}) \quad (7)$$

It needs to be pointed out that eq 7 is only satisfied for times  $t$  larger than one-third of the relaxation time  $t_r$ , because it corresponds only to the first term of an infinite series. Another shortcoming of eq 7 is that an ideal infinitely sharp switching of the temperature gradient is assumed, which practically cannot be achieved. In the future we will develop an experimental procedure to obtain the molecular diffusion coefficient from the transient signal.

## NUMERICAL SIMULATIONS

**Numerical Validation of the TG Microcolumn.** To validate the proposed geometry for the TG microcolumn, a numerical study using ANSYS-Fluent software<sup>22</sup> is made. The simulations are performed using a finite volume (illustrated in Figure 5) method in 3D (FVM) based on fluid flow solutions under the assumption of an incompressible fluid and laminar flow under atmospheric pressure.



**Figure 5.** A sketch of the cell volume including the considered dead volumes, which are used for filling the microcolumn.

The model covers the Fickian mass, the thermal diffusion, and the Navier–Stokes equation, whereas the density changes in the fluid with concentration and temperature are covered by the Boussinesq approximation<sup>23</sup>

$$\rho = \rho_0 (1 - \alpha(T - T_0) + \beta(c - c_0)) \quad (8)$$

where  $\rho$  is the local density of the mixture,  $\rho_0$  is the density of the homogeneous mixture,  $T_0$  is the mean temperature,  $\alpha = -(1/\rho)(\partial\rho/\partial T)_{p,c}$  is the thermal expansion coefficient and  $\beta = +(1/\rho)(\partial\rho/\partial c)_{p,T}$  is the mass expansion coefficient. The value of the mass and thermal expansion coefficient are experimentally determined.<sup>24</sup> We used no-slip boundary conditions and applied a constant temperature gradient of 5 K perpendicular to the gravity field.

The governing equations are solved using a pressure-based implicit simple velocity-pressure coupling scheme with a double-precision module. The second-order numerical discretization scheme is used for pressure, density, momentum, and mass flux to avoid numerical instabilities. The iterative convergence criteria is set to  $10^{-9}$  for all solution variables.



For the preprocessing of the geometry Gambit<sup>25</sup> is used, where the geometry of the gap ( $523 \mu\text{m} \times 3 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$ ) was defined. This 3D computational domain consists of non-uniformly spaced hexahedral mesh cells. A very fine mesh resolution was used with 720 000 hexahedral cells to have a realistic representation of the concentration gradients.

**Simulation Results.** For the numerical validation of the microcolumn, the TG effect in the steady state is analyzed using a reference mixture TOL/HEX at a mass fraction of 0.5167 and at  $T = 298 \text{ K}$ . Table 1 lists the parameters for the TOL/HEX

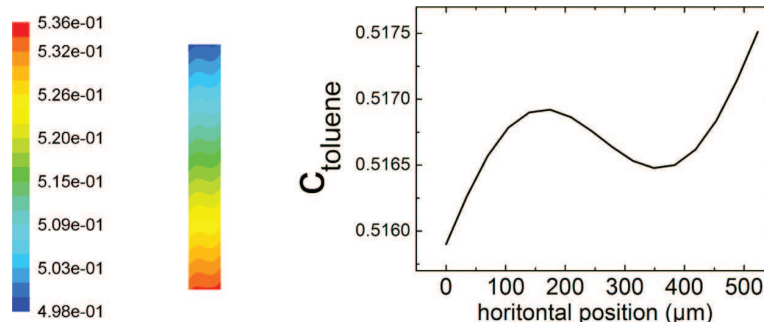
**Table 1. Experimental Density,  $\rho_0$ , Dynamic Viscosity,  $\mu$ , Mass Expansion Coefficient,  $\beta$ , and the Thermal Diffusion Coefficient,  $D_T$ , for the Mixture TOL/HEX with a Mass Fraction of 0.5167 at  $T = 298 \text{ K}$  Used in the Numerical Simulation**

$\rho_0/\text{kg/m}^3$	$\mu/\text{Pa}\cdot\text{s}$	$\alpha/\text{K}^{-1}$	$\beta$	$D_T/10^{-12} \text{ m}^2/\text{sK}$	$D/10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
748.19	3.861	1.23	0.275	13.7 [ref 13]	2.78 [ref 13]
				13.2 [ref 14]	2.85 [ref 12]
				14.0 [ref 12]	

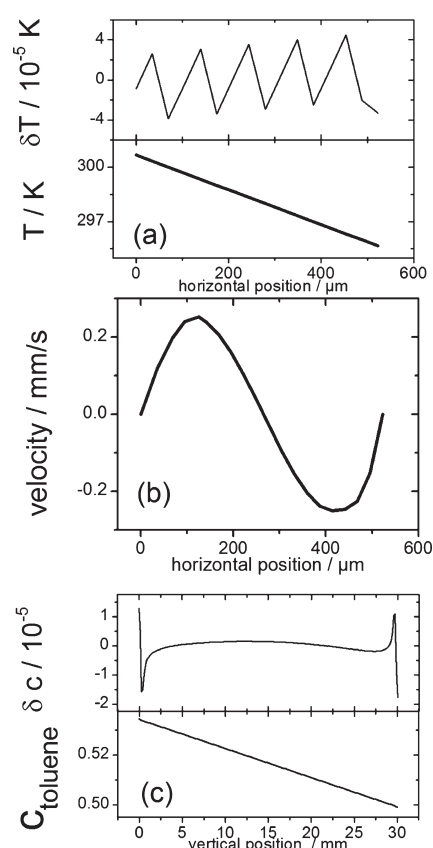
mixture. Köhler and Müller measured only at  $T = 296 \text{ K}$  and higher temperatures so that  $D_T$  and  $D$  at  $T = 298 \text{ K}$  have been obtained by linear interpolation.<sup>12</sup>

For the TOL/HEX mixture with  $c_0 = 0.5167$  the steady state temperature, velocity, and concentration profiles obtained from numeric simulations are shown in Figure 6 and Figure 7. Figure 7a shows the temperature profile within the gap which decays linearly from the warm to the cold side. Figures 6 and 7b show the velocity and the toluene concentration profiles inside the gap at the midheight of the microcolumn at 15 mm. The velocity (c.f. Figure 7b) has a cubical profile while the concentration profile (c.f. Figure 6) has to be described by a polynomial of the fifth order. Figure 7c shows the distribution of the concentration referring to the densest component (TOL) in the stationary state. Along the microcolumn the results show an increase in the concentration of the densest component (TOL) in the lower and of the lightest component (HEX) in the upper parts of the column. The profiles obtained in the microcolumn are those predicted by the TG theory.<sup>26,27</sup>

Table 2 summarizes the results of numerical simulation and compares the concentration difference and the thermal diffusion coefficient in the steady state with the experimental values. The simulation results agree within a few percent with the experimental values and the mean experimental value agrees within 1%. The excellent agreement between the simulation



**Figure 6.** Numerical simulation results of the toluene mass fraction profile in the binary mixture TOL/HEX. The left figure shows the profile over the entire height of the microcolumn. The right figure is a plot of the concentration profile at a height of 15 mm at the stationary state.



**Figure 7.** Numerical simulation results for the binary mixture TOL/HEX at the stationary state. (a) Temperature profile within the microcolumn gap. The upper part shows the deviations from a linear fit. (b) Velocity profile within the microcolumn gap at a height of 15 mm. (c) The vertical concentration distribution profile of the TOL mass fraction in the middle of the gap along the microcolumn. The upper part shows again the deviations from a linear fit.

results and the experimental values shows that the design fulfills the conditions of the FJO theory.

Additionally, we analyzed numerically the effect on the concentration difference probably caused by dead volumes at the inlet and outlet. The considered dead volumes are in the order of  $3.625 \mu\text{L}$  stemming from two channels with a diameter of  $250 \mu\text{m}$  and  $14.5 \text{ mm}$  in length. Figure 5 shows the model used. As shown in Table 3, the obtained concentration difference from the simulation  $\Delta c_{\text{fluent}}$  agrees within 1% with

**Table 2.** Comparison between Experimental and Numerical Simulation Results of the Stationary Separation under the TG Effect for the New Design of the Microcolumn with the Mixture TOL/HEX with a Mass Fraction of 0.5167<sup>a</sup>

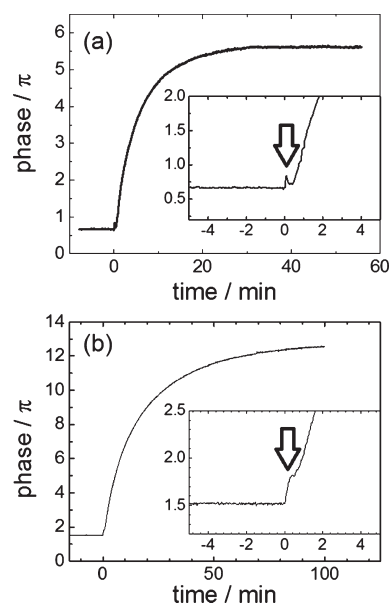
$L_z$ / mm	$\Delta c$ (eq 5)	$\Delta c_{\text{fluent}}$	dev/ %	$D_{T,\text{exp}}/$ $10^{-12} \text{ m}^2/\text{sK}$	$D_{T,\text{num}}/$ $10^{-12} \text{ m}^2/\text{sK}$	dev/ %
30	0.0295	0.0297	<1	13.63	13.74	<1
22	0.0216	0.0218	<1	13.63	13.76	<1

<sup>a</sup> $D_T$  is the average of the individual literature values listed in Table 1.

the calculated concentration difference  $\Delta c$  (eq 5). The determined thermal diffusion coefficients for TOL/HEX, THN/IBB, IBB/DD, and THN/DD mixtures at a mass fraction of 50% at  $T = 298 \text{ K}$  agree also within a few percent with the simulation results obtained for a gap of  $523 \mu\text{m}$  including the dead volume effect.

## RESULTS AND DISCUSSION

Figure 8 shows a typical time development of the phase for the system TOL/HEX and THN/DD at an average temperature of  $T = 298 \text{ K}$  and a temperature difference of  $\Delta T = 6 \text{ K}$  over the gap of the cell. At time  $t = 0$  the temperature gradient is applied while at earlier times both sides of the cell are kept at an average mixing temperature,  $T_{\text{mix}}$  which leads to a constant phase after some settling time of the order of an hour. Once the temperature gradient is applied, the phase shows an exponential increase until it reaches a plateau value. The phase difference is determined by the difference of the plateau value in the steady state and the phase at the baseline before switching on the temperature gradient. In all our experiments this phase change in the jump was of the order of  $0.2 \pi$ , and its origin will be discussed in the Appendix. The so-determined phase difference is used in eq 6 to calculate the thermal diffusion coefficient,  $D_T$ . The obtained values for the four systems are listed in Table 4 and shown in Figure 9 in comparison with literature values. For most of the systems the deviations are below or around 6%. The absolute uncertainty was below  $0.6 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . With this new TG microcolumn design in combination with the interferometric detection with one wavelength we surrender a strong point of the TGs, namely, the investigation of ternary mixtures. In addition we employ very small sample volume of less than  $50 \mu\text{L}$ , with similar measurement times compared to the conventional TGs of 30 min up to 2 h for the investigated mixtures. Both the design and the measurement system developed in this work for the new TG microcolumn installation is well suited for biological systems. The transparent windows of the TG microcolumn have several advantages. First, a precise determination of the gap width over the entire height of the TG microcolumn is possible. This is especially important, because the thermal diffusion coefficient,  $D_T$  depends on the gap width to the power of three (c.f., eq 6) for our optical system. So far we have only studied organic



**Figure 8.** (a) Typical experimental results for phase shift between top and bottom for the mixture TOL/HEX and (b) THN/DD with a mass weight fraction of 50% as function of time. The time base has been chosen in such a way that at time zero the temperature gradient has been enabled. The inset shows the phase close to the turn-on time. The origin of the fast jump in the signal will be discussed in detail in the Appendix.

**Table 4.** Thermal Diffusion Coefficients Determined for Four Binary Mixtures with 50 wt %<sup>a</sup>

mixture	$D_T/$ (this work) $10^{-12} \text{ m}^2/\text{sK}$	$D_T/$ (literature) $10^{-12} \text{ m}^2/\text{sK}$	dev/ %
TOL-HEX	$13.0 \pm 0.35$	13.6 [avg]	-0.44
THN-DD	$5.87 \pm 0.23$	5.9 [ref 9]	-0.50
THN-IBB	$2.63 \pm 0.01$	2.8 [ref 9]	-6.07
IBB-DD	$3.91 \pm 0.15$	3.7 [ref 9]	+5.68

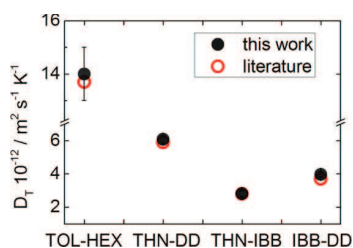
<sup>a</sup>All measurements have been performed at 298 K. The error is the variance of the mean from five individual measurements.

mixtures, but the setup should also work for aqueous solutions. Because of the higher surface tension of water, special care needs to be taken in order to avoid air bubbles in the cell. Another nice feature of the TG microcolumn is that we can monitor the concentration change as function of time. In principle it should therefore also be possible to determine the diffusion constant  $D$  in the same setup. In the present design, however, we were not able to obtain sufficiently accurate values for  $D$ . The largest problem is the uncertainty in  $\Delta T$ , which needs to be obtained at the inside of the sapphire windows. We hope that we can analyze in the near future the time dependence of the concentration to obtain also the Soret

**Table 3.** Experimental and Numerical Results for the Investigated Binary Mixtures at  $T = 298 \text{ K}$  and a Mass Fraction of  $c = 0.5$ <sup>a</sup>

mixture	$\Delta c$ (eq 5), $L_z = 22 \text{ mm}$	$\Delta c_{\text{fluent}}$ , $L_z = 22 \text{ mm}$	dev/%	$D_{T,\text{exp}}/10^{-12} \text{ m}^2/\text{sK}$	$D_{T,\text{sim}}/10^{-12} \text{ m}^2/\text{sK}$	dev/%
TOL-HEX	0.0213	0.0214	0.47	13.6 [avg, ref 12–14]	13.56	-0.29
THN-DD	0.0451	0.0453	0.44	5.90 [ref 9]	5.93	0.50
THN-IBB	0.0180	0.0177	-1.66	2.80 [ref 9]	2.78	-0.71
IBB-DD	0.0207	0.0206	-0.48	3.70 [ref 9]	3.68	-0.54

<sup>a</sup>In all simulations the dead volume caused by the inlet and the outlet has been considered.



**Figure 9.** The thermal diffusion coefficient,  $D_T$ , for the four studied systems in comparison with literature values. The largest absolute deviations are found for the system TOL/HEX, while the largest relative deviation of around 6% is found for the system THN-IBB.

coefficient,  $S_T$ , but this might also require a more sophisticated model for the data analysis.

Compared to other optical detection methods such as thermal diffusion forced Rayleigh scattering (TDFRS)<sup>28,29</sup> or beam deflection (BD)<sup>10,30</sup> the sample volume of 50  $\mu\text{L}$  is very small. The equilibration times are comparable with BD but much slower than in the TDFRS experiments. One drawback of the method is that we are not capable to determine also the diffusion coefficient  $D$  using eq 7, because the experimental data show systematic deviations from a simple exponential function. The operating expenses are much lower than in the case of the TDFRS and comparable with the BD. This method might open up other possibilities by combining it with a microscope and fluorescent detection methods. This new method will also be useful for further benchmark campaigns as a convective method in combination with optical detection.

In conclusion we can state that the TG microcolumn is a nice compact device which allows reliable, contactless measurements of the thermal diffusion coefficient,  $D_T$ . The typical deviations from the literature values found are in the order of 5% (c.f., Table 4), which is comparable with the deviation found in the benchmark.<sup>9</sup>

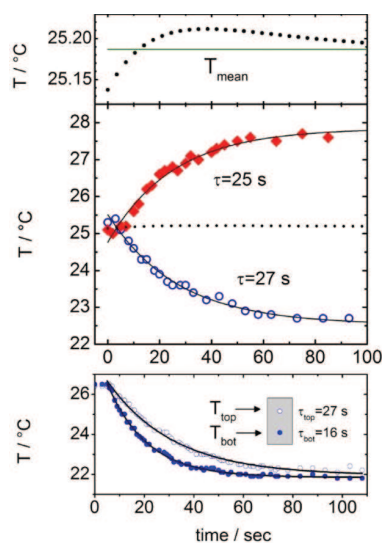
## APPENDIX

As mentioned in the Results and Discussion section we observe always a fast phase jump shortly after switching on the temperature gradient. In the following section we will discuss this issue and will relate it to a slight asymmetry in the formation of the temperature gradient.

### Characterization of the Temperature Switching

Before the measurement starts, we mix the water of the two thermostats, which are kept at different temperatures  $T_{\text{cold}}$  and  $T_{\text{warm}}$ . We adjust the flows of the two thermostats so that the temperature of the mixed water corresponds to the average of the two temperatures  $T_{\text{mean}} = 0.5(T_{\text{cold}} + T_{\text{warm}})$ . Practically, small deviations of the order of  $\Delta T = 0.1$  K are detected. This leads to a small temperature difference to the mean temperature,  $T_{\text{mean}}$ , of the cell prior the temperature gradient and causes a small horizontal asymmetry in the  $(\partial n / \partial T)_{p,T}$  contributions. If the thickness of the gap and the windows between top and bottom are equal, this affects top and bottom in the same way, so that changes in the phases should cancel.

Figure 10 shows the temperatures on the cold and warm sides as a function of time after the temperature gradient has been switched on. The temperatures have been measured with an infrared camera (FLIR T400) at the surface of the sapphire windows, which has been covered with a 100- $\mu\text{m}$  Teflon foil to avoid reflections. Because of the insulation of the Teflon foil the temperature reading will be a bit lower compared to the



**Figure 10.** Top: temperature at the outside of the sapphire windows at the two sides (warm side, filled diamonds; cold side, open circles) of the TG microcolumn filled with toluene as function of time measured by means of an infrared camera. The upper graph shows that due to different time constants for the warm and the cold side there is a small overshoot in the mean temperature (small dots) as function of time. Bottom: development of the temperature at the bottom and at the top of the cell measured at the covered metal surface. The temperature equilibrates at the bottom of the cell much faster than at the top, so that for a short time a vertical temperature gradient in the order of 0.2–0.3 K is established. The solid lines are exponential fits with time constants given in the graph.

temperature at the outside of the sapphire window, but this will affect both sides in the same way. Also the surrounding metal parts have been taped to prevent reflections at the metal surfaces, which could influence the temperature reading. Figure 10 shows the time development of the temperatures on the warm and cold side, which can be described by an exponential increase and decrease, respectively. Typical time constants of an exponential fit to reach the final values  $T_{\text{cold}}$  and  $T_{\text{warm}}$  are 27 and 25 s, respectively, indicating that heating is slightly faster than cooling. This leads as in the upper graph of Figure 10 shown to a slight overshoot of the average temperature,  $T_{\text{mean}}$ . But this effect will also influence the top and the bottom in the same way so that those contributions cancel.

By thermal analysis with the infrared camera, we have seen that during the initial state of applying the temperature gradient the temperature propagates from the bottom to the top, which means that the final temperature at the bottom is reached earlier compared to the top. The lower graph of Figure 10 shows the temperature at the top and bottom measured at the metal surface of the cell. Because of the small window of a width of 3 mm we were not able to obtain reliable measurements at two different height positions directly at the sapphire windows. As seen in the figure the time constants between top and bottom differ substantially. Typical exponential time constants at the bottom and at the top of the cell are 16 and 27 s, respectively. This is indeed a problem of the present setup and leads to phase shift between the bottom and the top present in the beginning of the experimental phase curves. This difficulty can be solved by using a cross-flow in the microcolumn similar to the circulating

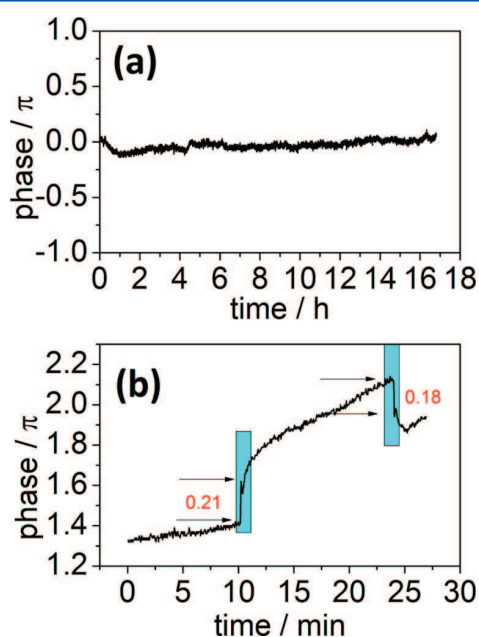


water loops used by Zhang et al.<sup>13</sup> or by imaging the phase profile over the entire height.

### Stability and Response of the Interferometer

The precision of the setup depends strongly on the stability of the interferometer. The drift should be very small over the measurement time. A typical measurement time is of the order of 30 minutes to 2 h depending on the system. A small drift has little influence and can be subtracted from the measured signal. To achieve a very small drift, we have to insulate the laser beam paths from temperature changes by insulating the cell and the tubes. This will reduce the effect but not cancel it out completely. The interferometer mirrors are mounted on vertical pillars. Care needs to be taken to have stable temperature conditions taking into account heat sources and fluctuations.

A typical example for the time dependence of pure THN is shown in Figure 11b. At short times when no temperature



**Figure 11.** (a) Phase drift as function of time. After equilibration within the first hour, the phase drifts with a rate  $0.0064 \pi/\text{h}$ . This corresponds to a drift of less than  $0.02 \pi$  for a measurement time of 3 h, which results for IBB/THN, the system with the weakest measurement signal, in a relative error of 1%. (b) Phase response in pure THN, when the temperature gradient is switched on and off, respectively.

gradient is applied, we observe a constant drift of the phase. After 10 minutes a temperature gradient is applied, and the phase changes rapidly within a minute and approaches then a constant drift rate. When the temperature gradient is switched off, we observe the reverse behavior. A similar jump occurs also in the empty cell and during the regular measurements and is always in the order of  $0.2\pi$ . Therefore, we assume that it is related to an asymmetry in the setup, but the reason is not fully understood. In the last section we discussed a small vertical temperature gradient and the temporal change of the mean temperature in Figure 11b and the top portion of Figure 10, respectively. The maximal temperature difference between top and bottom is of the order of  $0.2\text{--}0.3 \text{ K}$ ; with a typical  $(\partial n/\partial T)_{p,c} = 5 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$ , we obtain a phase shift of the order of  $0.2\pi\text{--}0.3\pi$ , which corresponds to the typical observed values of

$0.2\pi$ . On the other hand it is also possible that the two beams are slightly deflected leading to a shift of the interference pattern, which results then into an intensity change. We want to clarify this issue in the future by comparing different microcolumns.

### AUTHOR INFORMATION

#### Corresponding Author

\*E-mail: mbouali@mondragon.edu (M.M.B.-A.); s.wiegand@fz-juelich.de (S.W.).

#### Notes

The authors declare no competing financial interest.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jan Dhont for his constant interest and many helpful discussions. Special thanks to Axel Ackens, who lent the infrared camera to us. We thank also Christoph July and Peter Lang for the use of their tweezers setup for the determination of the cell thickness and we show our gratitude to Michael Klein for a first outline of the interferometer. The Jülich group acknowledges financial support due to the DAAD PPP program and the Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant Wi 1684. The MGEP group thanks the TEDIBIO integrated action project (No. DE 2009-0024) and LOCUS2 (No. BIO2011-30535-C04-04) project from the Spanish Government, as well as the GOVSORET3 (No. PI2011-22), MIDIAG project, and the project of Fluids Mechanics Groups (IT557-10) of the Basque Country Government.

### REFERENCES

- (1) Bou-Ali, M. M.; Valencia, J. J.; Madariaga, J. A.; Santamaria, C.; Ecenarro, O.; Dutrieux, J. F. *Philos. Mag.* **2003**, *83*, 2011–2015.
- (2) Platten, J. K.; Bou-Ali, M. M.; Dutrieux, J. F. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11763–11767.
- (3) Clusius, K.; Dickel, G. *Naturwissenschaften* **1938**, *26*, 546–546.
- (4) Platten, J. K.; Bou-Ali, M. M.; Dutrieux, J. F. *Philos. Mag.* **2003**, *83*, 2001–2010.
- (5) Blanco, P.; Bou-Ali, M. M.; Platten, J. K.; de Mezquia, D. A.; Madariaga, J. A.; Santamaria, C. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 114506 1–6.
- (6) Dutrieux, J. F.; Platten, J. K.; Chavepeyer, G.; Bou-Ali, M. M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 6104–6114.
- (7) Bou-Ali, M.; Platten, J. K. *J. Non-Equil. Thermody.* **2005**, *30*, 385–399.
- (8) Leahy-Dios, A.; Bou-Ali, M. M.; Platten, J. K.; Firoozabadi, A. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 234502 1–12.
- (9) Platten, J. K.; Bou-Ali, M. M.; Costeseque, P.; Dutrieux, J. F.; Köhler, W.; Leppla, C.; Wiegand, S.; Wittko, G. *Philos. Mag.* **2003**, *83*, 1965–1971.
- (10) Königer, A.; Meier, B.; Köhler, W. *Philos. Mag.* **2009**, *89*, 907–923.
- (11) Mialduna, A.; Shevtsova, V. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 044524 1–12.
- (12) Köhler, W.; Müller, B. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 4367–4370.
- (13) Zhang, K. J.; Briggs, M. E.; Gammon, R. W.; Sengers, J. V. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 6881–6892.
- (14) Bou-Ali, M. M.; Ecenarro, O.; Madariaga, J. A.; Santamaria, C. M.; Valencia, J. J. *J. Phys.: Condens. Matter* **1998**, *10*, 3321–3331.
- (15) Burghartz, S.; Schulz, B. *J. Nucl. Mater.* **1994**, *212*, 1065–1068.
- (16) Choy, C. L.; Kwok, K. W.; Leung, W. P.; Lau, F. P. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1994**, *32*, 1389–1397.
- (17) Choy, C. L.; Leung, W. P. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1990**, *28*, 1965–1977.
- (18) Furry, W. H.; Jones, R. C.; Onsager, L. *Phys. Rev.* **1939**, *55*, 1083–1095.
- (19) Martin, A.; Bou-Ali, M. M.; Gandarias, E.; Aristimuño, P.; Wiegand, S. EP12382015, Europe, 2012.

- (20) Majumdar, S. D. *Phys. Rev.* **1951**, *81*, 844–848.
- (21) Valencia, J. J.; Bou-Ali, M. M.; Platten, J. K.; Ecenarro, O.; Madariaga, J. M.; Santamaria, C. M. *J. Non-Equil. Thermody.* **2007**, *32*, 299–307.
- (22) *Ansys Inc*; Ansys-Fluent 13.0, Lebanon, USA, 2010.
- (23) Platten, J. K.; Chavepeyer, G. *Int. J. Heat Mass Transf.* **1976**, *19*, 27–32.
- (24) Blanco, P.; Bou-Ali, M. M.; Platten, J. K.; Urteaga, P.; Madariaga, J. A.; Santamaria, C. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129* (174504), 1–6.
- (25) *Ansys Inc*; Gambit 2.4.6, Lebanon, USA, 2010.
- (26) Valencia, J.; Bou-Ali, M. M.; Ecenarro, O.; Madariaga, J. A.; Santamaria, C. M. *Thermal Nonequilibrium Phenomena in Fluid Mixtures* **2002**, *584*, 233–249.
- (27) Madariaga, J. A.; Santamaria, C.; Barrutia, H.; Bou-Ali, M. M.; Ecenarro, O.; Valencia, J. *J. Cr. Mecanique* **2011**, *339*, 292–296.
- (28) Köhler, W.; Rossmannith, P. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 5838–5847.
- (29) Wiegand, S.; Ning, H.; Kriegs, H. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 14169–14174.
- (30) Kolodner, P.; Williams, H.; Moe, C. *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 6512–6524.