

Diseño y construcción de una estación de ultrafiltración para separación de proteínas

Design and manufacture of an ultrafiltration unit for protein purification

Camilo Durán Correa, MSc*
Lorenza María Jaramillo Gómez, MSc*

Univ Odontol 2006 Jun-Dic; 25(57):41-48

RESUMEN

La separación de moléculas se puede realizar basándose en diferentes características propias. Dentro de los procesos que se utilizan para este propósito están la extracción química, la cromatografía, la electroforesis, la ultracentrifugación y la ultrafiltración. La ultrafiltración logra la separación de los elementos de una muestra mediante el uso de membranas semipermeables con un tamaño de poro específico permitiendo que los elementos contenidos en un solvente apropiado sean mantenidos dentro del medio o eliminados del mismo dependiendo del tamaño de la molécula y el tamaño del poro de la membrana de filtración. Para poder aplicar esta técnica se necesita un cartucho de ultrafiltración, una bomba peristáltica, un agitador magnético, un reservorio para la muestra y dos manómetros. Resumiendo, la muestra se coloca dentro del reservorio y con una bomba peristáltica

se impulsa hacia el interior del cartucho de filtración dentro del cual la membrana cumple con su función. La bomba peristáltica emplea rodillos que presionan una manguera elástica sobre una superficie dura moviendo la solución en ella contenida sin contaminarla. El agitador homogeneiza la solución que se mantiene circulando entre el reservorio y el cartucho. El objetivo del proyecto fue construir una estación de ultrafiltración para separación de proteínas que consta de: bomba peristáltica, agitador magnético y reservorio (que incluye los controles de presión y los conectores para el cartucho de filtración), para con ella ayudar en la purificación de BMP7 de dentina humana. La estación cumplió con el propósito mencionado.

PALABRAS CLAVE

Ultrafiltración, separación de proteínas, bomba peristáltica, agitador magnético tamaño molecular.

ABSTRACT

Molecule separation can be done on the base of different individual characteristics. Some of the processes used for this purpose include chemical extraction, chromatography, electrophoresis, ultracentrifugation and ultrafiltration. Ultrafiltration separates the different elements in a sample solution by means of a semi permeable membrane with a specific pore size allowing the elements to be retained within the media or eliminated from it depending on the size of the molecule and of the filtration membrane pore. In order to apply this technique an ultrafiltration cassette containing the filtration membrane, a peristaltic pump, a magnetic agitator, a reservoir and two pressure gauges are needed. In summary, the sample is placed inside the reservoir, and by means of a peristaltic pump is driven into the ultrafiltration cassette whose membrane separates the molecules in solution. The peristaltic pump employs rollers that press an elastic tubing against a hard surface moving the solution contained within without contaminating it. The magnetic agitator homogenizes the solution that is kept circulating between the reservoir and the filtration cassette. The purpose of this project was to build an ultrafiltration station for protein separation consisting of: a peristaltic pump, a magnetic agitator, and a reservoir (containing the pressure gauges and the connectors for the filtration cassette) to aid in the purification process of BMP 7 extracted from human dentine. The station complied with this purpose.

INTRODUCCIÓN

La separación de moléculas se puede realizar basándose en diferentes características como son: tamaño (peso molecular), solubilidad en solventes orgánicos, interacciones electrostáticas etc. Dentro de los procesos que se uti-

* Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Odontología. Centro de Investigaciones Odontológicas.

lizan para este propósito están entre otros la extracción química, la cromatografía, la electrofóresis, la ultracentrifugación y la ultrafiltración. Es frecuente que dentro de un proceso de extracción se utilicen combinaciones de estas técnicas para que, de manera progresiva, se separe la molécula blanco de los contaminantes obteniendo al final una estructura con un alto grado de pureza.

La ultrafiltración se puede utilizar para concentrar, purificar y separar en forma fraccionada materiales presentes en una muestra¹, separándolos mediante el uso de membranas semipermeables con un tamaño de poro específico (ultrafiltros)², impulsándolos con presión. Como macromoléculas, las proteínas forman disoluciones coloidales, siendo este un factor de gran importancia que modula su comportamiento ante membranas semipermeables, un ejemplo fisiológico es la ultrafiltración del plasma sanguíneo en el aclaramiento renal; dicho principio tiene gran interés y ha sido empleado en diversas técnicas en bioquímica para la

concentración y purificación de proteínas. Además de que las proteínas no son dializables, es decir, no pasan a través de una membrana con un tamaño menor que el de las moléculas de las proteínas, el efecto más significativo del carácter coloidal de las disoluciones proteicas es la distribución asimétrica que provocan a ambos lados de la membrana³.

Esta técnica se considera un proceso de "cernido molecular" en el que los elementos contenidos en un solvente apropiado son mantenidos dentro del medio o eliminados del mismo dependiendo del tamaño de la molécula y el tamaño del poro de la membrana de filtración (figura 1A), bajo una diferencia de presión aplicada a la membrana. Para evitar su taponamiento se han diseñado técnicas en las que se mantiene un flujo tangencial (paralelo a la membrana de filtración), relativamente constante, sobre un área grande de membrana, de manera que las moléculas retenidas por el filtro son lavadas del mismo por la corriente de muestra y solvente en desplazamiento (figura

1B). A este proceso se lo denomina ultrafiltración por flujo tangencial. Para utilizar en forma repetida las membranas de ultrafiltración, se lavan con soluciones diluidas de detergentes que eliminan los solutos adsorbidos¹.

La ultrafiltración incluye a los solutos cuyas dimensiones moleculares son 10 ó más veces mayores que las del disolvente y que, por lo general, son inferiores a 0.5 mm. Los solutos a separar usualmente son macromoléculas como proteínas, polímeros, almidones, gomas naturales, enzimas, etc. Las presiones de ultrafiltración varían de 5 a 100 lbf/in², con presiones bajas se reducen los requerimientos de energía para bombeo, y por tanto, el costo del equipo¹.

Para poder aplicar esta técnica de separación se necesitan varios elementos como: cartucho de ultrafiltración, bomba peristáltica, agitador magnético, reservorio para la muestra y manómetros. Resumiendo, la muestra se coloca dentro del reservorio y con una bomba

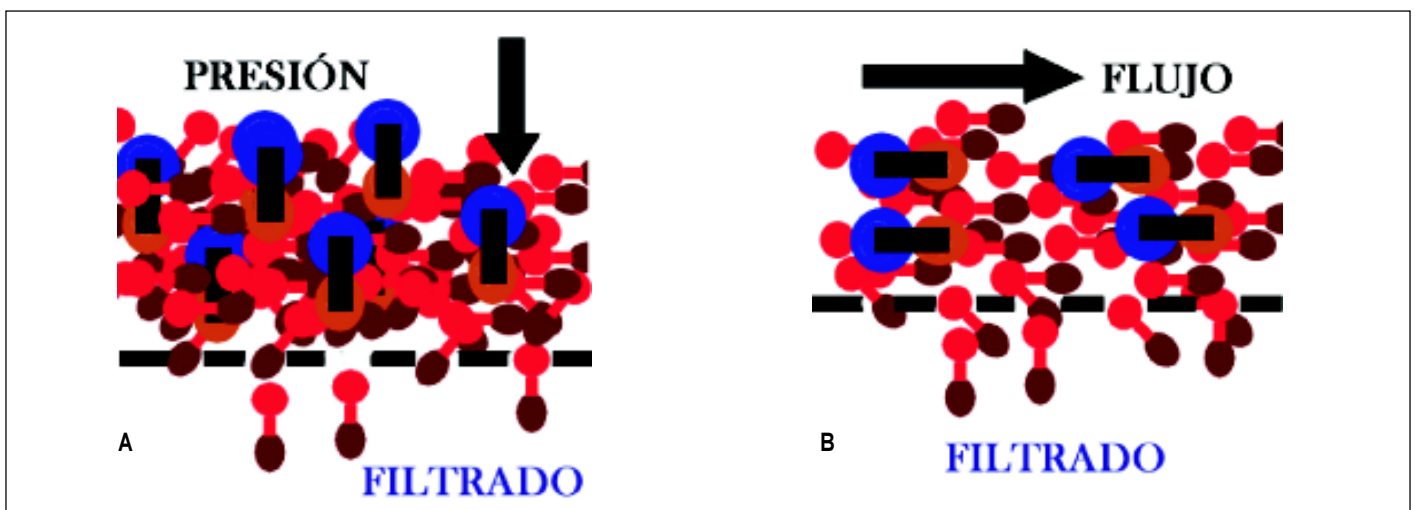


Figura 1A. La ultrafiltración se puede utilizar para concentrar, purificar y separar en forma fraccionada materiales presentes en una muestra, mediante el uso de membranas semipermeables con un tamaño de poro específico (ultrafiltros), impulsándolos por medio de presión. La ilustración muestra cómo las moléculas pequeñas atraviesan la membrana mientras las de mayor tamaño son retenidas.

Figura 1B. Para evitar el taponamiento de la membrana de filtración, se han diseñado técnicas en las que se mantiene un flujo tangencial (paralelo a la membrana de filtración), relativamente constante, sobre un área grande de membrana, de manera que las moléculas retenidas por el filtro son lavadas del mismo por la corriente de muestra y solvente en desplazamiento. A este proceso se lo denomina ultrafiltración por flujo tangencial.

peristáltica se impulsa hacia el interior del cartucho de filtración dentro del cual la membrana cumple con su función. El solvente y los elementos retenidos se devuelven al reservorio en donde el agitador homogeneiza la muestra. Los manómetros permiten controlar la presión aplicada sobre la membrana de filtración evitando que se rompa y además asegurando que se mantenga un flujo de muestra circulando sobre la misma para prevenir su taponamiento.

El objetivo del proyecto fue construir una estación de ultrafiltración para separación de proteínas que consta de: bomba peristáltica, agitador magnético y reservorio (figura 2) (que incluye los controles de presión y los conectores para el cartucho de filtración).



Figura 2. Estación de ultrafiltración para separación de proteínas que consta de: bomba peristáltica (1), agitador magnético (2) y reservorio (3), que incluye los controles de presión y los conectores para el cartucho de filtración (4).

MATERIALES Y MÉTODOS

Bomba peristáltica

El fundamento de la bomba peristáltica consiste en intercalar un tubo flexible en la línea de flujo y comprimirlo rítmicamente, bien con pinzas alternantes o mediante rodillos rotatorios, en la cual, regulando el tamaño del tubo y la rapi-

dez de los impulsos, pueden obtenerse flujos desde cero hasta 2.000 litros por hora⁴.

La bomba peristáltica emplea rodillos que presionan la manguera elástica sobre una superficie dura (figura 3). La ventaja de este tipo de bomba es que los mecanismos impelentes no entran en contacto con los fluidos, lo que permite usarla para el movimiento de soluciones sin contaminarlas. El funcionamiento de una bomba peristáltica se puede resumir de la siguiente manera; el rodillo cierra la manguera al aproximarse a la superficie de contención, aumentando la presión del fluido y al desplazarse sobre la misma obliga al líquido a moverse en su interior y en la dirección del desplazamiento. Si varios rodillos se colocan en un rotor y la superficie de contención es curva (de las mismas características del rotor) el giro del rotor hará que el líquido dentro de la manguera fluya en forma constante con ligeros picos de presión que se producen al liberar la presión del fluido entre dos rodillos cuando el que va más adelante se separa de la superficie de contención. Estos picos de presión son los que producen el peristaltismo.



Figura 3. La bomba peristáltica emplea rodillos que presionan la manguera elástica sobre una superficie dura.

Las partes constitutivas de la bomba son el motor, el rotor con los rodillos y la carcasa de contención para la manguera. También tiene un mecanismo

que permite variar la proximidad de la carcasa de contención con el rotor regulando la presión que ejercen los rodillos sobre la manguera. Adicionalmente tiene unos dispositivos que permiten asegurar la manguera y mantenerla sobre el rotor en una relación constante, con la tensión apropiada, de manera que al girar éste no tienda a desplazarla del interior de la carcasa de contención. Con este mismo propósito la carcasa tiene dos pestañas (una interna y otra externa) que forman un canal que mantiene la manguera en su lugar.

El rotor consta de dos discos y un eje torneados y maquinados a partir de platina de $\frac{1}{4}$ de pulgada y varilla de $\frac{3}{4}$ de pulgada de aluminio de aviación (2024 T4). El eje actúa al mismo tiempo como separador para establecer la distancia entre platos para que en ese espacio se coloquen los rodillos de impulsión. Estos rodillos (6 en total) se fabricaron en nylon y se tornearon con un diámetro final de 16 milímetros. Los rodillos se mantienen en posición con unos ejes prisioneros de una longitud ligeramente superior a la de los rodillos permitiendo que éstos giren libremente. La razón para colocar 6 rodillos en el rotor fue mantener la presión de bombeo más constante. La carcasa de contención se fabricó en acrílico transparente y tiene un diámetro de la concavidad ligeramente mayor al diámetro externo entre rodillos contralaterales que es de 72 milímetros. La carcasa tiene un surco en su parte interna (formado por las dos pestañas y el fondo de la misma) que actúa como zona de contención de la manguera de silicona de $\frac{1}{8} \times \frac{1}{4}$, evitando que se desplace hacia fuera cuando el rotor gira. Para controlar la proximidad de la carcasa al rotor se diseñó un elemento que consta de un tornillo prisionero de $\frac{1}{4}$ de pulgada unido en un extremo a ésta y que pasa por una base que ésta fija sobre la carátula de la bomba. Al darle vueltas al tornillo éste se despla-

za por entre la base y aleja o aproxima la carcasa al rotor.

El motor tiene incorporado un reductor de velocidad (que al mismo tiempo aumenta el torque) produciendo un máximo de 100 revoluciones por minuto a 12 voltios DC. Para regular la velocidad y la dirección de rotación se construyó un regulador de voltaje variable (fuente de poder). Dentro de la caja de la bomba se instaló una tarjeta electrónica de control y a un lado se colocó un ventilador para enfriar el motor.

Los elementos de fijación de la manguera se maquinaron en acrílico transparente de 13.5 mm de espesor y se aseguraron a la carátula de la bomba con tornillos. Para guiar el desplazamiento de la carcasa de contención en estos elementos se insertaron dos vástagos de acero en dos agujeros perforados en la carcasa.

Todos estos elementos se incorporaron en una caja de proyectos desmontable, de 14 x 11.5 x 33.5 cm a la que se le adicionó una carátula en acrílico negro mate y sobre la cual se colocaron: un interruptor de corriente con testigo de encendido y dos diodos emisores de luz que actúan como testigos de dirección de rotación (uno rojo para rotación derecha y otro verde para rotación izquierda). La velocidad de rotación se controla desde la fuente de poder variando la corriente de 0 a 12 V. En la parte de atrás de la caja se fijó el acople de la clavija hembra de conducción múltiple, para la fuente de poder.

La fuente de poder produce un voltaje variable de 0 a 12 V de corriente directa pudiendo invertir la polaridad con un interruptor.

AGITADOR MAGNÉTICO

La agitación se refiere al movimiento inducido de un material en una forma específica, generalmente con un mo-

delo circulatorio dentro de algún tipo de contenedor², en este caso con el fin de homogeneizar el flujo de retenidos con la muestra presente en el reservorio. Con este propósito, en una caja de proyectos de las mismas características de la que se usó para la bomba peristáltica se montó un micromotor de 12 voltios con el regulador de velocidad controlado mediante una tarjeta electrónica. Sobre el eje del motor se colocó un imán en herradura con los polos orientados hacia la superficie superior. A esta superficie de la caja se le hizo un orificio cuadrado de 9 x 9 cm cubriéndolo con lámina de acrílico de 1.5 mm (figura 4). Sobre la superficie superior de la caja cubierta por la lámina de acrílico se hicieron dos perforaciones a través de las cuales se pasaron dos tornillos de $\frac{1}{4}$ de pulgada para fijar la base del reservorio sobre la parte activa del agitador magnético. La carátula del agitador se fabricó en lámina de acrílico, negro mate, de 1.5 mm de espesor. Sobre la carátula se colocaron el interruptor de corriente con testigo de encendido, la clavija del reóstato que controla la velocidad de rotación del motor y un cronómetro digital programable para ayudar en la medición de los flujos de filtración. En la parte de atrás de la caja se hizo una perforación para pasar el cable eléctrico y se instaló un portafusible para un fusible de 3 amperios.



Figura 4. A la superficie superior de la caja se le hizo un orificio cuadrado de 9 x 9 cm que luego se cubriría con lámina de acrílico de 1.5 mm.

Reservorio

La totalidad del reservorio se construyó en acrílico transparente. El vaso se termoformó a partir de una lámina de 1 cm de espesor. Las dimensiones finales del cilindro obtenido fueron de: diámetro externo de 10 cm, diámetro interno 8 cm, altura 20 cm. El vaso se aforó hasta 1.000 ml en fracciones de 10 ml y las marcaciones se grabaron en forma permanente con láser. El vaso se montó sobre una base cuadrada fabricada en lámina de acrílico. En el centro de la base se fresó una depresión circular de 0.8 cm de profundidad y 5 cm de diámetro para alojar el magneto de agitación (figura 5). En el centro de esa depresión se hizo otra perforación de 3 mm de diámetro a una profundidad de 1.45 cm. Esta perforación se conectó mediante otra del mismo diámetro a noventa grados de la primera de manera que se estableció un conducto de drenaje que va del centro del fondo del vaso a la pared lateral de la base. En ese lugar se colocó un acople hembra New Lock® acetal de $\frac{1}{8}$ x $\frac{1}{4}$ para manguera de conducción de fluidos de $\frac{1}{4}$ de pulgada (manguera transparente Norton® de $\frac{1}{8}$ x $\frac{1}{4}$). En este acople se inserta la manguera de entrada a la bomba peristáltica. En la parte inferior del vaso opuesto a la reglilla de aforo a una altura de 2.5 cm se hizo otra perforación para colocar un segundo acople hembra, en el que se inserta la manguera de retorno de los fluidos (que ya han circulado por dentro del cartucho de filtración). En la parte anterior de la base del reservorio se colocó un rectángulo de acrílico de 2.9 cm de espesor y de 8.4 cm de largo por 6 cm de ancho (figura 6). En la cara frontal del bloque (la que corresponde la carátula del agitador) a 1.45 cm de la superficie superior se le hizo una perforación de 3 mm de diámetro por 2 cm de profundidad. En ángulo recto con respecto a esta primera perforación se hizo otra a 2 cm del frente del bloque que conecta la primera con la porción lateral derecha del mismo. En los dos extre-

mos de esas perforaciones se colocaron acoples hembra New Lock® acetal de $\frac{1}{8} \times \frac{1}{4}$. Sobre la superficie superior del bloque se hizo otra perforación de 3 mm de diámetro que hace una intersección con el conducto anteriormente descrito. En esta perforación se colocó un manómetro de 0 a 60 psi (figura 6), el cual mide la presión de salida de la bomba, siendo éste uno de los parámetros importantes en el control de la filtración con el cartucho de flujo tangencial. En la pared lateral 2 cm más atrás del primer orificio se hizo otro de la misma longitud que se une en ángulo recto con una segunda perforación hecha sobre la parte superior del bloque. En los dos extremos de esas perforaciones se colocaron acoples hembra New Lock® acetal de $\frac{1}{8} \times \frac{1}{4}$. El primero ubicado en el lado del bloque corresponde al lugar de inserción de la manguera de salida de los filtrados del cartucho (filtrado 1) y el segundo sirve para insertar la manguera que iría al recipiente de recolección de filtrados.



Figura 5. En el centro de la base se fresó una depresión circular de 0.8 cm de profundidad y 5 cm de diámetro para alojar el magneto de agitación.

A una distancia de 14 cm por encima del bloque anteriormente descrito se fijó una base con su cara posterior cóncava y su cara anterior plana (figura 7). La concavidad correspondía a la superficie externa del reservorio y permitió adosar la base a la superficie externa del mismo. En la cara anterior de esa base se fijó un segundo bloque quedando

posicionado exactamente encima del bloque inferior. En su cara lateral derecha a 2 cm de la cara frontal y a 1.45 cm de la superficie superior se le hizo una perforación de 3 mm de diámetro por 6 cm de profundidad. En ángulo recto con respecto a esta primera perforación y sobre la cara superior del bloque se hizo otra a 2.3 cm de la cara derecha del bloque que conecta con la primera y que sirvió para ubicar el segundo manómetro de 0 a 60 psi, que mide la presión de filtración del cartucho (figura 7). En el extremo de la perforación hecha en la cara lateral derecha del bloque se colocó un acople hembra New Lock® acetal de $\frac{1}{8} \times \frac{1}{4}$, en el que se inserta la manguera de retenidos que sale del cartucho de filtración.



Figura 6. En la parte anterior de la base del reservorio se colocó un rectángulo de acrílico de 2.9 cm de espesor y de 8.4 cm de largo por 6 cm de ancho (figuras 16 y 17). En la cara frontal del bloque (la que corresponde la carátula del agitador) a 1.45 cm de la superficie superior se le hizo una perforación de 3 mm de diámetro por 2 cm de profundidad. En ángulo recto con respecto a esta primera perforación se hizo otra a dos cm del frente del bloque que conecta la primera con la porción lateral derecha del mismo. En los dos extremos de esas perforaciones se colocaron acoples hembra New Lock® acetal de $\frac{1}{8} \times \frac{1}{4}$. El primero ubicado en el frente del bloque corresponde al lugar de inserción de la manguera de salida de la bomba y el segundo sirve para insertar la manguera de entrada al cartucho de filtración. Sobre la superficie superior del bloque se hizo otra perforación de 3 mm de diámetro que hace una intersección con el conducto anteriormente descrito. En esta perforación se colocó un manómetro de 0 a 60 psi. Este manómetro mide la presión de salida de la bomba, siendo éste uno de los parámetros importantes en el control de la filtración con el cartucho de flujo tangencial.

En la pared lateral a 2 cm más atrás del primer orificio, se hizo otro que atravesaba de lado a lado el bloque. En los dos extremos de esa perforación se colocaron acoples hembra New Lock® acetal de $\frac{1}{8} \times \frac{1}{4}$. El primero ubicado en el lado derecho del bloque que corresponde al lugar de inserción de la manguera de salida de los filtrados del cartucho (filtrado 2) y el segundo sirve para insertar otra manguera que va al recipiente de recolección de filtrados.



Figura 7. A una distancia de 14 cm por encima del bloque inferior, se fijó una base con su cara posterior cóncava y su cara anterior plana (figura 18). La concavidad correspondía a la superficie externa del reservorio y permitió adosar la base a la superficie externa del mismo. El manómetro permite medir la presión de retenidos.

VÁLVULA DE CONTROL DE PRESIÓN DE FILTRADO

La primera perforación hecha en la cara derecha del bloque superior y de 6 cm de longitud se une en ángulo recto con otra que se origina en el fondo de un pozo fresado en la cara superior del bloque y que va a formar parte de la válvula reguladora de presión de filtrados. Esta válvula se diseñó de manera que pudiera restringir el flujo de los retenidos aumentando así la presión de filtrado que se aplica a la membrana del cartucho de filtración. Inicialmente se fresó una depresión rectangular en la superficie superior del bloque de 3.2 cm

de largo por 2.5 cm de ancho y con una profundidad de 0.6 cm. La depresión se ubicó a 4.3 cm del borde derecho y a 8 mm del borde anterior del bloque. En su parte más profunda a 1.8 cm de su borde izquierdo, se fresó una segunda depresión cuadrada de 2 mm de profundidad y de 1.2 cm de largo por 1.2 cm de ancho cuyo centro corresponde a la perforación que se conecta en ángulo recto con aquella originada en la cara derecha del bloque y por donde entra la manguera de retenidos.

En el extremo izquierdo del pozo cuadrado se fresó una segunda cámara unida a la primera de 0.8 cm de largo por 0.4 cm de ancho y de su misma profundidad (2 mm). En la mitad de esa segunda cámara se hizo una perforación de 3 mm de diámetro y 1.45 cm de profundidad y en ángulo recto a ésta se hizo otra del mismo diámetro de la anterior y que se origina en la cara izquierda del bloque (figura 8). En el extremo de la perforación en la cara izquierda del bloque se colocó un acople hembra New Lock® acetal de $\frac{1}{8}$ x $\frac{1}{4}$, en éste se inserta la manguera que va al reservorio, haciendo que los fluidos se mantengan dentro de un sistema de recirculación.

Sobre el fondo de la depresión rectangular se colocó una membrana de neopreno de 0.5 mm de espesor asegurada con una platina de acero, a la que se le hizo una perforación roscada para pasar un tornillo de $\frac{1}{4}$ de pulgada con la cabeza fresada en forma semicircular. El centro de la rosca corresponde al centro de la perforación circular de 1.2 cm de diámetro ubicada en el fondo de la depresión rectangular. Al apretar el tornillo, su extremo sobresale de la platina y presiona la membrana que se adapta a la periferia de la perforación restringiendo el flujo y por consiguiente aumentando la presión de filtración. Sobre la membrana de neopreno se aseguró la platina con el tornillo prisionero (3). El flujo de retenidos se interrumpe con la válvula aumentando la presión de filtración como lo muestra la vista superior del conjunto (4).

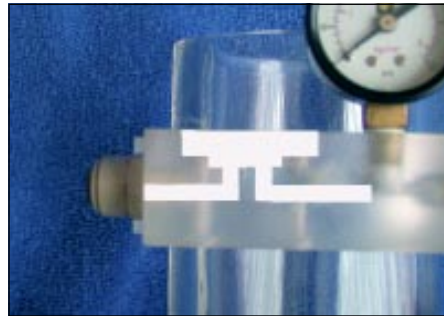


Figura 8. Diagrama de los cortes hechos para fabricar la válvula de control de presión de retenidos. En el extremo izquierdo del pozo cuadrado se fresó una segunda cámara unida a la primera. En la mitad de esa segunda cámara se hizo una perforación de 3 mm de diámetro y 1.45 cm de profundidad y en ángulo recto a ésta se hizo otra del mismo diámetro de la anterior y que se origina en la cara izquierda del bloque. Al obturar con la membrana la entrada derecha se aumenta la presión de filtración.

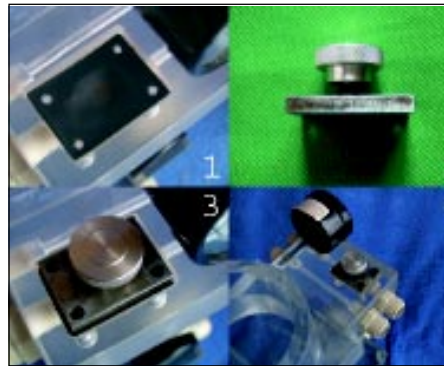


Figura 9. Sobre el fondo de la depresión rectangular se colocó una membrana de neopreno de 0.5 mm de espesor (1), asegurada con una platina de acero, a la que se le hizo una perforación roscada para pasar un tornillo de $\frac{1}{4}$ de pulgada con la cabeza fresada en forma semicircular (2). El centro de la rosca corresponde al centro de la perforación circular de 1.2 cm de diámetro ubicada en el fondo de la depresión rectangular. Al apretar el tornillo, su extremo sobresale de la platina y presiona la membrana que se adapta a la periferia de la perforación restringiendo el flujo y por consiguiente aumentando la presión de filtración. Sobre la membrana de neopreno se aseguró la platina con el tornillo prisionero (3). El flujo de retenidos se interrumpe con la válvula aumentando la presión de filtración como lo muestra la vista superior del conjunto (4).

RESULTADOS

Ensamblaje de la estación de ultrafiltración

La manguera de salida del reservorio se conecta mediante acoples universales a un extremo de la manguera elástica de la bomba peristáltica. Ésta se adapta sobre los rodillos y se cierra la carcasa de contención presionándola. El otro extremo de la manguera de la bomba se une con un acople universal a otra manguera de conducción de fluidos que se inserta en el acople de entrada de fluidos al conjunto del reservorio. El cartucho de filtración se conecta a las entradas y salidas de fluidos, posteriormente se instalan las mangueras de salida de filtrados. A la manguera de los retenidos se le colocó una válvula de tres posiciones para dirigir los fluidos de vuelta al reservorio, enviarlos a los desechos o cerrar completamente el flujo.

Funcionamiento de la estación de ultrafiltración

La muestra (conjunto de macromoléculas) a procesar disuelta en un solvente se introduce en el reservorio y se inicia la agitación por medio del agitador magnético. La solución es conducida por la bomba (que tiene un flujo máximo de 150 ml/min) desde el reservorio hasta la entrada del cartucho de filtración activando el manómetro que controla la presión de entrada. En el interior del cartucho la membrana permite el paso de solvente y moléculas de un tamaño determinado (filtrado) mientras que evita la salida de aquellas que son más grandes que el tamaño del poro de la misma (*retenidos*). El flujo va paralelo a la membrana de filtración de manera que la corriente la lava constantemente evitando que se taponen los poros y se detenga el proceso. Dentro del cartucho la solución se divide en dos: una se filtra y va a un recipiente de recolección y la otra continúa dentro del circuito activando el manómetro de control de presión de filtrado antes de pasar

por la válvula reguladora de la misma presión para luego ser devuelta al reservorio.

Para controlar la velocidad de filtración y evitar que se vaya a superar la resistencia de la membrana y dependiendo de la capacidad del cartucho especificada por el fabricante se manejan tres parámetros de importancia como son la presión de entrada, la de retenidos y la presión transmembranal, ésta última se obtiene promediando las dos anteriores. También es importante controlar el caudal de filtrados para verificar que la membrana no llegue al estado de saturación durante el proceso. Dicho control se realiza midiendo el volumen de filtrados periódicamente. La disminución del volumen implica que se deben realizar procedimientos tendientes a recuperar el flujo de filtrados inicial, tal como lavados con solución de NaOH 0.1N a 40°C, seguidos por H₂O con grado de pureza 1, en un volumen dos veces mayor al de NaOH utilizado. En algunos casos de saturación excesiva se requiere del uso de un detergente como el SDS 0,1% para lavar la membrana.

Cartucho de filtración

El cartucho de filtración utilizado en la investigación es el Pellicon® XL Biomax 10 (figura 10). La membrana de polietersulfona tiene un tamaño de poro de 10000 D, con un área de filtración de 50 cm² y una capacidad de 3.2 ml. El volumen óptimo de flujo tangencial es de 30 - 50 ml /min y la compatibilidad de pH es de 1 -14. La presión de entrada debe ser menor de 30 psi y la de retenidos menor de 20 psi para obtener una presión transmembranal máxima de 25 psi.

Aplicación de la estación de ultrafiltración

Dos de los pasos necesarios para extraer BMP-7 (proteína morfogénica ósea 7) a partir de dentina humana requieren la utilización de la estación.



Figura 10. El cartucho de filtración utilizado en la investigación es el Pellicon® XL Biomax 10. La membrana de polietersulfona tiene un tamaño de poro de 1000 Da, con un área de filtración de 50 cm² y una capacidad de 3.2 ml. El volumen óptimo de flujo tangencial es de 30 - 50 ml /min y la compatibilidad de pH es de 1 -14.

En el primero, las muestras de dentina pulverizadas se desmineralizan completamente para luego extraer la proteína solubilizándola en clorhidrato de guanidina. Debido a que el volumen de solvente necesario para extraer la proteína es muy grande, la solución (muestra más solvente) debe ser sometida al proceso de ultrafiltración, para reducirlo a $\frac{1}{10}$ del inicial y además eliminar las moléculas con tamaño molecular menor de 10000D. Este proceso se debe realizar a 4°C para evitar la desnaturalización de las proteínas contenidas en la solución lo cual se consigue introduciendo la estación en una nevera. Los flujos manejados en el estudio fueron: presión de entrada 7.5 psi, de retenidos 7 psi y transmembranal de 7.25 psi; el proceso se inició con un volumen de solución de 8000 ml, obteniendo al final 800 ml.

En el segundo paso la estación se utilizó para diafiltrar el volumen final obtenido en la ultrafiltración (800 ml). La diafiltración se hizo diluyendo la muestra en 5 volúmenes de H₂O con grado 1 de pureza y volviéndola a reducir al volumen original. El propósito de este proceso fue eliminar la mayor cantidad posible de clorhidrato de guanidina, reduciendo los compuestos diferentes a proteínas contenidos en la solución.

Después de realizar estos procedimientos se continuó con la purificación por otros métodos y la caracterización de la proteína blanco (figura 11). Los resultados finales se alcanzaron en gran parte gracias a la eficiencia de la estación en los procesos de ultrafiltración y diafiltración.

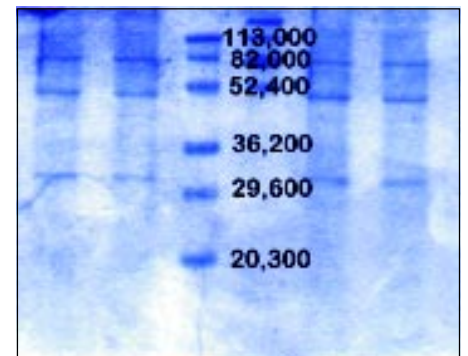


Figura 11. Imagen de electrofóresis en gel de agarosa en donde se observa la banda de BMP 7 con un peso de aproximadamente 50000 D en los carriles 1, 2, 5 y 6.

El equipo diseñado y construido permanece dentro del Centro de Investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Odontología en donde está a disposición de los investigadores que requieran de este tipo de proceso.

Las limitaciones del equipo son:

- Flujo máximo de operación de 150 ml/min.
- Volumen máximo de muestra de 1.000 ml.
- Manejo de solventes orgánicos que puedan reaccionar con la resina acrílica.
- Deterioro de la manguera elástica de la bomba peristáltica por la presión ejercida por el rotor.
- Corrosión de los tornillos usados en la construcción por el funcionamiento de la estación en un ambiente húmedo y frío.

Recibido para su publicación:
abril de 2006

Aceptado para su publicación:
junio de 2006

En un futuro, las partes metálicas que usadas en la construcción de la estación deben ser remplazadas por acero inoxidable teniendo en cuenta que va a funcionar dentro de un ambiente de baja temperatura y alta humedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Green DW. *Perry Manual del Ingeniero Químico*, tomo IV, 6ª ed., McGraw-Hill. México 1992; 17-32-17-35.
2. McCabe WL, Smith JC, Harriott P. *Operaciones unitarias en ingeniería química*, 4ª ed., McGraw-Hill. Madrid, España 1991; 242-243, 1000.
3. Lozano JA, Galindo JD, García JC, Martínez JH, Peñafiel R, Solano F. *Bioquímica para ciencias de la salud*. McGraw-Hill. Madrid, España 1995; 72.
4. Webb FC. *Ingeniería bioquímica*. ACRIBIA. Zaragoza, España 1995; 634.

CORRESPONDENCIA

Camilo Durán Correa, MSc
Facultad de Odontología.
Centro de Investigaciones
Odontológicas.
Pontificia Universidad Javeriana,
Cra. 7ª # 40-62
Teléfono 3208320
extensión 2899
Bogotá, D. C., Colombia
Correo electrónico
camiloduran@cable.net.co

Lorenza María Jaramillo Gómez,
MSc
Pontificia Universidad Javeriana,
Facultad de Odontología.
Centro de Investigaciones
Odontológicas.
Cra. 7ª # 40-62
Teléfono 3208320
extensión 2899.
Bogotá, D. C., Colombia
Correo electrónico
lorenzaj@javeriana.edu.co