



## SEPARATION AND CHARACTERIZATION OF MACROMOLECULES BY ASYMMETRICAL FLOW FIELD FLOW FRACTIONATION

Catalina Fuentes<sup>1,2</sup>, Daniel Osorio<sup>1,2</sup>, J. Mauricio Peñarrieta<sup>1,\*</sup>, Lars Nilsson<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, School of Pure and Natural Sciences, Major San Andrés University, P. O. Box: 330, La Paz, Bolivia, Calle Andrés Bello s/n, Ciudad Universitaria Cota Cota, Phone 59122795878, La Paz, Bolivia

<sup>2</sup>Food Technology, Engineering and Nutrition, Faculty of Engineering LTH, Lund University, PO Box 124, S-221 00 Lund, Sweden

\*Corresponding author: [impenarrieta1@umsa.bo](mailto:impenarrieta1@umsa.bo)

**Spanish title:** *Separación y caracterización de macromoléculas utilizando Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de Flujo Asimétrico.*

*In present work it is summarized the application and use of Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation known as AF4 as a method for characterization and fractionation of macromolecules and colloidal particles whose application in Food Science increased the last years. This paper summarized the AF4 use, its instrumental considerations and the evaluable properties than can be achieved by the proper detection techniques.*

*En el presente trabajo se resume la aplicación y uso de la técnica fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico con sus siglas en inglés AF4 (Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation) como un método para el fraccionamiento y caracterización de macromoléculas y partículas coloidales cuyo uso se ha incrementado en los últimos años, particularmente en la ciencia de Alimentos. Este artículo resume la utilización del AF4, sus consideraciones instrumentales así como las propiedades químicas que pueden ser evaluadas por sus diferentes tipos de detectores.*

Como parte de un programa de investigación de alimentos entre las universidades de Lund - Suecia y la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) de La Paz -Bolivia, la Carrera de Ciencias Químicas ha adquirido recientemente un equipo de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico, (AF4, por sus siglas en Inglés) con detectores de difracción de luz con múltiples ángulos MALS (Multi Angle Light Scattering), índice de refracción con sus siglas en Inglés dRI (Diferencial Refractive Index), fluorescencia FLD (Flourescence Detector), y ultravioleta visible VWD (Variable Wavelength Detector) para la caracterización de macromoléculas en Alimentos.

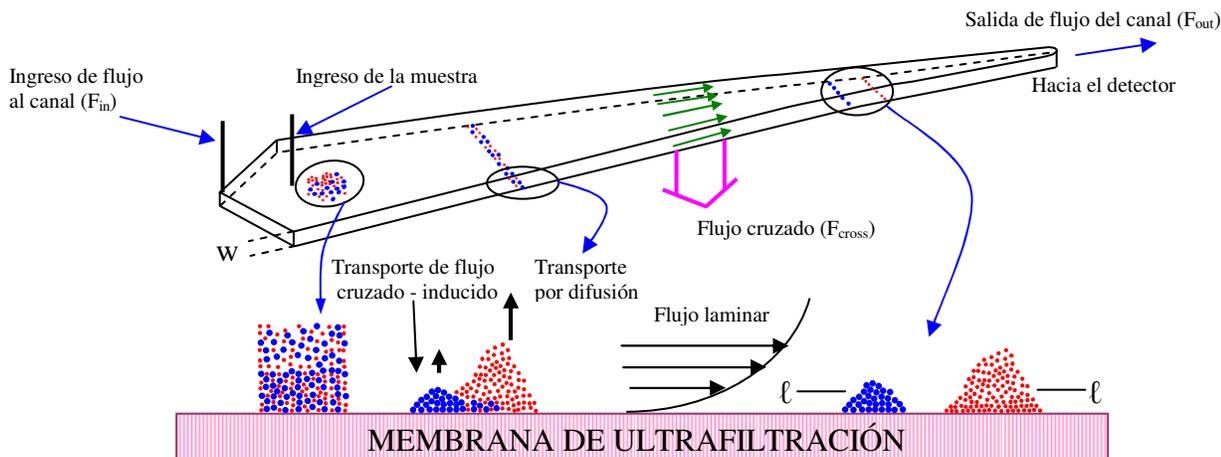
En los últimos años el interés por el uso de la técnica, AF4 como una herramienta para la separación y caracterización de macromoléculas de matrices alimentarias y otras macromoléculas, ha tenido un aumento significativo. Esta técnica resulta ser una alternativa para trabajar con macromoléculas polidispersas y/o que presentan una propensión a formar estructuras agregadas.

Por lo tanto, la técnica AF4 puede fraccionar y caracterizar macromoléculas y partículas coloidales en una gama de tamaño muy amplia, entre 2 nm a > 1 mm. Es decir que por esta técnica las ultra-altas macromoléculas (de masa molar por arriba de 10<sup>7</sup> g/mol) pueden ser fraccionadas fácilmente. Aunque el método puede ser considerado de tipo cromatográfico, éste, no se basa en una fase estacionaria y por lo tanto las fuerzas de corte durante la separación son pequeñas.

Además, una ventaja adicional del uso de esta técnica, es que a menudo el filtrado para la pre-inyección de muestras no resulta necesario. Las bases de la teoría sobre este método no serán explicadas en el presente trabajo, sin embargo para mejor comprensión de la técnica sugerimos la lectura de <sup>1,2</sup>.

El principio de separación del método AF4 se muestra esquemáticamente en la Fig.1. El flujo de cruce o en inglés *crossflow* ejerce una fuerza en dirección perpendicular sobre todo el canal que mueve los componentes de la muestra hacia una membrana de ultrafiltración que funciona como una pared de acumulación, donde dichos componentes quedan confinados en una capa fina concentrada. El transporte inducido es contrarrestado por un transporte difusional, dando lugar a una distribución de la concentración en estado estacionario (focusing). Por lo tanto, los componentes de la muestra, después de algún tiempo, se relajan en relación al transporte inducido de flujo

crucado *crossflow* y la distribución de concentración es caracterizada por la distancia media de concentración, ( $\ell$ ) desde la pared de acumulación en la pared. Por lo tanto, para los componentes que son pequeños de la muestra  $\ell$  será una distancia más larga que para componentes más grandes, debido a un mayor coeficiente de difusión de los componentes más pequeños. Como el flujo longitudinal en el canal es laminar, la velocidad va ser más alta en el centro del canal y disminuirá a medida que se acerca a la pared de acumulación. Por lo tanto, los componentes de la muestra más pequeños serán transportados más rápidamente a lo largo del canal que los componentes de mayor tamaño.



**Figura 1.** El principio de separación por AF4, donde se muestra la separación de dos partículas de diferente tamaño. Luego de la inyección y relajamiento de la muestra comienza la elución y las dos poblaciones de partículas comienzan a migrar a diferente velocidad. Las partículas azules representan las de mayor tamaño, mientras que las partículas de color rojo a las pequeñas.  $W$  representa el grosor del canal,  $\ell$  la distancia promedio (concentración) de la población de partículas presente en la membrana de ultrafiltración. (imagen adaptada de Nilsson 2013<sup>2</sup>)

La idoneidad de AF4 para la caracterización de macromoléculas fue demostrada hace unos 20 años para muestras tales como proteínas<sup>3,4</sup> y polisacáridos<sup>4</sup>, logrando separaciones de alta resolución. Para obtener información precisa y fiable sobre propiedades moleculares, como por ejemplo la masa molar ( $M$ ), la raíz cuadrada promedio del radio (EMRR) y la conformación de los polímeros, es necesario utilizar una técnica adecuada para la detección tal es el caso del uso del detector de difracción de luz con ángulos múltiples MALS.

Algunos trabajos anteriores muestran la robustez y la potencialidad de la combinación de la técnica de flujo conocida como FFF y MALS para la caracterización de polisacáridos<sup>5,6</sup> y también la aplicación de AF4 con los mismos detectores<sup>7</sup>.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es discutir las consideraciones instrumentales, y cuáles deberían ser los parámetros macromoleculares y coloidales necesarios para que éstos puedan ser evaluados por fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico, los diversos sistemas de detección así como proporcionar una revisión acerca de trabajos en este campo. Aunque el fraccionamiento de campo abarca una amplia familia de técnicas el presente trabajo se enfoca en AF4, siendo la técnica más utilizada hoy en día. Algunos resultados obtenidos con la técnica precursora del AF4, cada vez menos utilizada: flujo simétrico FFF son incluidos. La AF4 utiliza sólo una pared permeable para el flujo transversal ( $Q_c$ ) que significa una simplificación considerable, además de la geometría del canal trapezoidal, con el centro de flujo de bajo de la inyección. En conjunto, estas mejoras, y otras, han conducido a disminuir sustancialmente los tiempos de análisis y una resolución mejorada en comparación al flujo simétrico-FFF. Para mayor profundización de las diferencias entre los dos métodos, se pueden consultar las referencias 1 y 8.

## CONSIDERACIONES INSTRUMENTALES PARA AF4

*Elección de la membrana y la validación del funcionamiento del canal.*



Existen varios tipos de materiales de membrana disponibles comercialmente. Al seleccionar el tipo de material es importante considerar la minimización de interacciones no deseadas entre la membrana y la muestra. Es especialmente importante considerar la atracción entre la superficie y la muestra, moléculas / partículas, las cuales podrían conducir a la adsorción de las especies de la muestra en la superficie. También las interacciones de repulsión deben ser consideradas, ya que pueden interferir con el fraccionamiento. Las proteínas pueden requerir algunas veces optimización en el aspecto de adsorción ya que por naturaleza tienen superficies activas contrariamente a la mayoría de los polisacáridos presentes en los alimentos. La adsorción potencial, de los polisacáridos de superficies no activas en la membrana a veces puede ser discutido, especialmente por estar relacionado con valores bajos de recuperación de masa a partir de la separación en el canal <sup>9</sup>. Esto, sin embargo, no ha sido investigado aun por lo tanto todos los supuestos acerca de estas interacciones deben ser considerados con cuidado. En general, se puede afirmar que la interacción entre la muestra y la membrana es algo difícil de predecir, y, por lo tanto, a la hora de elegir un tipo de membrana es necesaria la optimización experimental.

El funcionamiento de un canal recién ensamblado debe ser verificado antes de comenzar el análisis, esto normalmente se lleva a cabo mediante la inyección de una pequeña cantidad de un colorante soluble en agua, suficientemente hidrófilo para que no sea fuertemente adsorbido en la superficie de la membrana. En el caso particular de membranas a base de celulosa, un colorante adecuado es el azul de bromofenol (BPB) en solución acuosa a pH 6,5 <sup>8</sup> mientras que para membranas hidrófilas de poliéster sulfona se recomienda el uso de una solución de anilina azul acuosa. La macromolécula azul de dextrano también puede ser considerada como colorante para este fin. Para membranas de otros materiales se pueden requerir otro tipo de colorantes.

El colorante es inyectado durante la elución a un valor bajo de ( $Q_c$ ) y éste debería migrar al centro del canal formando una línea a lo largo del mismo. Si son observadas algunas desviaciones en la línea de color, esto es indicativo de que la membrana presenta algunos daños o sea, algunas obstrucciones en el flujo o algunas pérdidas de líquido. El punto de enfoque (*focusing point*) en el canal será verificado inyectando el colorante durante el enfoque (*focusing*) y se observará una línea recta transversal al canal en punto. Finalmente también es importante verificar el rendimiento del sistema utilizando una muestra estándar conocida tal como una proteína, un polisacárido, o una pequeña partícula coloidal.

#### *Fase móvil, cantidad inyectada y condiciones de flujo*

La fase móvil en AF4 es comúnmente una solución acuosa, aunque algunos solventes orgánicos pueden ser utilizados. Sin embargo lo más común son las soluciones acuosas y éstas dependerán del tipo de analito.

El agua pura no es recomendable como fase móvil debido a que pueden presentarse interacciones electrostáticas con la muestra, lográndose una separación pobre y una resolución deficiente. Para polisacáridos neutros es recomendada una fase móvil que consista en un electrolito diluido por ejemplo, una solución de 1 a 50 mM de  $\text{NaNO}_3$  que además contenga  $\text{NaN}_3$  para evitar el crecimiento de microorganismos. Para polisacáridos o derivados que posean carga, es necesario contar con solventes con mayor fuerza iónica y por su puesto esto puede afectar tanto al tamaño como a la conformación de la muestra. En el caso particular de las proteínas es necesario usar soluciones buffer. Las membranas de ultrafiltración también pueden ser una alternativa al uso de buffers y el control de pH, dependiendo del material de la membrana.

Es necesario optimizar la cantidad de muestra a inyectar dentro del canal para minimizar o eliminar particularmente problemas de sobrecarga de señal (*overloading*). Esto es muy importante para lograr valores precisos, tales como los coeficientes de difusión, que se obtienen de los tiempos de elución. Esta optimización se realiza inyectando cantidades diferentes de muestra, comprobando que el tiempo de retención no varíe ya que si esto no sucede se asume que no existe una sobre carga (*overloading*).

Para proteínas pequeñas el uso de un  $Q_c$  constante es a menudo suficiente para lograr una separación satisfactoria. Sin embargo, para moléculas polidispersas, tales como polisacáridos o muestras que contengan agregados, se utilizan programas de *cross flow* que decaigan en el tiempo lo cual permite una separación eficiente de moléculas de diferente tamaño de partículas y un esto conlleva también a menor tiempo de análisis.

El empleo de campos programados ya establecidos para la separación de macromoléculas ha sido frecuente durante las tres últimas décadas. <sup>10-12</sup>. Sin embargo, los estudios sobre la forma de elección de un tipo específico de  $Q_c$  programado son escasos. La idoneidad de diferentes  $Q_c$  programados ha sido investigada para el análisis de derivados de almidón y celulosa utilizando estándares de pululan <sup>11</sup>. Los autores encontraron que la aplicación de un  $Q_c$  constante, no resultó en un fraccionamiento satisfactorio de las muestras, sin embargo, se logró un fraccionamiento óptimo utilizando un  $Q_c$  programado. Comparando diferentes  $Q_c$  programados (es decir, un  $Q_c$  que decae lineal y exponencialmente) se encontró que el uso de un  $Q_c$  programado que decae exponencialmente



proporciona una mayor selectividad de masa molar para altas fracciones de masa molar. Esto dio buenos resultados cuando existía una disminución en la selectividad de masa molar de las fracciones bajas. Además, no se observaron beneficios por tener un flujo cruzado inicial constante, durante la elución, que luego decaiga.

### *Preparación de la muestra para el análisis*

Las soluciones acuosas de polisacáridos son a veces muy difíciles de fragmentar. Las dificultades encontradas tienen distintas causas y presentan complicaciones del tipo cinético además del hecho de que el agua no es un buen solvente para estas macromoléculas. Muchos polisacáridos como el almidón, gomas a base de galactómano y los beta glucanos son muestras conocidas por su difícil disolución en agua. Para poder disolverlas a menudo es necesario utilizar temperaturas elevadas, pH alto, solvente orgánicos, (tales como el dimetil sulfoxido, DMSO), adición de sales (tales como el bromuro de litio LiBr), etc. La solución consiste en la elección acertada de la forma de la disolución la cual evita la degradación de la muestra. Otra dificultad difícil de detectar es la determinación de cuando y como se producido un bajo grado de degradación de grandes macromoléculas.

## **CARACTERIZACIÓN DE MACROMOLÉCULAS**

Las propiedades obtenidas por la técnica AF4 dependen del tipo de detectores que son utilizados. Los coeficientes de difusión (D), y por ende, los radios hidrodinámicos ( $r_h$ ) pueden ser calculados directamente de los tiempos de elución del canal de separación, sin embargo, la determinación precisa de la masa molar requiere del uso de detectores adecuados.

### *Determinación de la masa molar (M), raíz cuadrada promedio del radio ( $r_{rms}$ )*

La detección por difracción de la luz, en conjunción con la detección de concentración de una muestra permite calcular de forma directa y sin calibración la masa molar (M) y el tamaño de una molécula. Por lo tanto el AF4 con el acoplamiento de este tipo de detectores resulta ser una potente herramienta para la caracterización de muestras fraccionadas.

Los detectores más usados son los de detección de multi ángulo de difracción de la luz (MALS), que detectan la intensidad de difracción de la luz que provoca una muestra en diferentes ángulos en relación con la luz emitida. Los datos obtenidos por la difracción de la luz en el detector son ajustados a diferentes modelos matemáticos tales como Debye<sup>13</sup>, Zimm<sup>14,15</sup> y Berry<sup>16</sup>, siendo estos los más utilizados actualmente<sup>17</sup>. La intención de este artículo no es el de desarrollar la teoría de esta técnica, sin embargo es recomendada la lectura de bibliografía<sup>18-20</sup>. Básicamente el uso de los modelos permite la determinación del  $r_{rms}$  (conocido también como radio de giro  $r_g$ ), de la pendiente de una curva ajustada a la dependencia angular de la intensidad de la luz dispersada. Esto se obtiene utilizando una relación conocida como índice de refracción con la concentración de la sustancia a determinar y una concentración conocida (dn/dc), la masa molar (M), o más específicamente el promedio de la masa molar ( $M_w$ ) de cada fracción la cual es determinada de la intersección de la curva ajustada. La selección de un modelo, para ajustar los datos no es necesariamente un proceso sencillo. Se ha realizado una investigación comprensiva considerando la idoneidad de los diferentes modelos para el estudio de diferentes tipos de macromoléculas utilizando MALS<sup>17</sup>. El trabajo mostró para pequeñas especies de dispersión ( $r_{rms} < 50$  nm) que el error en el cálculo de M es  $< 1\%$  más allá del modelo aplicado.

Para las especies de dispersión más grandes la elección del modelo es más crítica para obtener resultados precisos. También se pudo demostrar que al adaptarse a modelos con un alto orden polinomial los resultados son más precisos pero a expensas de la robustez del modelo, esto debido a que éste es más sensible a los errores de puntos individuales de cada medición. Los autores sugieren de forma general para muestras desconocidas la aplicación de un modelo de datos de ángulo bajo, como en el caso del método de Berry que es preferible para obtener datos precisos de M y de  $r_{rms}$  en vez de utilizar ajustes polinomiales de orden superior.

### *Determinación del coeficiente de difusión y del radio hidrodinámico*

Dado que la separación por AF4 ocurre basada en el coeficiente de difusión (D) de las fracciones de la muestra, el mismo puede ser determinado a través de los tiempos de elución<sup>21</sup>. Luego, una vez determinado D, es posible calcular el radio hidrodinámico despejando de la ecuación conocida como Stokes-Einstein<sup>22</sup>. Es importante mencionar que el cálculo de D a partir de los tiempos de elución resulta complicado cuando se utiliza un flujo programado  $Q_c$  en comparación con un flujo constante, ya que éste es función del tiempo y de la posición a lo largo del canal de



separación. El llamado efecto de relajación secundario<sup>23</sup> puede afectar los resultados ya que el campo decaerá continuamente causando una migración de los componentes de la muestra a una nueva distancia de equilibrio en la pared de acumulación. Por lo tanto el perfil de concentración en el canal de separación puede quedar retrasado de la distancia de equilibrio si el campo decae rápidamente y/o la difusión de las fracciones de la muestra es lenta. En canales de tipo rectangular el cálculo de  $D$  puede ser resuelto analíticamente<sup>10</sup>. Sin embargo en el caso de los canales trapezoidales, lo más común actualmente, es el cálculo de  $D$  a partir de los tiempos de elución y éste necesita ser realizado numéricamente. Hallazgos recientes han demostrado que  $D$  puede ser calculada con precisión con muy bajos porcentajes de error<sup>24</sup>. Sin embargo, el error se incrementa cuando gradientes de tiempo muy empinados en  $Q_c$  son utilizados, por ejemplo, si es deseado un cálculo preciso de  $D$  y  $r_h$  los decaimientos empinados para  $Q_c$  deberían ser evitados. Este comportamiento es de carácter más general para el fraccionamiento de campo de flujo y ha sido observado en estudios iniciales<sup>25,26</sup>.

Otra forma para determinar  $D$  y  $r_h$  es utilizando un detector de difracción de la luz quasi-elástico conocido por sus sigla en Inglés QELS, como ha sido demostrado en el análisis de almidones<sup>27</sup>. Se ha reportado que para obtener  $r_h$  con buena precisión los valores no deben pasar de 50nm ya que por encima de este valor los tiempos de correlación serían muy largos y se requiere detener el flujo<sup>27</sup>.

### Cálculo de la conformación y forma del polímero

La conformación de varias macromoléculas puede ser obtenida por AF4-MALS. Comúnmente se calcula la misma a partir de

$$r_{rms} = kM^v \quad (1)$$

Graficando el  $\log r_{rms}$  vs.  $\log v$  se puede obtener la pendiente de la gráfica. Para moléculas esféricas  $v = 0,33$ , para moléculas en forma de barra  $\gamma$  es cercano a 1 y para moléculas en forma de espiral aleatoria  $\gamma$  está entre 0, 0,5-0,6. Este enfoque puede ser muy útil para poder distinguir entre las diferentes conformaciones dentro de la distribución de partículas obtenidas en el AF4. Un inconveniente es que el valor de  $\gamma$  es muy sensible a errores cuando obtienen datos de muestras con alto ruido de fondo.

**Tabla 1.** Valores Calculados de la relación  $r_{rms}/r_h$  para diferentes objetos

Objeto	$r_{rms}/r_h$
Esfera homogénea	0,775 <sup>28</sup>
Barra (rod)	
Relación Axia = 25	2,1 <sup>28</sup>
Relación Axia = 100	2,8 <sup>28</sup>
Espiral (randon coil)	
$\theta$ condiciones	1,50 <sup>29</sup>
solvente adecuado	1,78 <sup>29</sup>
Polímeros ramificados de forma aleatoria	1,73 <sup>30</sup>
Polímeros altamente ramificados	1,23 <sup>30</sup>

Otro parámetro conformacional interesante es la relación entre  $r_{rms}$  y  $r_h$ . Como se discutió anteriormente  $r_h$  puede obtenerse de manera directa de los tiempos de elución en AF4. Esta relación puede proporcionarnos información valiosa acerca de la conformación y la forma de las macromoléculas. Para una molécula de forma esférica uniforme (con un  $r_h$  idéntico al radio geométrico) la relación es igual a 0,775. Las relaciones típicas de macromoléculas están entre 1 y 2. Los valores mayores a 2 generalmente indican anisotropía entre las moléculas, conformaciones muy alargadas. Relaciones  $< 0,7$  son típicamente de moléculas altamente infladas o micro geles<sup>31</sup>. En la Tabla 1 se muestran valores teóricos de la relación  $r_{rms}/r_h$  obtenidos usando simulaciones, mientras que en la Tabla 2 se muestran valores experimentales que son usados para distinguir entre diferentes conformaciones basados en la distribución de tamaño de las partículas.



**Tabla 2.** Valores de  $M$  y de la relación  $r_{rms}/r_h$  de algunos polímeros obtenidos experimentalmente

Polímero	$M$ rango( $10^6$ g/mol)	$r_{rms}/r_h$
Acetato de polivinilo(microgeles)	32-423	0,54-0,60 <sup>31</sup>
Alginato	0,06 -1,0	1,1-2,5 <sup>32</sup>
Almidón	78-270	1.02-1.29 <sup>33</sup>
Amilopectina	0,02-1	1,64-2,20 <sup>34</sup>
Amilosa	0,15-20	0,3-2.0b <sup>35</sup>
Beta glucanos( cereal)	0.8-2.0b	40-104 <sup>36</sup>
Caseina(Micelas)	0,23-5,0a	1,71-2,64 <sup>37</sup>
Celulosas (mofidicadas, no aniónicas)	0,03-0,7	1,3-1,7 <sup>38</sup>
Dextrano	0,0013-2,66 <sup>a</sup>	1,00-1,27 <sup>39</sup>
Glucogeno	2,36-42,37	0,68-0,73 <sup>40</sup>
Glucopolímeros Hiper-ramificados	1,9-35,9	0,4-1,5 <sup>41</sup>
Goma Arábica	2-10	0,6-1,0 <sup>42</sup>
“	0,15-30	1,0-3,0 <sup>43</sup>
Goma Carragan	0,01-4	1,96 <sup>44</sup>
Goma Mesquita	1,5-5,0	1,7-3 <sup>43</sup>
Goma Xantan	1,37-2,94a	2,17-2,95 <sup>45</sup>
Pululan	0,15-0,9	1,1-1,5 <sup>38</sup>
Vesículas extracelulares(exosomas)		0,84 <sup>46</sup>
Vesículas lipídicas unilaminares (cerebro de cerdo)		0,97-1,10 <sup>47</sup>

Además se ha propuesto que la relación  $r_{rms}/r_h$  junto a la densidad aparente como medio para distinguir entre estructuras agregadas y no agregadas en una población<sup>35,36</sup>.

La densidad aparente a través de la distribución de tamaño puede ser obtenida a través del cálculo de  $M$  (masa molar) y los datos de los radios, utilizando cualquiera  $r_{rms}$  o  $r_h$  como:

$$\bar{\rho}_{rms,i} = \frac{M_i}{V(r_{rms})_i \cdot N_A} \cdot \alpha \text{ o } \bar{\rho}_{h,i} = \frac{M_i}{V(r_h)_i \cdot N_A} \quad (2)$$

Donde  $M_i$  es la masa molar de la fracción  $i$ ,  $V_i$  el volumen de la fracción  $i$ ,  $N_A$  el número de Avogadro y  $\alpha$  se obtiene de la siguiente ecuación, donde  $r$  es el radio geométrico de una esfera.

$$\alpha = \frac{V_{esfera}(r_{rms})}{V_{esfera}(r)} = \frac{r_{rms}^3}{r^3} = \frac{\left(\sqrt{\frac{3}{5}} \cdot r\right)^3}{r^3} = \left(\frac{3}{5}\right)^{\frac{3}{2}} \quad (3)$$

Aunque la densidad en este caso es una propiedad aparente, ésta describe la distribución de masa en los volúmenes de cada fracción y por lo tanto proporciona información acerca del escalamiento de una población macromolecular. Indirectamente, la densidad aparente describe el volumen aparente de las moléculas. Esto puede ser considerado como una influencia en parámetros fundamentales como por ejemplo el apantallamiento de la concentración para una macromolécula, por ejemplo la transición de una solución diluida a una semi-diluida donde la viscosidad de la solución comienza a ser fuertemente dependiente de la concentración de la macromolécula. Esta relación fue observada en almidones con alto contenido de amilopectina<sup>48</sup>. La densidad aparente también está relacionada con el grado de ramificación (GR), mientras más ramificada sea una molécula se espera que presente una densidad aparente alta en comparación con moléculas no ramificadas. Por ejemplo el glucógeno que es una molécula formada por enlaces  $\alpha(1-4)$  glucanos unidos a ramificaciones de tipo  $\alpha(1-6)$ , pero con un (GR) 0,07-0,10<sup>48</sup>, presenta una densidad aparente mayor que la amilopectina, la cual presenta el mismo tipo de enlaces  $\alpha(1-4)$  glucanos con ramificaciones de tipo  $\alpha(1-6)$ , pero un con un GR igual a 0,05<sup>49,50</sup>.



Otro de los usos de los datos obtenidos por difracción de la luz para determinar la conformación de polímeros es la creación de los gráficos denominados de Kratky<sup>51,52</sup>, los cuales requieren alta calidad en los datos obtenidos por difracción de la luz<sup>53</sup>. En este método los gráficos obtenidos experimentalmente son comparados con otros construidos de forma teórica para diferentes formas y estructuras de macromoléculas. En general los gráficos de Kratky son muy útiles para la caracterización de macromoléculas con valores de detección de  $r_{rms} \geq 100$  nm y sirve para la detección de moléculas ramificadas<sup>29</sup> o distinguir moléculas agregadas<sup>54</sup>. En la caso particular de muestras de alimentos los gráficos de Kratky han sido construidos a partir de la técnica AF4-MALS en la caracterización de amilopectina<sup>55</sup>.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la agencia de cooperación sueca para el desarrollo (SIDA). Al licenciado René Soto I. Carrera de Ciencias Químicas, UMSA, por la elaboración de la figura 1.

## REFERENCIAS

1. Wahlund, K.G., Giddings, J.C. **1987**, Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. *Anal Chem.*;59(9):1332-1339. doi:10.1021/ac00136a016.
2. Nilsson, L. **2013**, Separation and characterization of food macromolecules using field-flow fractionation: A review. *Food Hydrocoll.*;30(1):1-11. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.04.007.
3. Litzén, A., Wahlund, K.G. **1989**, Improved separation speed and efficiency for proteins, nucleic acids and viruses in asymmetrical flow field flow fractionation. *J Chromatogr A.*;476(C):413-421. doi:10.1016/S0021-9673(01)93885-3.
4. Wahlund, K.G., Litzén, A. **1989**, Application of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel to the separation and characterization of proteins, plasmids, plasmid fragments, polysaccharides and unicellular algae. *J Chromatogr A.*;461(C):73-87. doi:10.1016/S0021-9673(00)94276-6.
5. Adolphi, U., Kulicke, W. **1997**, Dimensions and Conformation of Macromolecules in Aqueous Media From Flow Field-Flow Fractionation/Multi-Angle Laser Light Scattering Illustrated By Studies on Pullulan. *Polymer (Guildf.)*;38(7):1513-1519. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386196006751>.
6. Roessner, D., Kulicke, W.M. **1994**, On-line coupling of flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering. *J Chromatogr A.*;687(2):249-258. doi:10.1016/0021-9673(94)00818-3.
7. Wittgren, B., Wahlund, K.G. **1997**, Fast molecular mass and size characterization of polysaccharides using asymmetrical flow field-flow fractionation-multiangle light scattering. *J Chromatogr A.*;760(2):205-218. doi:10.1016/S0021-9673(96)00777-7.
8. Wahlund, K.G. *Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation*. In M. E. Schimpf, K. Caldwell, & J. C. Giddings (Eds.), *Field-Flow Fractionation Handbook*. (Schimpf ME, K. Caldwell & JCG, eds.). New York: John Wiley & Sons Inc; **2000**.
9. You, S., Stevenson, S.G., Izydorczyk, M.S., Preston, K.R. **2002**, Separation and characterization of Barley starch polymers by a flow field-flow fractionation technique in combination with multiangle light scattering and differential refractive index detection. *Cereal Chem.*, 79(5):624-630. doi:10.1094/cchem.2002.79.5.624.
10. Kirkland, J.J., Dilks, C.H., Rementer, S.W., Yau, W.W. **1992**, Asymmetric-channel flow field-flow fractionation with exponential force-field programming. *J Chromatogr A.*;593(1-2):339-355. doi:10.1016/0021-9673(92)80303-C.
11. Leeman, M., Wahlund, K.G., Wittgren, B. **2006**, Programmed cross flow asymmetrical flow field-flow fractionation for the size separation of pullulans and hydroxypropyl cellulose. *J Chromatogr A.*;1134(1-2):236-245. doi:10.1016/j.chroma.2006.08.065.
12. Wahlund, K.G., Winegarner, H.S., Caldwell, K.D., Giddings, J.C. **1986**, Improved flow field-flow fractionation system applied to water-soluble polymers: programming, outlet stream splitting, and flow optimization. *Anal Chem.*;58(3):573-578. doi:10.1021/ac00294a018.
13. Debye, P. **1944**, Light scattering in solutions. *J Appl Phys.*;15(4):338-342. doi:10.1063/1.1707436.
14. Zimm, B.H. **1948**, Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering; preliminary results on polystyrene solutions. *J Chem Phys.*;16(12):1099. doi:10.1063/1.1746740.
15. Zimm, B.H. **1948**, The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. *J Chem Phys.*;16(12):1093. doi:10.1063/1.1746738.
16. Berry, G.C. **1966**, Thermodynamic and conformational properties of polystyrene. I. Light-scattering studies on dilute solutions of linear polystyrenes. *J Chem Phys.*;44(12):4550 - &. doi:10.1063/1.1726673.
17. Andersson, M., Wittgren, B., Wahlund, K. **2003**, Accuracy in Multiangle Light Scattering Measurements for Molar Mass and Radius Estimations . Model Calculations and Experiments Accuracy in Multiangle Light Scattering Measurements for Molar Mass and Radius Estimations . Model Calculations and Experiments.;75(16):4279-4291. doi:10.1021/ac030128.
18. Kerker, M. *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation*. New York: Academic Press; 1969.
19. Schärftl, W. **2007**, *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg;. doi:10.1007/978-3-540-71951-9.
20. Van de Hulst, H.C. **1981**, *Light Scattering by Small Particles*. New York: Dover Books on Physics;.
21. Litzén, A. **1993**, Separation speed, retention, and dispersion in asymmetrical flow field-flow fractionation as functions of channel dimensions and flow rates. *Anal Chem.*;65(12):461-40. doi:10.1021/ac00052a025.
22. Einstein, A. **1905**, Über die von der molekularkinatischen theorie der warma geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen. *Ann Phys.*;14:549-560.
23. Williams, P.S. Programmed field-flow fractionation: retention. In: Schimpf ME, K. C, Giddings JC, eds. *Field-Flow*



- Fractionation Handbook*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000:145-166.
24. Nilsson, L., Leeman, M., Wahlund, K-G., Bergenstahl, B. 2006, Mechanical degradation and changes in hydrophobically modified starch. *Biomacromolecules*.;7:2671-2679.
  25. Hansen, M.E., Giddings, J.C., Schure, M.R., Beckett, R. 1988, Corrections for secondary relaxation in exponentially programmed field-flow fractionation. *Anal Chem.*;60(8):1434-1442. doi:10.1021/ac00165a018.
  26. Yau, W.W., Kirkland, J.J. 1984, Nonequilibrium Effects in Sedimentation Field Flow Fractionation. *Anal Chem.*;56(14):1461-1466.
  27. Rolland-Sabaté, A., Guilois, S., Jaillais, B., Colonna, P. 2011, Molecular size and mass distributions of native starches using complementary separation methods: Asymmetrical flow field flow fractionation (A4F) and hydrodynamic and size exclusion chromatography (HDC-SEC). *Anal Bioanal Chem.*;399(4):1493-1505. doi:10.1007/s00216-010-4208-4.
  28. Hansen, S. 2004, Translational friction coefficients for cylinders of arbitrary axial ratios estimated by Monte Carlo simulation. *J Chem Phys.*;121(18):9111-9115. doi:10.1063/1.1803533.
  29. Burchard, W. 1983, Static and dynamic light scattering from branched polymers and bio-polymers. *Adv Polym Sci.*;48:1-124.
  30. Burchard, W. 1999, Solution properties of branched macromolecules. *Adv Polym Sci.*;143:113-194.
  31. Schmidt, M., Nerge, r D., Burchard, W. 1979, Quasi-elastic light scattering from branched polymers: 1. Polyvinylacetate and polyvinylacetate-microgels prepared by emulsion polymerization. *Polymer (Guildf).*;20(5):582-588. doi:10.1016/0032-3861(79)90169-1.
  32. Alasonati, E., Stolpe, B., Benincasa, M., Hasselov, M., Slaveykova, V. 2006, Asymmetrical flow field flow fractionation - multidetection system as a tool for studying metal-alginate interactions. *Environ Chem.*;3(3):192-198.
  33. Roger, P., Colonna, P. The influence of chain length on the hydrodynamic behaviour of amylose. *Carbohydr Res.* 1992;227(C):73-83. doi:10.1016/0008-6215(92)85061-4.
  34. Roger, P., Bello-Perez, L.A., Colonna, P. 1999, Contribution of amylose and amylopectin to the light scattering behaviour of starches in aqueous solution. *Polymer (Guildf).*;40(25):6897-6909. doi:10.1016/S0032-3861(99)00051-8.
  35. Hakansson, A., Ulmius, M., Nilsson, L. 2012, Asymmetrical flow field-flow fractionation enables the characterization of molecular and supramolecular properties of cereal beta-glucan dispersions. *Carbohydr Polym.*;87(1):518-523. doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.014.
  36. Glantz, M., Hakansson, A., Lindmark, M.H., Paulsson, M., Nilsson, L. 2010, Revealing the size, conformation, and shape of casein micelles and aggregates with asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering. *Langmuir.*;26(15):12585-12591. doi:10.1021/la101892x.
  37. Nilsson, S., Sundelöf, L.O., Porsch, B. 1996, On the characterization principles of some technically important water-soluble nonionic cellulose derivatives. Part II: Surface tension and interaction with a surfactant. *Carbohydr Polym.*;29(2):119-127. doi:10.1016/0144-8617(96)00010-0.
  38. Viebke, C., Williams, P. 2000, The influence of temperature on the characterization of water-soluble polymers using asymmetrical. *Anal Chem.*;72(16):3896-3901.
  39. Ioan, C.E., Aberle, T., Burchard, W. 2000, Structure properties of dextran. 2. Dilute solution. *Macromolecules.*;33(15):5730-5739. doi:10.1021/ma000282n.
  40. Rolland-Sabaté, A., Guilois, S., Grimaud, F., et al. 2014, Characterization of hyperbranched glycopolymers produced in vitro using enzymes. *Anal Bioanal Chem.*;406:1607-1618. doi:10.1007/s00216-013-7403-2.
  41. Fernandez, C., Roja,s C.C., Nilsson, L. 2011, Size, structure and scaling relationships in glycogen from various sources investigated with asymmetrical flow field-flow fractionation and 1H NMR. *Int J Biol Macromol.*;49(4):458-465. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.05.016.
  42. Picton, L., Bataille, I., Muller, G. 2000, Analysis of a complex polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation. *Carbohydr Polym.*;42(1):23-31. doi:10.1016/S0144-8617(99)00139-3.
  43. Alfrén, J., Peñarrieta, J.M., Bergenstahl, B., Nilsson, L. 2012, Comparison of molecular and emulsifying properties of gum arabic and mesquite gum using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Food Hydrocoll.*;26(1):54-62. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.04.008.
  44. Wittgren, B., Borgström, J., Piculell, L., Wahlund, K.G. 1998, Conformational change and aggregation of kappa-carrageenan studied by flow field-flow fractionation and multiangle light scattering. *Biopolymers.*;45(1):85-96. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(199801)45:1<85::AID-BIP7>3.0.CO;2-V.
  45. Coviello, T., Kajiwar, K., Crescenzi, V. Solution Properties of Xanthan. 1986, 1. Dynamic and Static Light Scattering. *Macromolecules.*;19(11):2826-2831.
  46. Sitar, S., Kejzar, A., Pahovnik, D., et al. 2015, Size Characterization and Quantification of Exosomes by Asymmetrical-Flow Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.*;87(18):9225-9233. doi:10.1021/acs.analchem.5b01636.
  47. Vezocnik, V., Rebolj, K., Sitar, S., et al. 2015, Size fractionation and size characterization of nanoemulsions of lipid droplets and large unilamellar lipid vesicles by asymmetric-flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering and dynamic light scattering. *J Chromatogr A.*;1418:185-191. doi:10.1016/j.chroma.2015.09.048.
  48. Rojas, C.C., Wahlund, K.G., Bergenstahl, B., Nilsson, L. 2008, Macromolecular geometries determined with field-flow fractionation and their impact on the overlap concentration. *Biomacromolecules.*;9(6):1684-1690. doi:10.1021/bm800127n.
  49. Nilsson, L., Bergenstahl, B.. 2006, Adsorption of hydrophobically modified starch at oil/water interfaces during emulsification. *Langmuir.*;22(21):8770-8776. doi:10.1021/la060870f.
  50. Nilsson, L., Bergenstahl, B. 2007, Emulsification and Adsorption Properties of Hydrophobically Modified Potato and Barley Starch. *J Agric Food Chem.*;55:1469-1474.
  51. Burchard, W., Vogel, H. 2000, Particle scattering form factors of chemical and conformational triblock copolymers. *Comput Theor Polym Sci.*;10(1-2):133-148.
  52. Kratky, O., Porod, G. 1949, Röntgenuntersuchung geloster fadenmoleküle. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands. Chem Soc.*;68(12):1106-1122.
  53. Kratochvil, P. *Classical Light Scattering from Polymer Solutions*. (Publishers ES, ed.). Amsterdam; 1987.



- 
54. Andersson, M., Wittgren, B., Schagerlöf, H., Momcilovic, D., Wahlund, K.G. **2004**, Size and structure characterization of ethylhydroxyethyl cellulose by the combination of field-flow fractionation with other techniques. Investigation of ultralarge components. *Biomacromolecules.*;5(1):97-105. doi:10.1021/bm030051z.
  55. Rolland-Sabaté, A., Colonna, P., Mendez-Montealvo, M.G., Planchot, V. **2007**, Branching features of amylopectins and glycogen determined by asymmetrical flow field flow fractionation coupled with multiangle laser light scattering. *Biomacromolecules.*;8(8):2520-2532. doi:10.1021/bm070024z.