



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VIABILIDAD DE CÉLULAS DE *E. COLI* BL21 DENTRO DE MICROGOTAS EN
MICROCHIPS POR MEDIO DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA

ARTURO ROMERO GARCÍA



MÉXICO, D.F

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profa. Aurora de los Ángeles Ramos Mejía

VOCAL: Prof. Mariano Pérez Camacho

SECRETARIO: Prof. Luis Fernando Olguín Contreras

1er. SUPLENTE: Profa. Ma. Guadalupe Lemus Barajas

2° SUPLENTE: Prof. Óscar Hernández Meléndez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOFISICOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

CENTRO DE CIENCIAS APLICADAS Y DESARROLLO TECNOLÓGICO CCADET, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Luis Fernando Olguín Contreras _____

SUSTENTANTE:

Arturo Romero García _____

Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto titulado:

"IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS
UTILIZANDO ENSAYOS EN MICROCHIPS" Clave: 153208 (CB-2010-0).

Por medio del cual recibí una beca nivel I para la realización de esta tesis de licenciatura.

Además, agradezco al Dr. Luis Olguín por sus consejos y su paciencia. Siempre le estaré agradecido por el apoyo y confianza que depositó en mí, la experiencia adquirida en el laboratorio, además de enriquecedora, fue muy gratificante.

A mis padres. De cada uno sigo aprendiendo cualidades que considero esenciales para la etapa que he de comenzar. Mamá, gracias por tu amor incondicional y por enseñarme a preocuparme sólo de las cosas importantes. Papá, tu ejemplo de tenacidad y trabajo duro es un ejemplo que siempre valoraré.

A mis hermanos por echarme la mano cuando hizo falta.

Por último, a todos los amigos y compañeros que estuvieron y siguen en el Laboratorio de Biofisiología.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2	OBJETIVOS	2
1.3	HIPÓTESIS.....	3
2	ANTECEDENTES	4
2.1	MICROFLUÍDICA Y SISTEMAS “LAB-ON-A-CHIP”	4
2.1.1	Dinámica del flujo en microcanales	5
2.2	LITOGRAFÍA SUAVE.....	9
2.3	FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER	11
2.4	VIABILIDAD CELULAR.....	12
3	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	14
3.1	DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL MICROCHIP.....	14
3.1.1	Fabricación de moldes por medio de fotolitografía.....	15
3.1.2	Fabricación de microchips a partir de PDMS.....	17
3.2	PROTOCOLO PARA EL CRECIMIENTO Y TINCIÓN DE CULTIVOS DE <i>E. COLI</i>	20
3.3	FUNCIONAMIENTO DEL ARREGLO EXPERIMENTAL	23
3.4	OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE SEÑALES POR MEDIO DE MATLAB	26
3.5	ENSAYOS PARA CARACTERIZAR CÉLULAS DE <i>E. COLI</i>	28
3.5.1	Experimentos con células vivas y muertas	29
3.6	ENSAYOS PARA COMPROBAR EL EFECTO DE LA AMPICILINA EN CÉLULAS DE <i>E. COLI</i>	32
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	RESULTADOS DE LA FABRICACIÓN DE LOS MOLDES Y RÉPLICAS.....	34
4.2	ENSAYOS PARA CARACTERIZAR LA FLUORESCENCIA DE LAS CÉLULAS DE <i>E. COLI</i>	38
4.2.1	Pruebas con células vivas.....	45
4.2.2	Pruebas con células muertas.....	50
4.2.3	Pruebas con mezclas de células vivas y muertas	52
4.3	ENSAYOS PARA COMPROBAR EL EFECTO DE AMPICILINA EN CÉLULAS DE <i>E. COLI</i>	65
4.3.1	Efecto de la ampicilina en un cultivo de <i>E. coli</i> medido dentro de un microchip	65

4.3.2	Efecto en la viabilidad de las células sin ampicilina a lo largo del microchip	68
4.3.3	Efecto en la viabilidad de las células con ampicilina a lo largo del microchip	73
5	CONCLUSIONES	78
	BIBLIOGRAFÍA	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Elementos principales de un sistema Lab-on-a-chip, tomado de [5].	5
Figura 2.2	Perfil de flujo laminar en un microcanal. Al ser aplicado un gradiente de presión $-VP$ se genera un perfil parabólico. Del lado derecho se muestra la forma en que fluye el volumen de un fluido en los primeros 165 ms. Tomado de [8].	6
Figura 2.3	Corrientes de recirculación dentro y fuera de la gota. Tomado de [10].	7
Figura 2.4	Transformación o proceso del panadero (baker's transformation). Este consiste en reorientar, estirar y doblar un volumen del fluido para hacer más eficiente el mezclado. Adaptado de [11].	8
Figura 2.5	Las propiedades físicas del PDMS lo hacen un material idóneo para fabricar microchips.	10
Figura 2.6	Esquema general para la obtención de microchips de PDMS. A) Fabricación de moldes por fotolitografía. B) Fabricación de microchips por litografía suave a partir del molde producido por fotolitografía.	10
Figura 2.7	Secuencia de imágenes donde se aprecia el avance de la gota de fluoresceína sobre un área iluminada con láser.	11
Figura 2.8	Gracias a los tintes, la viabilidad de las células se determina por la fluorescencia emitida. Las células vivas emiten fluorescencia verde, las células muertas, en cambio, fluorescen de color rojo.	13
Figura 3.1	Formación de microgotas de agua debido a la constricción de dos corrientes de aceite.	14
Figura 3.2	Esquema general del proceso de fabricación de un molde de fotorresina SU-8 en un sustrato de silicio.	15
Figura 3.3	Activación de las superficies por medio de descarga o efecto corona.	19
Figura 3.4	Diagrama del arreglo experimental para la detección de fluorescencia en microgotas. Tomado de [19].	23
Figura 3.5	La muestra se carga en las bombas de infusión (NE-300, New Era Pump Systems Inc.)	24
Figura 3.6	Arreglo experimental en funcionamiento. Se observa el haz del láser incidiendo sobre el microchip. Normalmente se trabaja sin iluminación para evitar dañar el fotodiodo de avalancha (APD).	25
Figura 3.7	Interfaz de usuario del programa iPeak.	26
Figura 3.8	Las condiciones experimentales fueron determinadas haciendo mediciones de fluorescencia a una distancia de entre 1.8 y 2 mm de la zona de formación de gotas.	28
Figura 3.9	Esquema de los ensayos con células vivas y muertas. El punto A indica el lugar donde se realizaron las mediciones de fluorescencia.	30

Figura 3.10	Esquema de los ensayos para caracterizar las señales de mezclas de células vivas y muertas.	31
Figura 3.11	Esquema del primer ensayo con ampicilina. El punto A indica el lugar donde se realizaron las mediciones de fluorescencia.	32
Figura 3.12	Esquema del segundo experimento con ampicilina, en donde las células y el antibiótico se bombean por separado, Las mediciones se hicieron en los puntos A y B.	33
Figura 4.1	Zona de formación de microgotas. A la izquierda se observa el diseño original, en medio, el diseño modificado y a la derecha se observa la formación de microgotas.	34
Figura 4.2	Patrón de canales basado en la geometría de los fractales.	35
Figura 4.3	Arreglos que se establecieron para aprovechar el espacio disponible en las obleas de silicio.	36
Figura 4.4	La reducción del ancho de los canales en la máscara también se hizo presente en las réplicas de PDMS, los canales se diseñaron con 100 μm de ancho.	36
Figura 4.5	El funcionamiento de los microchips con canales de 150 μm fue satisfactorio.	37
Figura 4.6	A la izquierda se muestra una réplica de PDMS pegada a un portaobjetos, mientras que el microchip de la derecha está hecho totalmente de PDMS. Ambos microchips funcionaron correctamente.	37
Figura 4.7	Diagrama que detalla el funcionamiento del arreglo óptico. Adaptado de [19]	38
Figura 4.8	En la parte superior se muestran las señales de 34 gotas que fueron registradas en 10 s. En la parte inferior izquierda se muestra la señal típica de fluorescencia de una gota sin células y a la derecha, las señales de fluorescencia de una gota con cuatro células detectadas. Las imágenes inferiores son únicamente representativas.	39
Figura 4.9	La estructura molecular de la povidona es parecida a la de las bases nitrogenadas del ADN.	43
Figura 4.10	Comparación entre las intensidades de las señales usando el láser a 2 mW (verde) y a 10 mW (azul). Condiciones: 90 $\mu\text{L}/\text{h}$ de cultivo celular, 90 $\mu\text{L}/\text{h}$ de aceite, Objetivo: 40x.	44
Figura 4.11	Con $\text{DO}_{670}=0.84$ el número de células por gota resulta excesivo.	45
Figura 4.12	El número de células por gota disminuyó al fijar la $\text{DO}_{670}=0.1$.	46
Figura 4.13	La fluorescencia verde muestra picos, indicando la presencia de células vivas; con el filtro rojo no se detectaron señales de células, en este caso muertas, en las gotas.	50
Figura 4.14	Señales emitidas por células tratadas con calor. En verde se graficaron las señales que pasaron a través del verde; en rojo, las señales que atravesaron el filtro rojo.	51
Figura 4.15	En verde se grafica la intensidad de la fluorescencia de las gotas y las células en la entrada del microchip y en rojo, la fluorescencia a la salida.	68

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 4-1	<i>Variación de la intensidad de la fluorescencia de las microgotas al cambiar la concentración de tintes.</i>	40
Gráfica 4-2	<i>Variación de la intensidad de la fluorescencia al cambiar el flujo de las microgotas. Flujo de aceite: 90 $\mu\text{L/h}$, 13.36 μM SYTO 9 y 80 μM IP.</i>	41
Gráfica 4-3	<i>Variación de la intensidad de la fluorescencia al cambiar la concentración de Percoll.</i>	42
Gráfica 4-4	<i>Efecto del aumento de la potencia del láser sobre la fluorescencia.</i>	44
Gráfica 4-5	<i>Distribución del número de células verdes detectadas por gota para diferentes concentraciones de células y flujo constante (células: 30 $\mu\text{L/h}$, aceite: 90 $\mu\text{L/h}$). Potencia del láser: 8.5 mW, Objetivo 40x, concentración de los tintes 5.01 μM SYTO 9 y 30 μM IP, 80% vol. Percoll. Densidades ópticas (DO) a 670 nm.</i>	47
Gráfica 4-6	<i>Distribución del número de células verdes detectadas por gota para diferentes flujos de células (30, 60 y 90 $\mu\text{L/h}$), $\text{DO}_{670}=0.15$, flujo de aceite de 90 $\mu\text{L/h}$. Potencia del láser: 8.5 mW, Objetivo 40x, concentración de los tintes 5.01 μM SYTO 9 y 30 μM IP, 80% vol. Percoll.</i>	47
Gráfica 4-7	<i>Distribución del intensidad de fluorescencia de células vivas para diferentes flujos de células (30, 60 y 90 $\mu\text{L/h}$), $\text{DO}_{670}=0.15$, flujo de aceite de 90 $\mu\text{L/h}$. Potencia del láser: 8.5 mW, Objetivo 40x, concentración de los tintes 5.01 μM SYTO 9 y 30 μM IP, 80% vol. Percoll.</i>	48
Gráfica 4-8	<i>Polígonos de frecuencias teóricos de la distribución de Poisson para diversos valores de la media.</i>	49
Gráfica 4-9	<i>Polígonos de frecuencia experimentales de la distribución del número de células por gota para diferentes concentraciones de células.</i>	49
Gráfica 4-10	<i>Distribuciones del número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células muertas y manteniendo constante el flujo de células vivas.</i>	53
Gráfica 4-11	<i>Distribuciones del número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células muertas y manteniendo constante el flujo de células vivas.</i>	54
Gráfica 4-12	<i>Mediciones de intensidad de fluorescencia de células verdes, manteniendo constante el flujo de células vivas y aumentando el de células muertas.</i>	54
Gráfica 4-13	<i>Distribuciones de intensidad de fluorescencia de células rojas, mientras se incrementa el flujo de células muertas, manteniendo el flujo de células vivas constante.</i>	55
Gráfica 4-14	<i>Distribuciones del número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células vivas y manteniendo constante el flujo de células muertas.</i>	56
Gráfica 4-15	<i>Distribuciones del número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células vivas y manteniendo constante el flujo de células muertas.</i>	57

<i>Gráfica 4-16 Distribuciones de intensidad de fluorescencia de células verdes, mientras se incrementa el flujo de células vivas, manteniendo el flujo de células muertas constante.</i>	58
<i>Gráfica 4-17 Distribuciones de intensidad de fluorescencia de células rojas, mientras se incrementa el flujo de células vivas, manteniendo el flujo de células muertas constante.</i>	58
<i>Gráfica 4-18 Distribuciones del número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células muertas y disminuyendo el flujo de células vivas.</i>	60
<i>Gráfica 4-19 Distribuciones del número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células muertas y disminuyendo el flujo de células vivas.</i>	61
<i>Gráfica 4-20 Distribuciones del número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células vivas y disminuyendo el flujo de células muertas.</i>	62
<i>Gráfica 4-21 Distribuciones del número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células vivas y disminuyendo el flujo de células muertas.</i>	63
<i>Gráfica 4-22 Distribuciones del número de células verdes detectadas por gota del cultivo con ampicilina. Se observa que la ampicilina provoca un descenso en el número de células por gota conforme avanza el tiempo.</i>	66
<i>Gráfica 4-23 Distribuciones del número de células rojas detectadas por gota del cultivo con ampicilina. Se observa un descenso más pronunciado en el número de células rojas que las verdes.</i>	67
<i>Gráfica 4-24 Distribuciones del número de células con fluorescencia verde por gota a la entrada y salida del microchip.</i>	69
<i>Gráfica 4-25 Fluorescencia verde a la entrada y salida del microchip sin ampicilina tomando en cuenta la fluorescencia causada por las células y las gotas.</i>	70
<i>Gráfica 4-26 Fluorescencia de las células verdes a la entrada y salida del microchip sin ampicilina sin tomar en cuenta la fluorescencia asociada a las gotas.</i>	71
<i>Gráfica 4-27 Células detectadas con el filtro rojo.</i>	72
<i>Gráfica 4-28 Fluorescencia de las células rojas a la entrada y salida del microchip sin tomar en cuenta la fluorescencia asociada a las gotas.</i>	73
<i>Gráfica 4-29 Distribuciones del número de células verdes por cada gota con ampicilina en la entrada y la salida del microchip.</i>	74
<i>Gráfica 4-30 Comparación entre la intensidad de la fluorescencia verde de las células tratadas con ampicilina en la entrada y salida del microchip sin tomar en cuenta la fluorescencia asociada a las gotas.</i>	75
<i>Gráfica 4-31 Distribuciones del número de células rojas por cada gota con ampicilina en la entrada y la salida del microchip.</i>	76
<i>Gráfica 4-32 Fluorescencia de las células rojas a la entrada y salida del microchip.</i>	76

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 4—1 Variación de la intensidad de la fluorescencia de las microgotas al cambiar la concentración de tintes.</i>	40
<i>Tabla 4—2 Variación de la intensidad de la fluorescencia al cambiar el flujo de las microgotas. Flujo de aceite: 90 $\mu\text{L/h}$, 13.36 μM SYTO 9 y 80 μM IP.</i>	41
<i>Tabla 4—3 Intensidad de la fluorescencia al cambiar la concentración de Percoll.</i>	42
<i>Tabla 4—4 Efecto del aumento de la potencia del láser sobre la fluorescencia.</i>	43
<i>Tabla 4—5 Número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células muertas y manteniendo constante el flujo de células vivas.</i>	52
<i>Tabla 4—6 Número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células muertas y manteniendo constante el flujo de células vivas.</i>	53
<i>Tabla 4—7 Número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células vivas y manteniendo constante el flujo de células muertas.</i>	56
<i>Tabla 4—8 Número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células vivas y manteniendo constante el flujo de células muertas.</i>	57
<i>Tabla 4—9 Número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células muertas y disminuyendo el flujo de células vivas.</i>	60
<i>Tabla 4—10 Número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células muertas y disminuyendo el flujo de células vivas.</i>	61
<i>Tabla 4—11 Número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células vivas y disminuyendo el flujo de células muertas.</i>	62
<i>Tabla 4—12 Número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células vivas y disminuyendo el flujo de células muertas.</i>	63
<i>Tabla 4—13 Número de células verdes detectadas por gota del cultivo con ampicilina.</i>	65
<i>Tabla 4—14 Número de células rojas detectadas por gota del cultivo con ampicilina. Se observa un descenso más pronunciado en el número de células rojas que las verdes.</i>	67
<i>Tabla 4—15 Número de células con fluorescencia verde por gota a la entrada y salida del microchip.</i>	69

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los mayores obstáculos en la investigación química y biológica en la actualidad es la necesidad de realizar un número considerable de pruebas independientes en un tiempo razonablemente corto y a un costo relativamente bajo. Por ejemplo, en la búsqueda de fármacos es necesario analizar y probar un amplio número de compuestos por separado, variando sus concentraciones y repitiendo los ensayos para verificar su efectividad [1].

Con el fin de aumentar el rendimiento, tanto de tiempo como de reactivos, los volúmenes para las pruebas se han reducido de los mililitros, en la década de los 70, hasta los microlitros en la época actual. Esto ha sido posible gracias a la introducción de las microplacas de 96, 384 y de 1536 pozos, estos últimos con una capacidad de 1 a 2 microlitros [2].

Sin embargo, aunque es posible trabajar manualmente con las placas de 96 pozos, el uso de placas con pozos de menor capacidad tiene como consecuencia que, dependiendo de la presión de vapor de la sustancia, la evaporación puede llegar a ser un problema importante, además de que la manipulación de volúmenes tan pequeños requiere de sistemas automatizados costosos.

El siguiente paso en la reducción de volúmenes de trabajo se encuentra en la manipulación de fluidos dentro de canales de escala micrométrica: la microfluídica. La complejidad y alcances en este campo han merecido el esfuerzo conjunto de investigadores especializados en áreas como la mecánica de fluidos, física aplicada, termodinámica, química, ciencia de materiales, bioquímica, biotecnología y medicina [3].

En este trabajo se diseñó un dispositivo microfluídico (microchip) capaz de encapsular células bacterianas en microgotas, se estableció un protocolo para teñir e identificar si las células se encontraban o no vivas y, por último, se comprobó el efecto de un antibiótico en las bacterias.

El protocolo implementado permitió identificar la fluorescencia generada por la presencia de células. La fluorescencia verde, causada tanto por células vivas o muertas, se utilizó como un parámetro para medir el efecto bactericida de la ampicilina.

1.2 OBJETIVOS

- Diseñar y fabricar canales microscópicos que permitan realizar ensayos bioquímicos con células bacterianas dentro de microgotas.
- Caracterizar, por medio de fluorescencia inducida por láser, si una célula bacteriana se encuentra viva o muerta.
- Probar el efecto de un antibiótico sobre las células bacterianas (*E. coli*).

1.3 HIPÓTESIS

En la actualidad, la oferta de kits o ensayos de viabilidad celular basados en fluorimetría es amplia. Con este tipo de pruebas se obtienen resultados rápidos, con una alta sensibilidad y reproducibilidad. La desventaja que presentan la mayoría de estos ensayos es el alto costo de los marcadores fluorescentes usados para determinar la viabilidad de las células. Los fabricantes han diseñado protocolos para realizar experimentos de viabilidad celular con equipos como citómetros de flujo, espectrofluorómetros y microscopios de fluorescencia.

Si es posible adaptar los protocolos para realizar ensayos de viabilidad celular en microgotas en microchips, entonces será posible determinar la efectividad de un antibiótico contra células bacterianas en las microgotas.

2 ANTECEDENTES

2.1 MICROFLUÍDICA Y SISTEMAS “LAB-ON-A-CHIP”

La ciencia que estudia la dinámica y las aplicaciones del movimiento de los fluidos en microcanales es la microfluídica. Los fluidos son sustancias cuyas fuerzas de atracción intermoleculares son más débiles que las presentes en los sólidos, de esta forma adoptan la forma del recipiente que los contiene, además de formar interfases fácilmente deformables entre fluidos inmiscibles. Se considera que la microfluídica está acotada a la manipulación de líquidos del orden de 10^{-9} a 10^{-18} litros y canales del rango de las decenas a cientos de micras [4]. Una de las principales aplicaciones que se han encontrado para esta tecnología es la de análisis químico, ya que ofrece varias ventajas como: ocupar cantidades muy pequeñas de muestras o reactivos, llevar a cabo separaciones y detecciones con una alta sensibilidad, reducir los tiempos para el procesamiento de las muestras y tener equipos más pequeños para dichos análisis.

En el sentido más amplio, el término “Lab-on-a-chip” hace referencia a sistemas microfluídicos que incluye elementos microelectromecánicos (MEMS) que son capaces de realizar todos los pasos de un análisis, como son el muestreo y el transporte de muestras, las reacciones químicas, la detección y separación del analito.

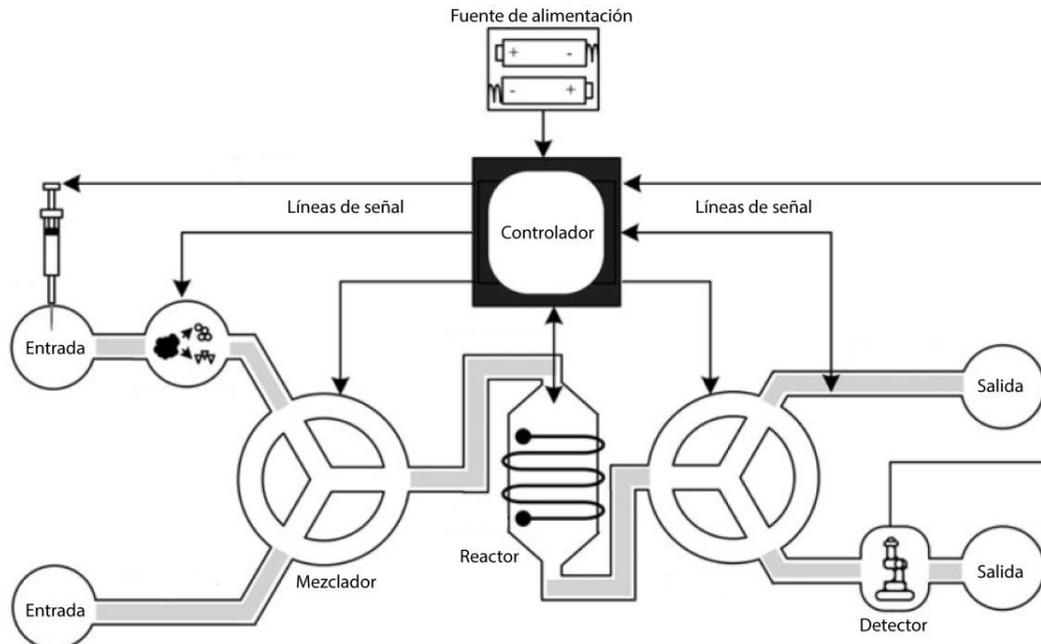


Figura 2.1 Elementos principales de un sistema Lab-on-a-chip, tomado de [5].

2.1.1 DINÁMICA DEL FLUJO EN MICROCANALES

Al tratar con fluidos a una escala tan reducida, se obtiene un perfil de flujo que es en capas o láminas ordenadas, esto resulta evidente si se presenta la ecuación del número de Reynolds:

Donde:

Re = Número de Reynolds.

ρ = Densidad del fluido.

v = Velocidad promedio del líquido.

D = Diámetro del canal.

μ = Viscosidad del fluido.

$$Re = \frac{\text{Fuerzas inerciales}}{\text{Fuerzas viscosas}} = \frac{\rho * v * D}{\mu}$$

$Re \leq 2000$ Flujo laminar

$Re \geq 40000$ Flujo turbulento

Si, por ejemplo, se hace fluir agua a través de un canal de $100\ \mu\text{m}$ de diámetro a una velocidad de $1\ \text{cm/s}$, se obtendrá un número de Reynolds cercano a 10 [6], lo que nos ubica en la región de flujo laminar, en donde el mezclado se realiza únicamente por difusión molecular. Además, la dispersión de Taylor (dispersión axial o longitudinal) genera contaminación entre reactivos y productos, y, dependiendo de la rapidez de reacción, se hace necesaria la implementación de canales relativamente largos haciendo poco práctico el uso del patrón de flujo continuo en microcanales [7].

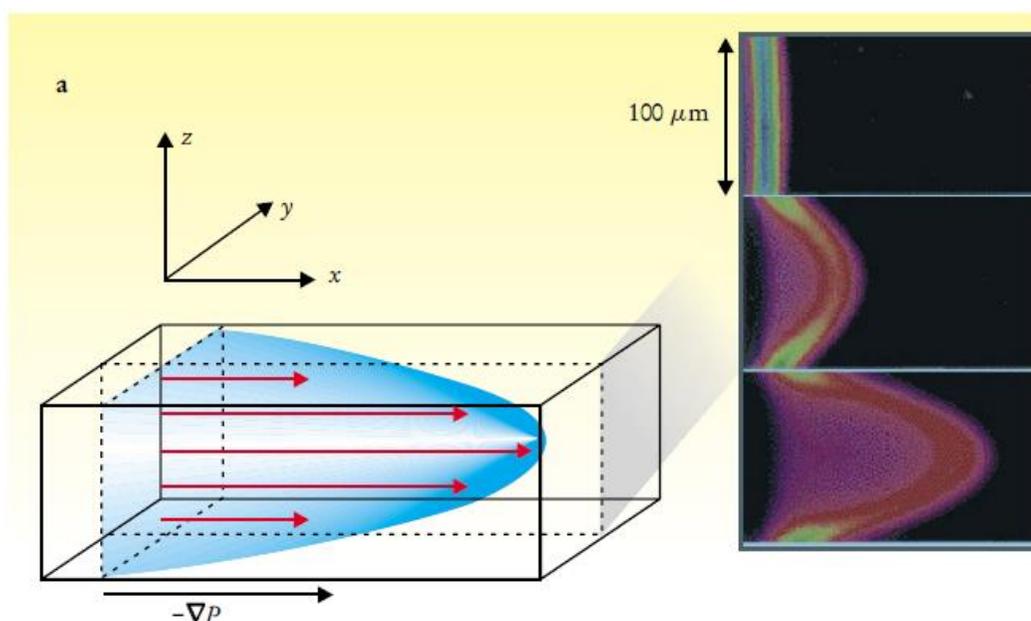


Figura 2.2 Perfil de flujo laminar en un microcanal. Al ser aplicado un gradiente de presión $-\nabla P$ se genera un perfil paraboloidal. Del lado derecho se muestra la forma en que fluye el volumen de un fluido en los primeros 165 ms. Tomado de [8].

2.1.1.1 Microfluídica basada en microgotas.

Algunos de los inconvenientes antes mencionados para el flujo laminar, se han superado al compartimentar o dividir el flujo continuo de reactivos por medio de una segunda fase inmiscible. A esta subcategoría de la microfluídica se le llama *droplet microfluidics* (microfluídica basada en microgotas) o microfluídica digital, debido al uso discreto de fluidos en contraposición a la naturaleza continua de otros sistemas

[9]. Es posible generar gotas cuyas dimensiones, dependiendo de la relación de flujos de ambas fases, pueden ir de las decenas hasta los cientos de micrómetros (10^{-6} m) de diámetro, volúmenes en el rango de los femtolitros (10^{-15} L) a los nanolitros (10^{-9} L) y frecuencias de formación de unos cuantos Hz a frecuencias superiores a 10 kHz. Las microgotas de agua en aceite formadas de esta manera tienen un tamaño prácticamente idéntico, presentando una desviación típica de 1% a 5%. Partículas, células y biomoléculas pueden ser encapsuladas de manera individual en las microgotas [3].

Además, debido a la alta relación entre área superficial y volumen, las transferencias de masa y calor son más eficientes y los tiempos de difusión y de reacción son más cortos. El mezclado de los componentes de la fase acuosa se puede mejorar aplicando cambios de volumen y de dirección de la gota.

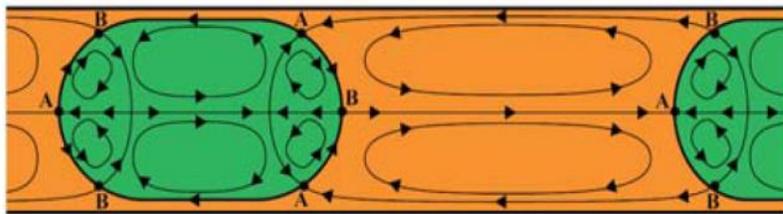


Figura 2.3 Corrientes de recirculación dentro y fuera de la gota. Tomado de [10].

Las microgotas pueden transportarse, mezclarse y analizarse de manera independiente, haciendo de cada gota un microrreactor con una composición química específica, lo que permite experimentar y procesar una gran cantidad de datos de manera eficiente.

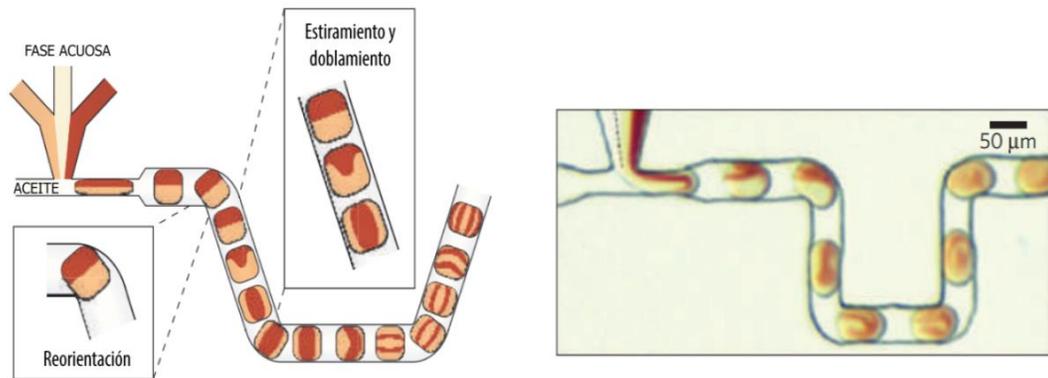


Figura 2.4 Transformación o proceso del panadero (baker's transformation). Este consiste en reorientar, estirar y doblar un volumen del fluido para hacer más eficiente el mezclado. Adaptado de [11].

Para evitar que las microgotas se fusionen para formar unas más grandes, se recurre al uso de tensoactivos en la fase oleosa. Las moléculas de tensoactivo actúan en la interfase agua-aceite, facilitan la formación de microgotas, haciéndolas más homogéneas e impiden que se aglutinen si entran en contacto.

2.2 LITOGRAFÍA SUAVE

Entre los métodos de microfabricación más comunes se encuentran el micromaquinado, la fotolitografía, el repujado y grabado por haz de electrones y la replicación a partir de moldes también llamada litografía suave. De estas técnicas, la litografía suave se ha destacado por su menor costo de inversión, la facilidad para dominar la técnica, la sencillez de su implementación y su amplio espectro de aplicación [12].

El proceso de microfabricación que se utilizó en el presente trabajo es el de litografía suave, y recibe su nombre debido a que el uso de elastómeros (materiales orgánicos flexibles), juega un papel importante [13]. El procedimiento se puede dividir en dos partes principales, la primera consiste en la obtención de un molde con relieves microscópicos por fotolitografía y en la segunda, el molde es usado para generar réplicas hechas a base de un polímero.

El molde se obtiene al exponer una delgada capa de resina fotosensible a una fuente de luz. Para formar los canales, se coloca una máscara sobre la resina. De esta manera, la resina se polimeriza en las áreas expuestas y la resina no polimerizada se remueve con un solvente.

El polímero orgánico más usado para fabricar dispositivos de microfluídica es el polidimetilsiloxano (PDMS), el cual es un elastómero de silicona que tiene las ventajas de tener un bajo costo y toxicidad, es transparente desde el espectro visible hasta el ultravioleta cercano y su superficie puede ser oxidada para sellarse con otra superficie, haciendo innecesario el uso de adhesivos [8]. El PDMS se comercializa como un prepolímero y un catalizador o agente curante que se mezclan y son vertidos sobre el molde que tiene la estructura en relieve. Cuando la reticulación se ha completado, la réplica de PDMS se separa del molde y se perforan las entradas y

salidas. La superficie de la réplica se sella con otra superficie al ser activada por plasma.

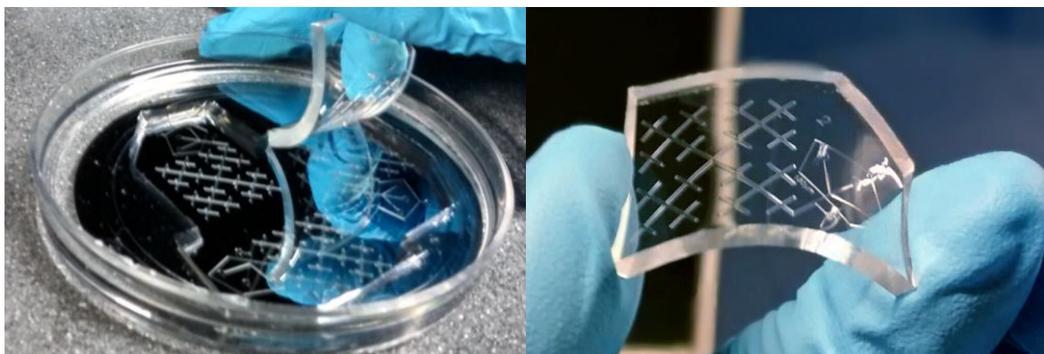


Figura 2.5 Las propiedades físicas del PDMS lo hacen un material idóneo para fabricar microchips.

En la Figura 2.6 se resume el procedimiento para la obtención de un molde de resina fotosensible en un sustrato de silicio y la fabricación de las réplicas de PDMS con el molde obtenido.

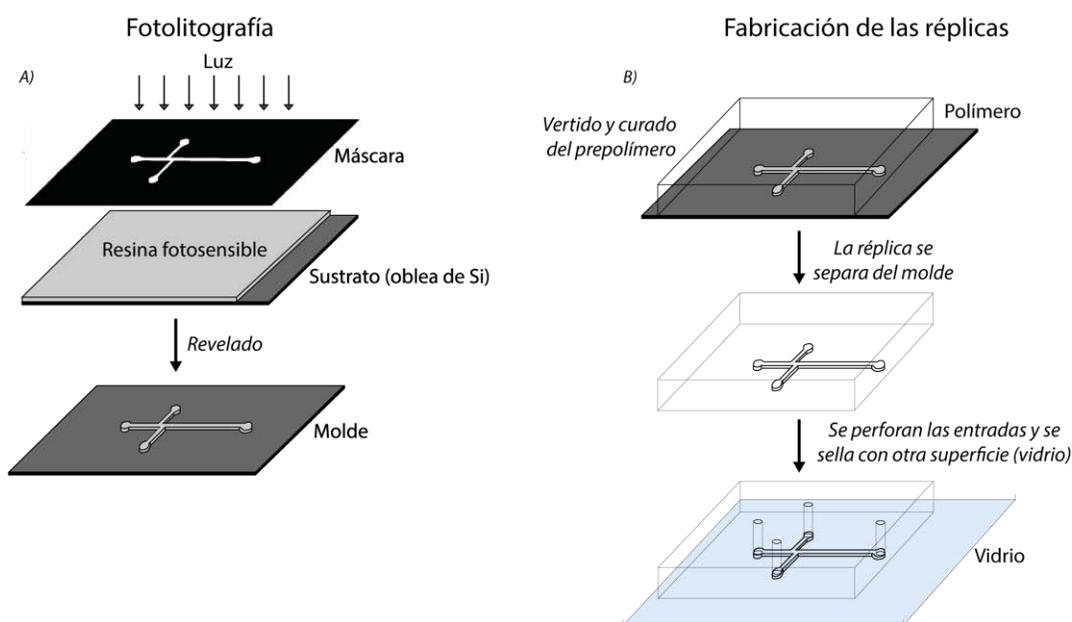


Figura 2.6 Esquema general para la obtención de microchips de PDMS. A) Fabricación de moldes por fotolitografía. B) Fabricación de microchips por litografía suave a partir del molde producido por fotolitografía.

2.3 FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER

La fluorescencia es un fenómeno que consiste en la excitación y posterior relajación de una sustancia al exponerla a radiación electromagnética. La forma en que las moléculas fluorescentes regresan a su estado basal, o de relajación, es por medio de la emisión de radiación electromagnética de menor energía a la absorbida, es decir, a una longitud de onda mayor [14].

Para que un átomo o molécula absorba un fotón de radiación incidente, es necesario que la energía del fotón corresponda exactamente a uno de los niveles energéticos característicos de cada partícula; esto explica por qué algunas especies químicas fluorescentes con estructura similares, como las rodaminas, presentan su máximo de absorción en distintas longitudes de onda.

El nombre de la técnica de análisis utilizado de este trabajo es dado por el uso de un láser como fuente de energía radiante. Otra forma común de excitar sustancias fluorescentes es por medio de lámparas de mercurio, en donde se puede utilizar una fibra óptica para guiar el haz de luz hacia el área de interés.

Para cuantificar la fluorescencia, se utilizan filtros ópticos que sólo permiten el paso de una longitud de onda de interés. En la Figura 2.7 se observa que la fluorescencia sólo se presenta cuando la gota que contiene la sustancia fluorescente pasa sobre el área donde incide el haz; en este caso, el aceite no emite fluorescencia.

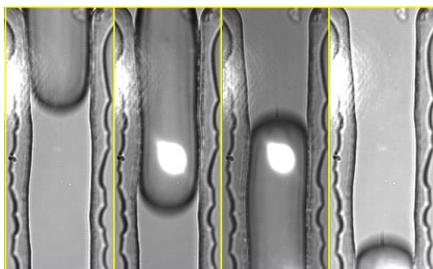


Figura 2.7 Secuencia de imágenes donde se aprecia el avance de la gota de fluoresceína sobre un área iluminada con láser.

2.4 VIABILIDAD CELULAR

La forma más común para determinar la viabilidad celular consiste en tomar una muestra con los microorganismos en suspensión, realizar una serie de diluciones, tomar un volumen conocido, distribuirlo uniformemente en medio sólido y esperar varias horas hasta que las colonias alcancen un tamaño apreciable para poderlas contar. Una de las principales desventajas de esta técnica es el tiempo en que se desarrolla todo el procedimiento, que puede tomar desde ~16 horas hasta varios días. Además, es común que el número de unidades formadoras de colonias (UFC) sea un número inferior al número de células vivas en el medio debido a la distribución desigual en el medio y a la presencia de células vivas, pero no cultivables, las cuales presentan daños que no les permiten su reproducción en medios menos favorables.

Para acelerar el tiempo de análisis se han desarrollado diferentes técnicas para detectar la viabilidad celular, estos métodos se basan en la detección de la integridad de la membrana celular, actividad enzimática, gradientes de potencial a través de la membrana, pH intracelular y expresión genética, entre otras [15].

En el método de detección de viabilidad por integridad de la membrana celular las células que presentan daño en la membrana se consideran muertas o no viables debido a la inexistencia de gradientes electroquímicos en la membrana, haciendo inviables una serie de procesos celulares esenciales. Mientras que aquellas que presentan la membrana intacta se consideran como vivas.

En este trabajo se utilizó el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD *BacLight* (Kit L7012) manufacturado por Life Technologies. Este kit consiste en dos tintes, SYTO 9 y yoduro de propidio (IP), que forman complejos fluorescentes al intercalarse entre las bases nitrogenadas que conforman el ADN. Al ser usado sólo el SYTO 9 (máximo de excitación a 480 nm y de emisión a 500 nm) tanto células vivas como

muertas fluorescen en color verde; en cambio, el yoduro de propidio (máximo de excitación a 490 nm y de emisión a 635 nm), al no ser capaz de atravesar la membrana celular, sólo se intercala en el material genético de las células que presentan daños en la estructura de la membrana. De acuerdo con el fabricante, cuando ambos tintes están presentes en células con la membrana celular dañada, el yoduro de propidio desplaza al SYTO 9 por su mayor afinidad a los ácidos nucleicos, provocando la aparición de fluorescencia roja y disminuyendo la fluorescencia verde.

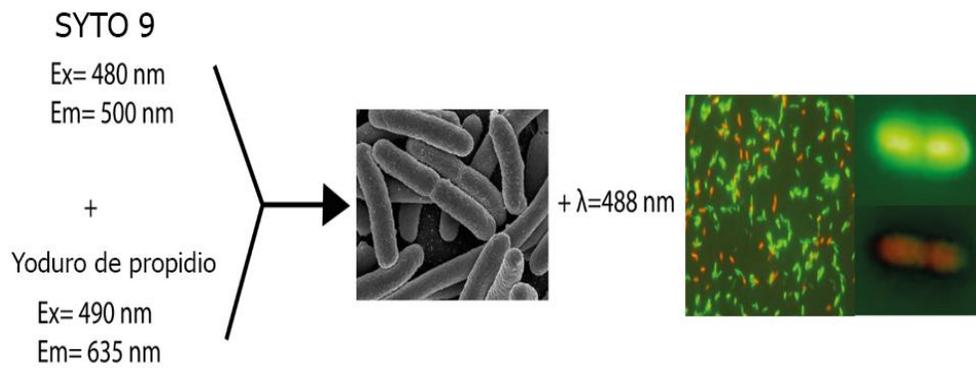


Figura 2.8 Gracias a los tintes, la viabilidad de las células se determina por la fluorescencia emitida. Las células vivas emiten fluorescencia verde, las células muertas, en cambio, fluorescen de color rojo.

3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL MICROCHIP

El proceso de fabricación de microchips para la generación de microgotas inicia con el diseño de los canales microscópicos por donde circulan los fluidos. El patrón de los canales se realizó con el software de diseño asistido por computadora Adobe Illustrator CS6. De acuerdo al trabajo previo realizado en el laboratorio, se ha observado que intersectar el flujo de agua (fase dispersa) con dos corrientes de aceite (fase continua) produce gotas más uniformes y estables. Cada una de las gotas puede considerarse como un microrreactor y si se desea llevar a cabo reacciones con cinéticas lentas se puede optar por aumentar la longitud del canal por el que circularán las gotas o reducir los flujos de las fases continua y dispersa para que las gotas pasen más tiempo dentro del microchip.

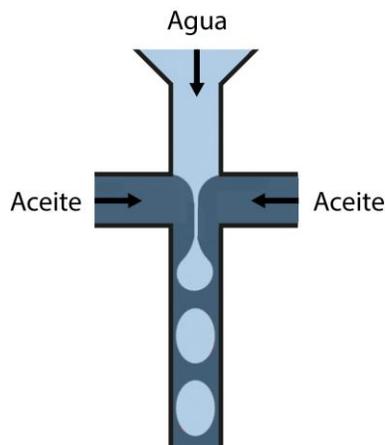


Figura 3.1 Formación de microgotas de agua debido a la constricción de dos corrientes de aceite.

Después de tener listos los diseños, estos se acomodaron dentro de una circunferencia de 65 mm de diámetro (espacio disponible para un molde) y se

imprimieron en negativo en un acetato (Grupo Grafiscanner Adisa). Esta impresión es la máscara con la que se transfirieron los diseños al molde.

3.1.1 FABRICACIÓN DE MOLDES POR MEDIO DE FOTOLITOGRAFÍA

La fabricación de los moldes se realizó en un cuarto limpio perteneciente al Laboratorio de fotónica de microondas del Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET) de la UNAM.

En el siguiente diagrama se resume el procedimiento por el que se obtuvo un molde de resina fotosensible SU-8 2025 (Microchem, E.U.) en una oblea de silicio de 3 pulgadas de diámetro (grosor: $381 \pm 25 \mu\text{m}$) (Silicon Valley Microelectronics, E.U.).

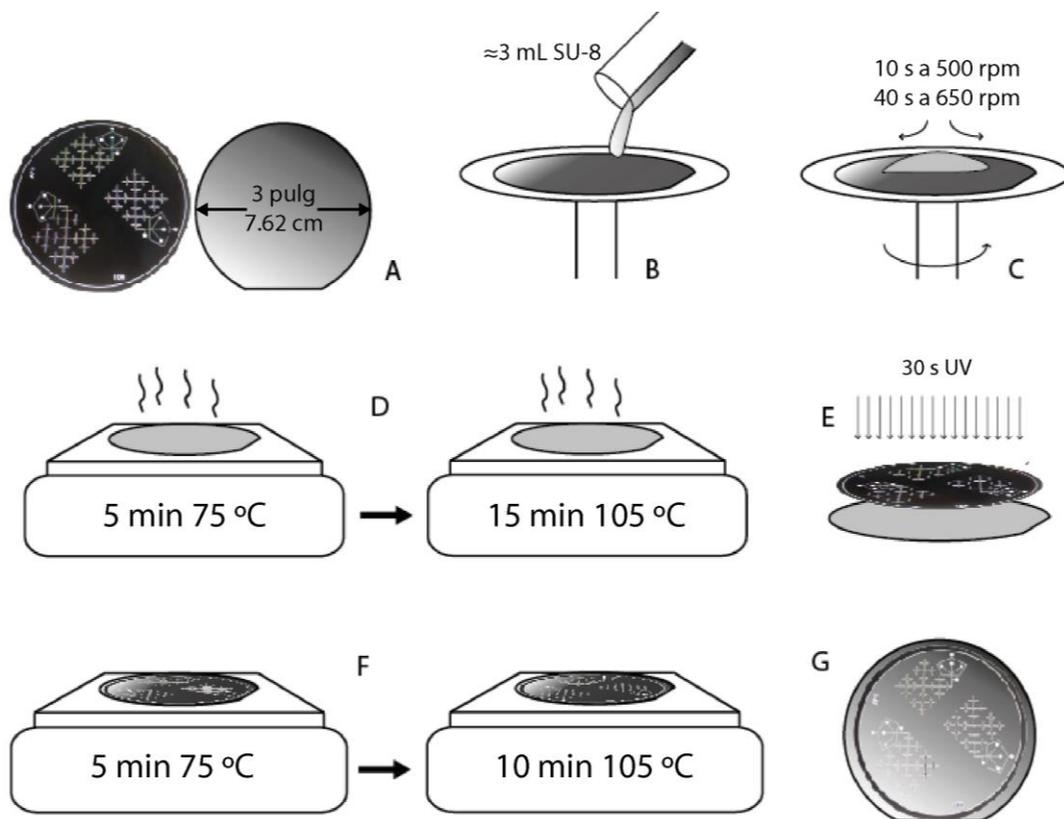


Figura 3.2 Esquema general del proceso de fabricación de un molde de fotorresina SU-8 en un sustrato de silicio.

Consideraciones previas:

- Además de las condiciones de almacenamiento indicadas por el fabricante (lugar fresco, seco y alejado de la exposición directa de fuentes de luz), también se observó que al guardar pequeñas muestras en tubos de plástico, la resina adquiriría un ligero color amarillo y la adherencia a las obleas fue muy pobre, por esta razón se recomienda almacenar el SU-8 únicamente en frascos de vidrio.
- Un día antes de usar el SU-8 se procedió a retirarlo de la refrigeración ya que es necesario usarlo a temperatura ambiente (propiedades como la viscosidad dependen de la temperatura).
- Se debe tener la precaución de cubrir con papel aluminio las parrillas y el spin coater, ya que estos equipos entran en contacto con la oblea de silicio y el SU-8, y la resina es difícil de eliminar una vez polimerizada.

Los moldes de SU-8 se obtuvieron bajo el siguiente procedimiento, Figura 3.2:

- Se eliminó el polvo y pelusas de la máscara con aire comprimido. Generalmente este paso es innecesario con la oblea de silicio, debido a que su proceso de manufactura requiere de altos niveles de limpieza.
- La oblea de silicio se centró cuidadosamente sobre el spin coater, después se agregaron aproximadamente 3 mL de SU-8 del tubo de plástico.
- Se hizo girar sobre su eje a 500 rpm por 10 segundos y 650 rpm por 40 segundos más. Los primeros diez segundos son para distribuir la resina de manera uniforme, mientras que los 40 segundos posteriores son para que la resina alcance el espesor deseado (100 μm).

- Se removió la oblea con la ayuda de pinzas y se puso sobre la parrilla previamente calentada a 75°C como máximo, para iniciar la pre-cocción y evaporar los disolventes de la resina, después de 5 minutos se pasó a la otra parrilla a 105 °C por 15 minutos.
- La oblea se cubrió con la máscara y se expuso a luz UV colimada durante 30 segundos. Es recomendable verificar que el contacto entre la máscara y la oblea sea óptimo para evitar problemas de alineación; la mica de la alineadora de máscaras debe estar limpia para que sea capaz de crear el vacío necesario.
- Se volvió a calentar en la parrilla a 75°C por 5 minutos y, nuevamente, a la de 105°C por 10 minutos.
- Se enjuagó la oblea con revelador para SU-8 (Microchem, E.U.) el cual remueve el SU-8 que no se polimerizó y se enjuagó posteriormente con isopropanol. La acción del isopropanol es reaccionar con el SU-8 sin polimerizar adherido a la oblea de silicio, sirviendo así como un indicador para continuar con el revelado. Una vez obtenido el molde se coloca en una caja de Petri para poder agregar el polímero con el cual se fabricarán las réplicas.

3.1.2 FABRICACIÓN DE MICROCHIPS A PARTIR DE PDMS

Para la fabricación de las réplicas:

- I. Se preparó una mezcla de PDMS y agente curante (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning) en una proporción de 10:1 en peso. Para asegurar la consistencia uniforme del polímero se debe mezclar perfectamente por 10 minutos.

- II. Para obtener réplicas con grosor de 4 mm se vertió 25 gr de mezcla sobre cada una de las obleas de silicio. Se dejaron reposar por un lapso de 5 minutos y después se introdujeron en la campana de vacío por aproximadamente 30 minutos.
- III. El proceso de polimerización se acelera introduciendo las réplicas por 24 horas en un horno a 70 °C. Una vez que se verifica que la consistencia del PDMS es firme, se procede a cortar cada una de las réplicas con la ayuda de un bisturí. Después de inspeccionar que los microchips no presentan obstrucciones que eviten su correcto funcionamiento, se procede a perforarlos con un horador de 0.75 mm de diámetro en las entradas diseñadas para los líquidos.

Para realizar el pegado del microchip con el portaobjetos:

Se debe tener precaución al hacer el pegado entre el PDMS y el portaobjetos. Al no contarse con un cuarto limpio, pequeñas partículas de polvo llegan a caer entre las superficies activadas. Además, es necesario un proceso de limpieza profundo del portaobjetos para garantizar que cuenta con las condiciones óptimas para la adherencia. De igual manera, una excesiva exposición al plasma provoca que el PDMS se vuelva quebradizo, en cambio, si estas superficies no se activan de manera adecuada, la adherencia será irregular. El proceso de pegado consiste en:

- i. Hacer un primer lavado con abundante agua a fin de retirar las partículas de polvo y pelusa que pudiera tener. Le sigue un enjuague con acetona para eliminar residuos grasos; posteriormente se enjuaga con agua destilada.
- ii. Los portaobjetos se secan con aire comprimido y son introducidos durante 24 horas en ácido sulfúrico concentrado. Tras haber transcurrido este tiempo, se enjuagan con agua destilada y se secan con aire comprimido para poder

introducirlos a un horno a 70 °C por una hora con el fin de eliminar la humedad por completo.

- iii. El pegado de los microchips con los portaobjetos se realiza con un equipo Laboratory Corona Treater (BD-20AC, Electro-Technic Products). Se hizo incidir la descarga de plasma durante 25 segundos en las réplicas de PDMS y 1 minuto en los vidrios tomando como referencia los datos reportados por Kathryn Haubert, Tracy Drierb y David Beebec [16].
- iv. Inmediatamente después de haber tratado tanto las réplicas de PDMS y los portaobjetos, se les puso en contacto directo aplicando una ligera presión con los dedos. Se inspeccionó que no existiera ninguna burbuja de aire o pelusas entre el PDMS y el portaobjetos. Después de terminar el pegado de los microchips se introdujeron nuevamente al horno a 70 °C por 24 horas para ayudar al proceso de pegado.



Figura 3.3 Activación de las superficies por medio de descarga o efecto corona.

Adicionalmente se hicieron pruebas sustituyendo el portaobjetos, que sirve como soporte para los microchips, por una capa de PDMS de 1.5 mm de espesor aproximadamente; de esta manera se redujo el tiempo que de fabricación de cada microchip.

3.2 PROTOCOLO PARA EL CRECIMIENTO Y TINCIÓN DE CULTIVOS DE *E. COLI*.

Para este fin se utilizan cultivos de cepas de la bacteria *E. coli* BL21 con el plásmido pET-26b(+) que les confiere resistencia a kanamicina. El procedimiento que se siguió para obtener el cultivo de bacterias fue el siguiente:

- a. Se prepararon y esterilizaron 150 mL de medio de cultivo LB (10 g/L de peptona, 5 g/L de levadura y 10 g/L de NaCl), 50 mL fueron para el medio líquido y 100 mL para las placas de agar.
- b. Después de enfriarse, a los 100 mL se les agregó kanamicina (concentración final 50 µg/mL) y se repartió en 4 cajas de Petri.
- c. Una vez que solidificó el medio, se inoculó una de las cajas de Petri con un cultivo de *E. coli*.

Se dejó incubar por un periodo de 15 horas a 37 °C.

Para la preparación del medio líquido:

- a) Se tomaron 3 mL de medio de cultivo LB en un tubo de ensayo estéril y se le agregaron 3 µL de kanamicina (concentración final 50 µg/mL).
- b) Se inoculó con una colonia de *E. coli* de la placa anteriormente preparada. Se permitió el crecimiento de las bacterias por 15 horas, a 37 °C y con agitación constante.
- c) Se midió la concentración de células por medio de turbidimetría en un espectrofotómetro, el valor típico para un cultivo que se ha dejado crecer durante la noche es $DO_{670} \approx 2$.

El protocolo para la tinción de las células está basado en el manual proporcionado por el fabricante del kit de viabilidad [17].

- Tomar 1.5 mL de cultivo y centrifugar a 10 000 x g por 10 min.
- Se desecha el sobrenadante y las células se resuspenden en 120 μ L de NaCl al 0.85% m/v.
- Para hacer la caracterización de células vivas, diluir la suspensión en 1.2 mL de NaCl al 0.85%. En cambio, si se desea hacer la caracterización de células muertas, el manual indica que se le deben agregar 1.20 mL de isopropanol al 70%. Al no obtenerse resultados satisfactorios con isopropanol, se utilizó una técnica alternativa para matar las células, diluyendo la suspensión en 1.2 mL de NaCl al 0.85% y sumergiendo el tubo en baño de temperatura constante (65 °C) por 30 minutos [18].
- Incubar a temperatura ambiente, mezclando cada 15 minutos, por media hora.
- Centrifugar nuevamente a 10 000 x g por 10 min.
- Resuspender el pellet en 1.2 mL de NaCl y centrifugar como en el paso anterior.
- Resuspender nuevamente en 1.7 mL de NaCl y hacer pasar la suspensión por un filtro de 5 micras.
- Determinar la densidad óptica (DO) a $\lambda=670$ nm.
- Filtrar Percoll (Cat: P4937, Sigma-Aldrich) con un filtro con diámetro de poro de 5 μ m. El Percoll es un líquido con nanopartículas coloidales de sílica que aumenta la densidad del medio y evita que las células se sedimenten.
- Tomar 400 μ L y agregar la cantidad necesaria de suspensión de *E. coli* para obtener una densidad óptica de 0.15, usar la fórmula:

Donde:

$V_i = \text{Volumen inicial}$

$$V_i = \frac{C_f V_f}{C_i}$$

$C_i = \text{Concentración inicial } (\approx 2)$

$C_f = \text{Concentración final } (0.15)$

$V_f = \text{Volumen final } (500 \mu\text{L})$

- Después de agregar el cultivo celular, el volumen de la muestra no alcanzará el valor requerido, por lo que será necesario agregar la disolución de NaCl hasta completar los 500 μL .
- A los 500 μL de muestra y con ayuda de una micropipeta, agregar 0.75 μL de cada una de las soluciones stock el SYTO 9 (3.34 mM) y el yoduro de propidio (20 mM) en proporción 1:1. Por cada mL de suspensión se debe agregar 3 μL de la mezcla de ambas tintas. Incubar por 15 minutos.

Nota: La razón por la cual el volumen de Percoll usado se mantiene fijo es porque presenta propiedades fluorescentes cuando entra en contacto con los tintes, debido a esto es necesario considerar la concentración del mismo como una variable más que influye en el valor de la señal de fluorescencia de las gotas.

3.3 FUNCIONAMIENTO DEL ARREGLO EXPERIMENTAL

Para hacer las pruebas de fluorescencia se utiliza el arreglo experimental implementado por Vázquez Sánchez [19]. En la Figura 3.4 se muestra un diagrama simplificado de dicho arreglo experimental. A grandes rasgos, consiste en un diodo láser que emite un haz de luz con longitud de onda de 488 nm (Sapphire 488-10, Coherent), gracias a un sistema de espejos, este haz ingresa a un microscopio invertido (DM IL Led, Leica) y es enfocado con la ayuda del objetivo (40x, NA=0.55) del mismo microscopio en el canal por donde pasan las gotas. Como resultado de la excitación de la sustancia contenida en las gotas, éstas emiten fluorescencia. En nuestro caso, la longitud de onda de la fluorescencia emitida depende del estado de la célula. Para cuantificar la fluorescencia emitida es necesario filtrar y concentrar la luz que regresa por la misma abertura del microscopio por donde entra el haz del láser.

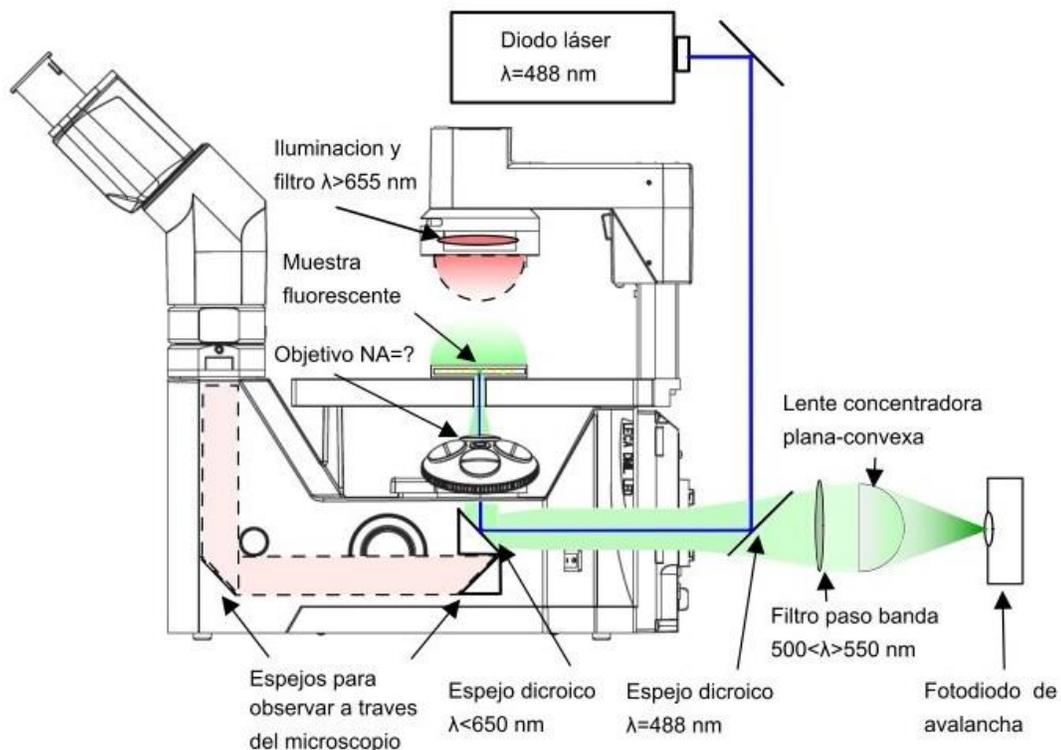


Figura 3.4 Diagrama del arreglo experimental para la detección de fluorescencia en microgotas. Tomado de [19].

Un fotodiodo de avalancha (APD-100, Hinds Instruments) transforma la señal lumínica que recibe en una señal eléctrica la cual es enviada a una tarjeta de adquisición de datos (X-DAQ USB-6351, National Instruments). La señal es interpretada y presentada en tiempo real en forma de graficas (voltaje de la señal detectada vs tiempo) por un programa creado en la plataforma LabVIEW. Para guardar los datos, permitiendo así su posterior análisis, se usa un programa desarrollado en MATLAB.

Para hacer las pruebas de detección de células vivas se usa un filtro que únicamente deja pasar haces de luz cuya longitud de onda se encuentra entre 500 nm y 550 nm (luz verde) (FF03-525/50-25, Semrock). Para detectar las células muertas se usa un filtro que limita el paso de luz de los 572 nm a 642 nm (luz roja) (FF01-607/70-25, Semrock).

Con los cultivos de las células listos en las jeringas, se procede a montar el arreglo para bombear su contenido a los microchips.



Figura 3.5 La muestra se carga en las bombas de infusión (NE-300, New Era Pump Systems Inc.)

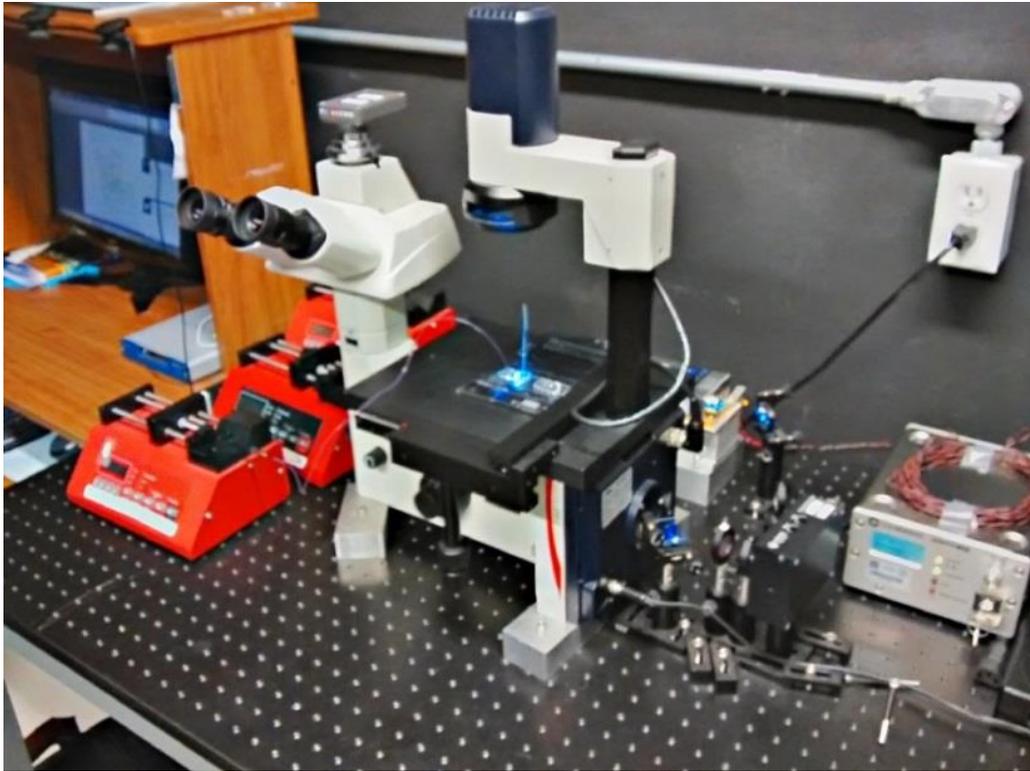


Figura 3.6 Arreglo experimental en funcionamiento. Se observa el haz del láser incidiendo sobre el microchip. Normalmente se trabaja sin iluminación para evitar dañar el fotodiodo de avalancha (APD).

3.4 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE SEÑALES POR MEDIO DE MATLAB

Como se señaló anteriormente, las señales provenientes del diodo son capturadas por la tarjeta de adquisición de datos y procesadas en una computadora por medio de MATLAB.

MATLAB es un entorno de cálculo numérico y un lenguaje de programación con el cual es posible desarrollar programas para una infinidad de requerimientos en el área ingenieril y científica. MathWorks Inc. cuenta con la página web File Exchange [20] donde se pueden encontrar muchos funciones, scripts y programas creados por otros usuarios de MATLAB alrededor del mundo. Gracias a este directorio, fue posible encontrar la página *A Pragmatic Introduction to Signal Processing with applications in chemical analysis* [21]. En este sitio están disponibles varias herramientas para el procesamiento y análisis de datos. Para encontrar los valores óptimos de los picos de las células en las gotas se usó la función el programa iPeak, también se utilizó la secuencia de comandos findpeaks.m para exportar los valores de los picos detectados.

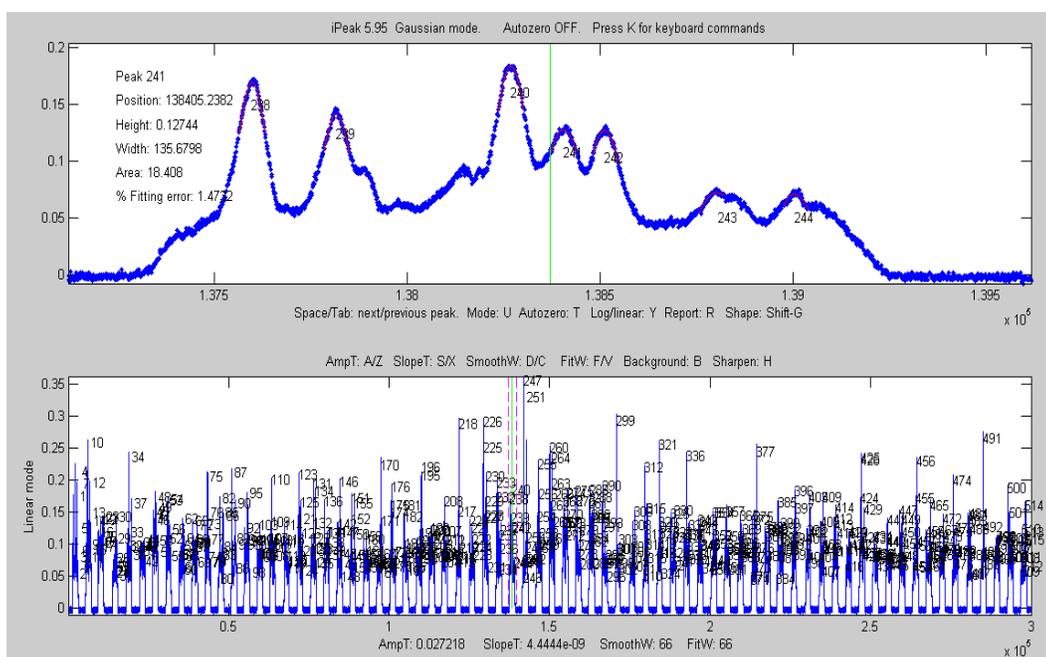


Figura 3.7 Interfaz de usuario del programa iPeak.

El programa funciona definiendo 5 parámetros para detectar o ignorar determinados valores de los picos:

- SlopeThreshold (Pendiente mínima): Es el valor de la primera pendiente suavizada, valores altos harán que sólo las señales o picos más angostos sean reportados. En este trabajo se usaron valores desde de 5×10^{-6} a 1×10^{-5} .
- AmpThreshold (Amplitud mínima): Se discriminan los picos con altura inferior a este valor. Como la intensidad de la fluorescencia de las gotas nunca fue menor a 0.3, fue este el valor que se utilizó.
- SmoothWidth (Ancho del suavizado): Antes de medir el valor de la pendiente, con este parámetro decidimos cuántos puntos de la curva suavizada se tomarán en cuenta para hacer el promedio. Con valores altos se pueden ignorar picos demasiado pequeños y agudos. Este parámetro varía de acuerdo al tipo de células analizadas, se recomienda probar con diferentes valores para obtener resultados que se acerquen a lo observado; en general, se aconseja iniciar con el valor de 70; el valor mínimo que se usó fue de 39 y el máximo fue de 145.
- FitWidth (ajuste del ancho): Es el número de puntos de la parte superior del pico que se toman en cuenta para estimar la altura, posición y área del pico. Normalmente el valor es el mismo que el asignado a SmoothWidth, pero en ocasiones el programa puede reportar intensidades demasiado altas o bajas, cuando esto sucede, basta con modificar ligeramente este valor, las nuevas intensidades reportadas varían en el orden de las diezmilésimas.

3.5 ENSAYOS PARA CARACTERIZAR CÉLULAS DE *E. COLI*

Como lo indica Vázquez, B. [19], en la intensidad de fluorescencia emitida por las microgotas influyen variables como la potencia del láser, la velocidad del flujo y la concentración de fluoróforos. Por esta razón es necesario fijar los parámetros con los cuales se harán los experimentos sucesivos. Las mediciones se realizaron en la zona iluminada por el haz del láser que se muestra en la Figura 3.8.



Figura 3.8 Las condiciones experimentales fueron determinadas haciendo mediciones de fluorescencia a una distancia de entre 1.8 y 2 mm de la zona de formación de gotas.

Para fijar la concentración de los tintes, se probaron distintas concentraciones de la mezcla de tintes SYTO 9/IP con el fin de determinar la concentración necesaria para teñir las células sin usar una excesiva cantidad; se inició con una concentración de 13.36 μM de SYTO 9 y 80 μM de yoduro de propidio (8 μL de mezcla de tintes 1:1 por mL de suspensión celular), hasta encontrarse que una concentración de 5.01 μM de SYTO 9 y 30 μM de yoduro de propidio era la óptima para detectar gotas y células, estas concentraciones se obtienen agregando 3 μL de una mezcla 1:1 de los stocks por cada mL de cultivo.

Se comenzó fijando la potencia del láser en 8.5 mW, que es un valor cercano al que se trabajó anteriormente [20], un flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{h}$ de células y 90 $\mu\text{L}/\text{h}$ de aceite mineral con 0.1% de Span 80 (Cas: 1338-43-8, Sigma-Aldrich). Las mediciones se hicieron únicamente con el filtro verde, ya que en ese momento el filtro rojo no se encontraba disponible.

De manera análoga, al haber fijado la concentración de tintes, se modificó la potencia del láser, desde 2 mW hasta 10 mW.

Durante el desarrollo de estos experimentos, se encontró que la concentración de Percoll influye en el valor de fluorescencia alcanzado por la gota, por esta razón se decidió fijar su concentración; de esta manera, de cada 500 μL de suspensión de células para analizar, 400 μL eran de Percoll.

La última variable que se fijó fue la concentración de las células vivas. Las primeras pruebas se hicieron entre $\text{DO}_{670}=0.84$ y $\text{DO}_{670}=0.02$

3.5.1 EXPERIMENTOS CON CÉLULAS VIVAS Y MUERTAS

Después de haber fijado la potencia del láser, la cantidad de Percoll, la densidad óptica de las células y los flujos dentro de los microchips, se procedió a realizar las pruebas para caracterizar la señal de las células vivas y las muertas.

Para todos los experimentos se utilizó aceite mineral con 0.1% peso de Span 80, el flujo de aceite se estableció en 90 $\mu\text{L}/\text{h}$ y se modificó el flujo de células en 30 $\mu\text{L}/\text{h}$, 60 $\mu\text{L}/\text{h}$ y 90 $\mu\text{L}/\text{h}$. La densidad óptica a la que se diluyó el cultivo celular fue de 0.15 y la concentración de los tintes fue de 5.01 μM de SYTO 9 y 30 μM de yoduro de propidio.

Para la detección de células vivas, que emiten fluorescencia verde, se utilizó el filtro verde que permite el paso de luz entre las longitudes de onda $500\text{ nm} < \lambda < 550\text{ nm}$. Para las células muertas se ocupó el filtro que permite el paso de luz roja ($572\text{ nm} < \lambda < 642\text{ nm}$). En la Figura 3.9 se esquematiza el arreglo experimental para la caracterización de las señales.

Para las pruebas con células muertas se siguió el protocolo marcado por el manual del kit de viabilidad y se establecieron las mismas condiciones de las pruebas con células vivas, pero al no detectar señales con ninguno de los dos filtros, se optó por tratar las bacterias por medio de calor para matarlas. Con esta modificación al protocolo fue posible detectar señales con ambos filtros.

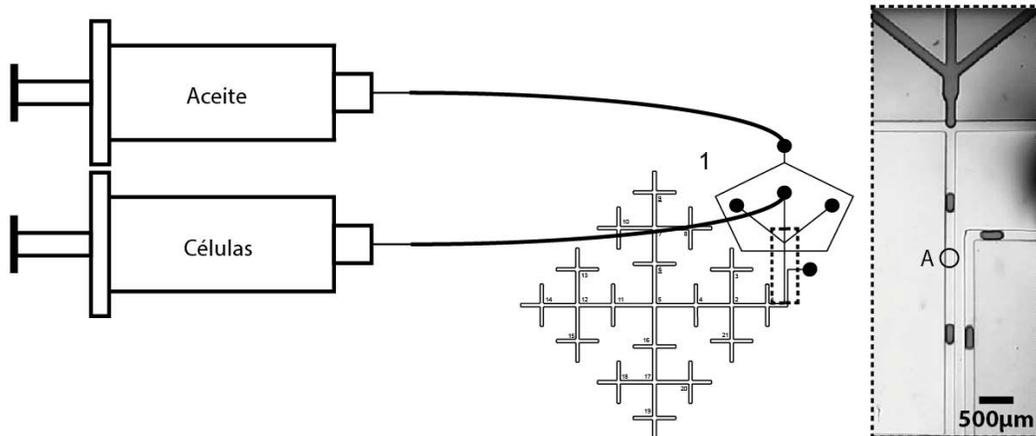


Figura 3.9 Esquema de los ensayos con células vivas y muertas. El punto A indica el lugar donde se realizaron las mediciones de fluorescencia.

Al tener caracterizadas tanto las señales correspondientes a células vivas como muertas, se procedió a hacer mezclas entre las dos suspensiones. Para la caracterización de células muertas las pruebas se hicieron con $DO=0.18$, ya que con 0.15 no se detectaron células en la mayoría de las gotas.

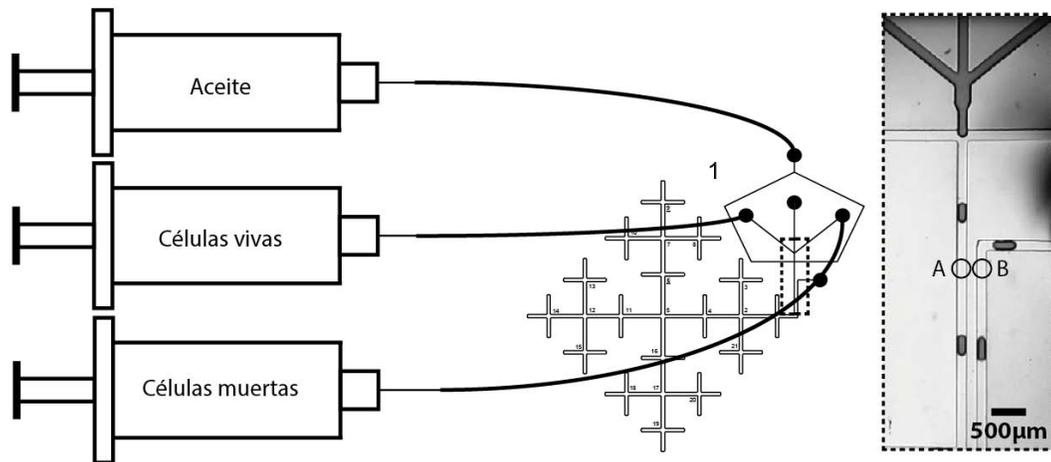


Figura 3.10 Esquema de los ensayos para caracterizar las señales de mezclas de células vivas y muertas.

El flujo de aceite se mantuvo en $90 \mu\text{L/h}$. En la primera prueba se mantuvo el flujo de la suspensión con células vivas ($30 \mu\text{L/h}$), mientras se aumentaba el flujo de células muertas (desde $10 \mu\text{L/h}$. a $30 \mu\text{L/h}$); posteriormente, se fijó el flujo de células muertas ($30 \mu\text{L/h}$), mientras se aumentaba el flujo de células vivas (desde $10 \mu\text{L/h}$. a $30 \mu\text{L/h}$). En estas pruebas, al aumentar el flujo de la fase acuosa, el volumen de las gotas aumentó.

En la segunda serie de experimentos con mezclas de células vivas y muertas, se mantuvo fijo el volumen de las gotas restringiendo el flujo total de células muertas y vivas (fase acuosa) en $60 \mu\text{L/h}$ y el flujo de aceite en $90 \mu\text{L/h}$.

3.6 ENSAYOS PARA COMPROBAR EL EFECTO DE LA AMPICILINA EN CÉLULAS DE *E. COLI*.

Se hicieron dos series de ensayos con células vivas y ampicilina. En el primer caso, se siguió el protocolo para la caracterización de células vivas, pero en el último paso, antes de cargar las suspensiones en las jeringas, se agregó ampicilina para tener una concentración final de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la suspensión. Se hicieron mediciones a intervalos regulares, tanto en la entrada y como en la salida usando ambos filtros. El flujo de células se fijó en 20 $\mu\text{L}/\text{h}$ de células y 30 $\mu\text{L}/\text{h}$ de aceite para aumentar el tiempo de residencia a 3 min 20 s.

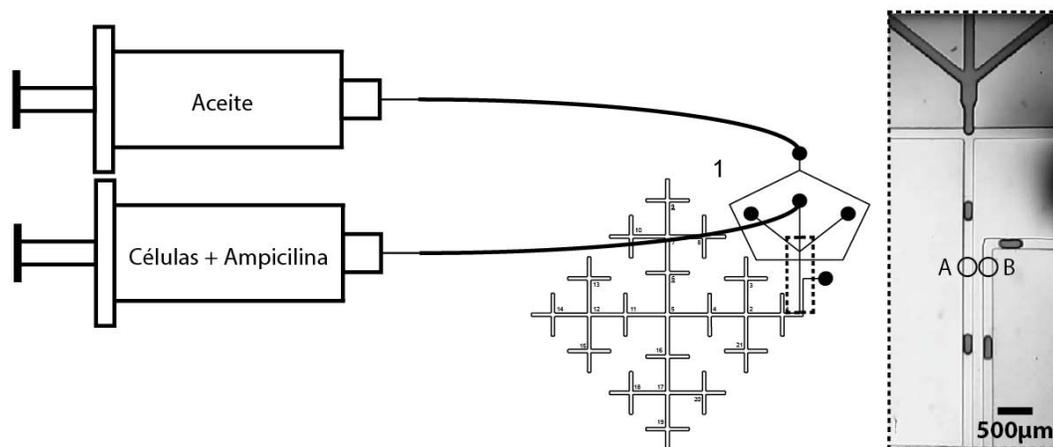


Figura 3.11 Esquema del primer ensayo con ampicilina. El punto A indica el lugar donde se realizaron las mediciones de fluorescencia.

Al igual que en el primer experimento con ampicilina, en la segunda serie de pruebas se hicieron mediciones en la entrada y en la salida del microchip, con los dos filtros; a diferencia de las pruebas anteriores, la ampicilina y las células se colocaron en diferentes jeringas.

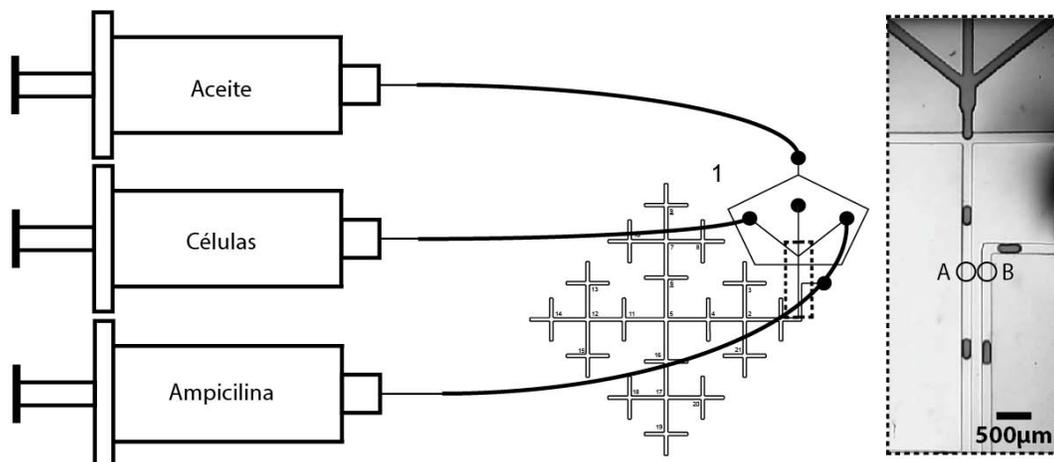


Figura 3.12 Esquema del segundo experimento con ampicilina, en donde las células y el antibiótico se bombean por separado, Las mediciones se hicieron en los puntos A y B.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS DE LA FABRICACIÓN DE LOS MOLDES Y RÉPLICAS

El proceso para fabricación de los microchips que permitieron la incubación de células en microgotas inició con el diseño e impresión de las máscaras.

Para encapsular células bacterianas en microgotas se diseñó un dispositivo con 3 entradas de agua y una de aceite, Figura 4.1, en la intersección el flujo continuo de ambas fases permite la formación de microgotas.

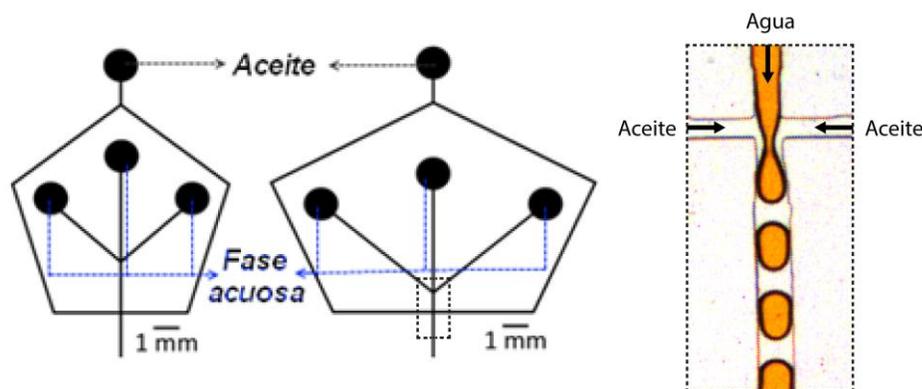


Figura 4.1 Zona de formación de microgotas. A la izquierda se observa el diseño original, en medio, el diseño modificado y a la derecha se observa la formación de microgotas.

El patrón de los canales se realizó con el software de diseño asistido por computadora (CAD) Adobe Illustrator CS6. El diseño se basa en el trabajo previamente realizado por el Ingeniero Químico Julio C. Calderón [22], pero con las siguientes modificaciones: en la región de formación de las microgotas, se aumentó la distancia entre las entradas de la fase acuosa para hacer más fácil la inserción de los tubos con los reactivos y se hicieron dos diseños cambiando la anchura de los canales, uno de los diseños mide 100 μm de ancho y el otro, 150 μm .

Después de que las microgotas se forman, sigue una zona donde éstas se incuban. Se diseñó un canal de 28 cm de largo en un área de 4 cm², logrando con esto un mayor tiempo de residencia para las microgotas dentro del microchip. El diseño propuesto se basó en la geometría de los fractales. Un fractal es una estructura geométrica que se repite varias veces a diferentes escalas de magnitud. Las ventajas que presenta este diseño es que se aprovecha el espacio disponible y además permite monitorear varios tiempos de reacción en una sola toma al usar un microscopio de fluorescencia [23]. Además, los múltiples cambios de dirección del flujo mejoran el mezclado, como se mostró en la Figura 2.4.

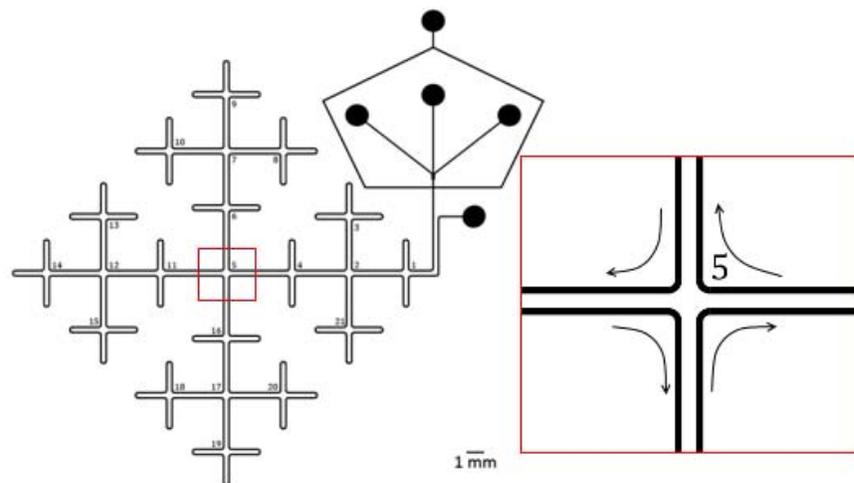


Figura 4.2 Patrón de canales basado en la geometría de los fractales.

Estos patrones se ordenaron dentro de una circunferencia de 65 mm de diámetro, tratando de aprovechar al máximo el área disponible para el molde del microchip.

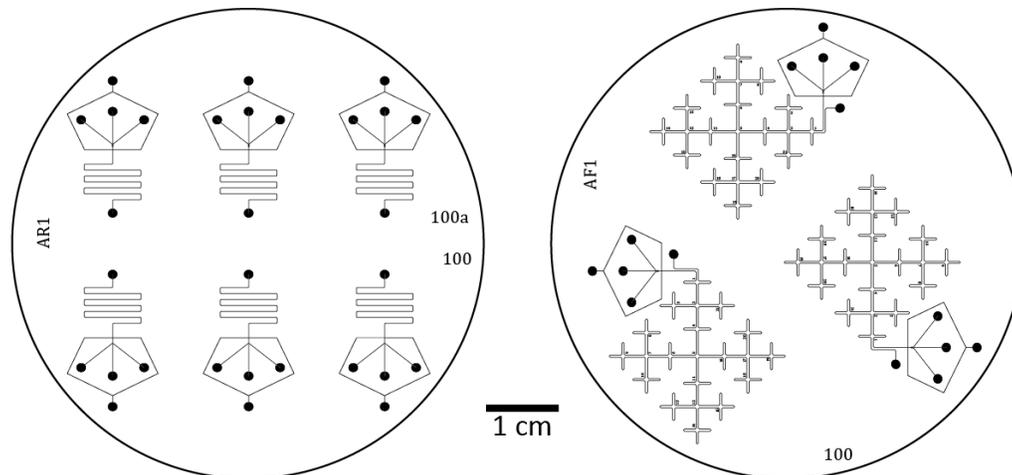


Figura 4.3 Arreglos que se establecieron para aprovechar el espacio disponible en las obleas de silicio.

La impresión de los diseños se realizó en forma de negativos sobre una película de acetatos en Grupo Grafiscanner Adisa que cuenta con una impresora digital que proporciona una resolución de 2400 puntos por pulgada (DPI). Con el microscopio se realizó una inspección cualitativa de los negativos impresos a fin de comprobar que ninguno de los canales se encontrara obstruido.

En esta etapa puede ocurrir que las máscaras o negativos se impriman de manera incorrecta, como se observa en la Figura 4.4, por lo que es recomendable asegurarse de que el ancho de los canales coincida con los diseñados.

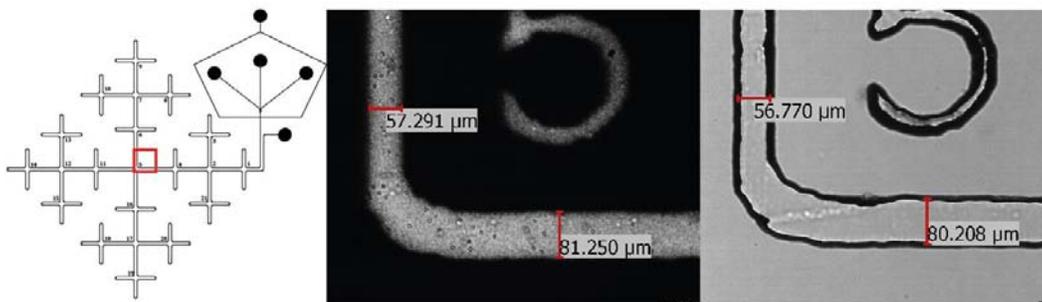


Figura 4.4 La reducción del ancho de los canales en la máscara también se hizo presente en las réplicas de PDMS, los canales se diseñaron con 100 μm de ancho.

Antes de iniciar las pruebas con células, se evaluó el desempeño de los microchips. Las pruebas de estabilidad de gotas se hicieron con colorantes naturales en agua y aceite mineral con Span al 0.1% m/m.

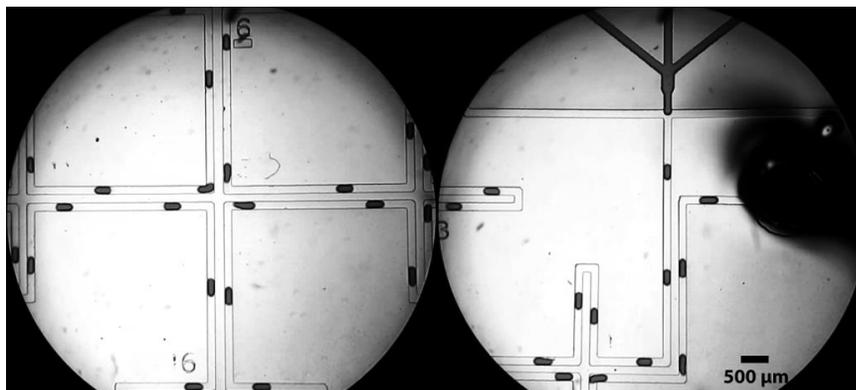


Figura 4.5 El funcionamiento de los microchips con canales de 150 µm fue satisfactorio.

En la Figura 4.5 muestran dos fotografías tomadas con el microscopio de un microchip en funcionamiento. Se observa que después de la formación de las microgotas, estas circulan de manera ordenada por el microchip hasta su salida.

Para reducir el tiempo en la fabricación de microchips se sustituyó el portaobjetos por una capa de PDMS de aproximadamente 1 mm de ancho. Esta capa de PDMS se obtiene al extender 8 gramos de PDMS en una caja de Petri. Al igual que con las réplicas, la superficie de la capa de PDMS es activada con plasma por 15 segundos.

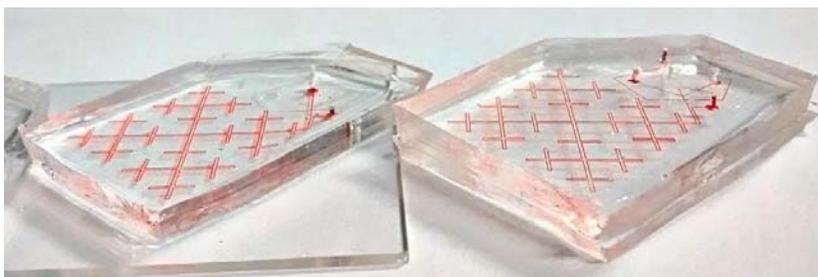


Figura 4.6 A la izquierda se muestra una réplica de PDMS pegada a un portaobjetos, mientras que el microchip de la derecha está hecho totalmente de PDMS. Ambos microchips funcionaron correctamente.

4.2 ENSAYOS PARA CARACTERIZAR LA FLUORESCENCIA DE LAS CÉLULAS DE *E. COLI*

En la siguiente imagen se muestra en detalle el funcionamiento del arreglo experimental para la detección de fluorescencia. El haz de luz láser es guiado por medio de espejos y enfocado en la muestra fluorescente gracias al objetivo del microscopio. La fluorescencia resultante es captada por el objetivo del microscopio y es guiada y concentrada hasta llegar al diodo fotodetector, el cual detecta de manera continua la intensidad de la energía lumínica que recibe.

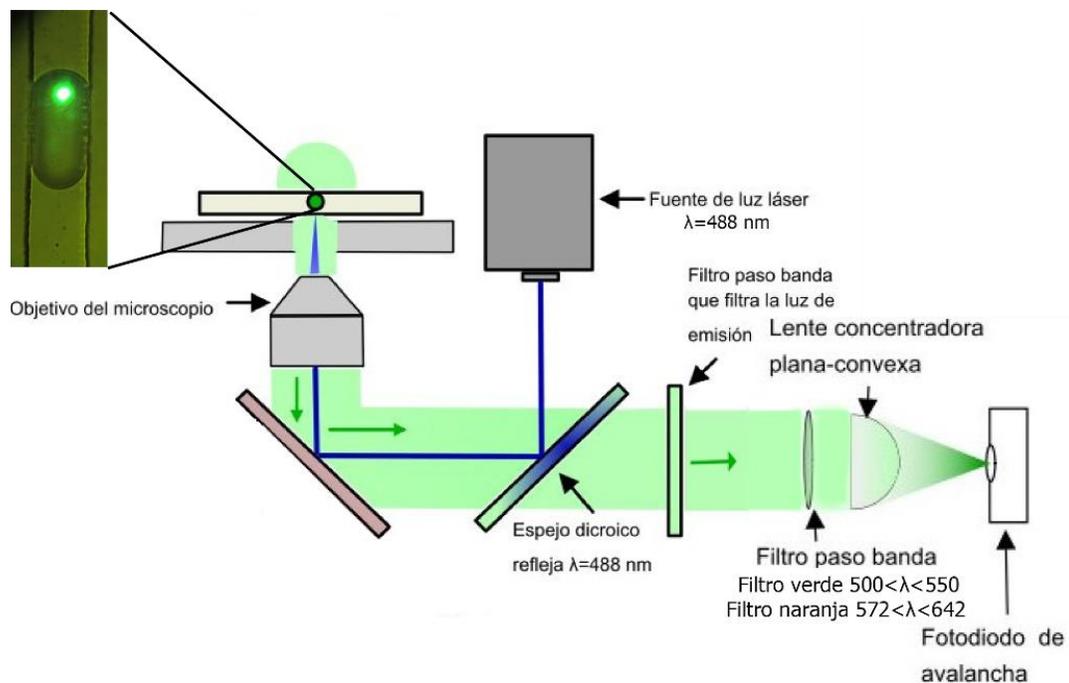


Figura 4.7 Diagrama que detalla el funcionamiento del arreglo óptico. Adaptado de [19]

Posteriormente las señales se registran para obtener gráficas de intensidad contra tiempo. Cuando no hay células presentes, solamente se observa la fluorescencia correspondiente a las gotas; cuando se detectan células dentro de las gotas, se observan señales de fluorescencia (picos) más intensas y angostas. La fluorescencia de las gotas sin células es provocada por el Percoll y los tintes

fluorescentes; la fluorescencia de las células se debe al complejo creado entre las bases nitrogenadas del ADN y los tintes fluorescentes.

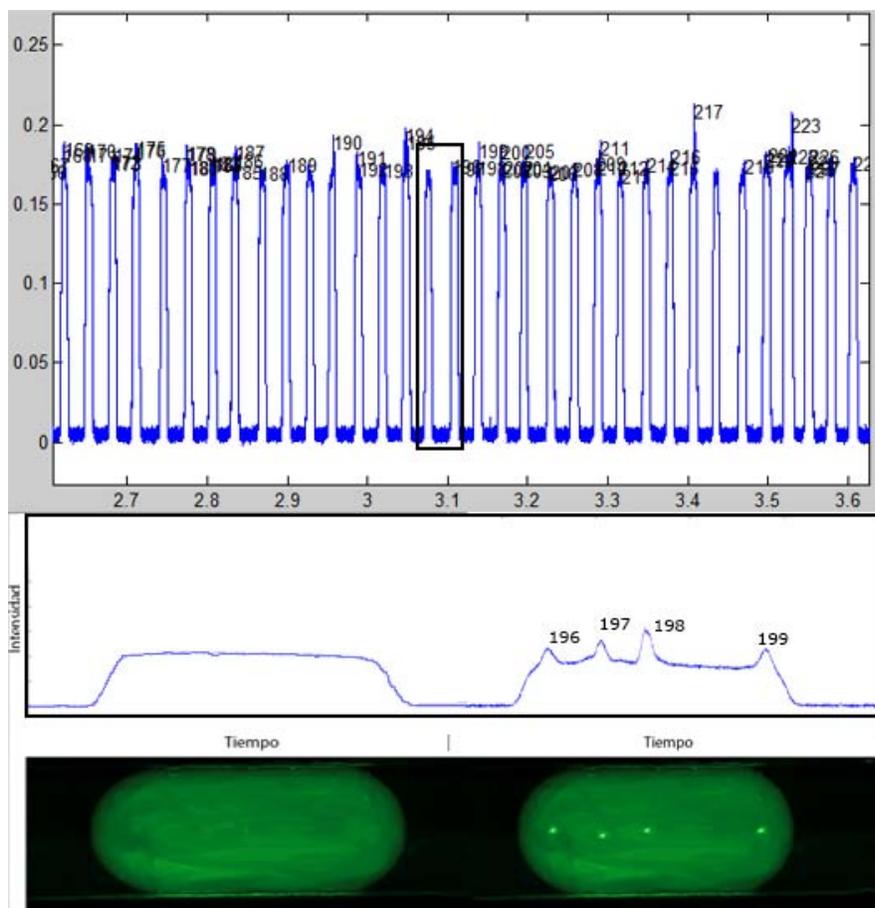


Figura 4.8 En la parte superior se muestran las señales de 34 gotas que fueron registradas en 10 s. En la parte inferior izquierda se muestra la señal típica de fluorescencia de una gota sin células y a la derecha, las señales de fluorescencia de una gota con cuatro células detectadas. Las imágenes inferiores son únicamente representativas.

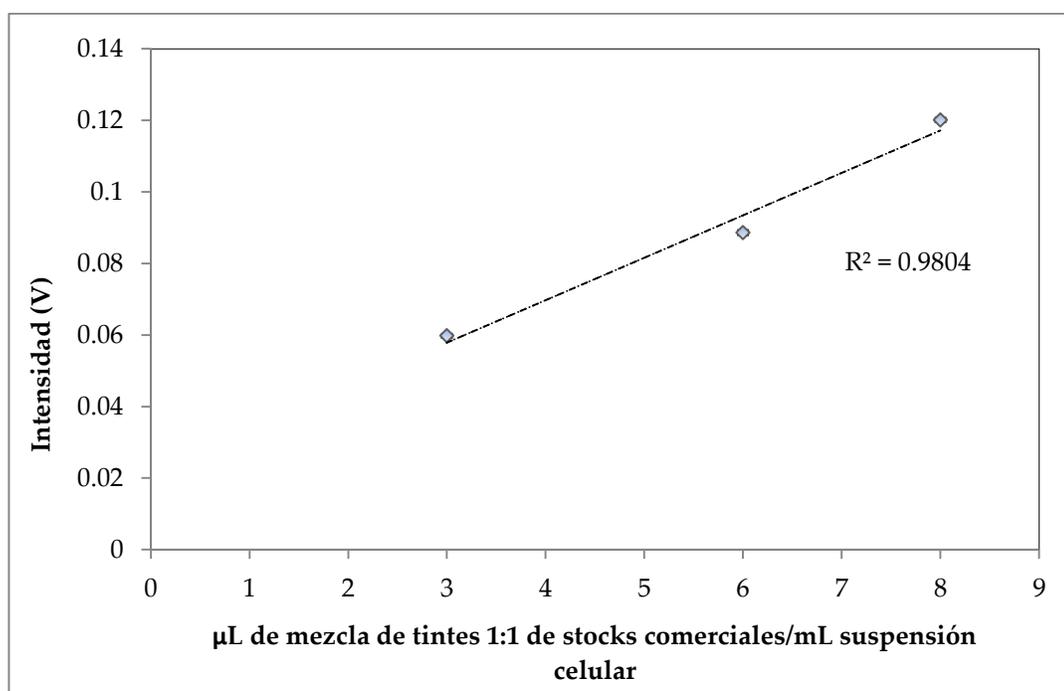
Existen distintos factores que pueden afectar la señal de fluorescencia de las células en microgotas, entre ellos están la concentración de las tintas, la velocidad del flujo, el volumen de la muestra y la intensidad del láser [24]. Estos factores se evaluaron individualmente y los resultados se muestran a continuación:

Para observar el efecto de la concentración de los tintas en la intensidad de la fluorescencia, se formaron microgotas en un microchip utilizando un flujo de células

teñidas de 30 $\mu\text{L}/\text{h}$ y 90 $\mu\text{L}/\text{h}$ de aceite, y se iluminaron con el láser al inicio del microcanal. Se promedió la intensidad de 30 microgotas y los resultados se muestran en la Gráfica 4-1.

Tabla 4—1 Variación de la intensidad de la fluorescencia de las microgotas al cambiar la concentración de tintes.

Concentración (μM SYTO9/ μM IP)	Intensidad promedio (V)
5.01/30	0.0597
10.02/60	0.0886
13.36/80	0.1191



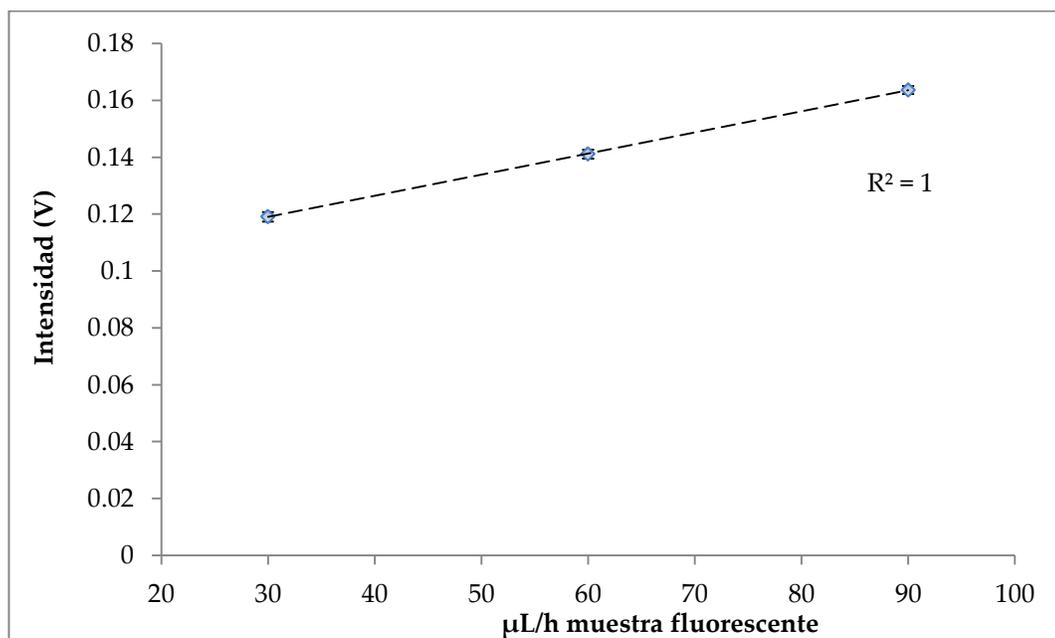
Gráfica 4-1 Variación de la intensidad de la fluorescencia de las microgotas al cambiar la concentración de tintes.

Era de esperarse que, al aumentar la concentración de los tintes, la fluorescencia se incrementara debido a la presencia de más moléculas fluorescentes. Estos experimentos se hicieron manteniendo muy baja la concentración de células ($\text{DO}_{670}=0.02$), esperando que, al aumentar la concentración de las tintas, aparecieran señales de células en las microgotas, pero no se observaron dichas señales.

En el siguiente experimento se determinó el efecto de la velocidad de flujo de las microgotas con células en la señal de fluorescencia. Para ello se varió el flujo de las células de 30 $\mu\text{L/h}$ a 90 $\mu\text{L/h}$, manteniendo constantes la concentración de tintas (13.36 μM SYTO 9/80 μM IP) y el flujo de aceite de 90 $\mu\text{L/h}$.

Tabla 4—2 Variación de la intensidad de la fluorescencia al cambiar el flujo de las microgotas. Flujo de aceite: 90 $\mu\text{L/h}$, 13.36 μM SYTO 9 y 80 μM IP.

Flujo de células ($\mu\text{L/h}$)	Intensidad (V)
30	0.1191
60	0.1311
90	0.1636



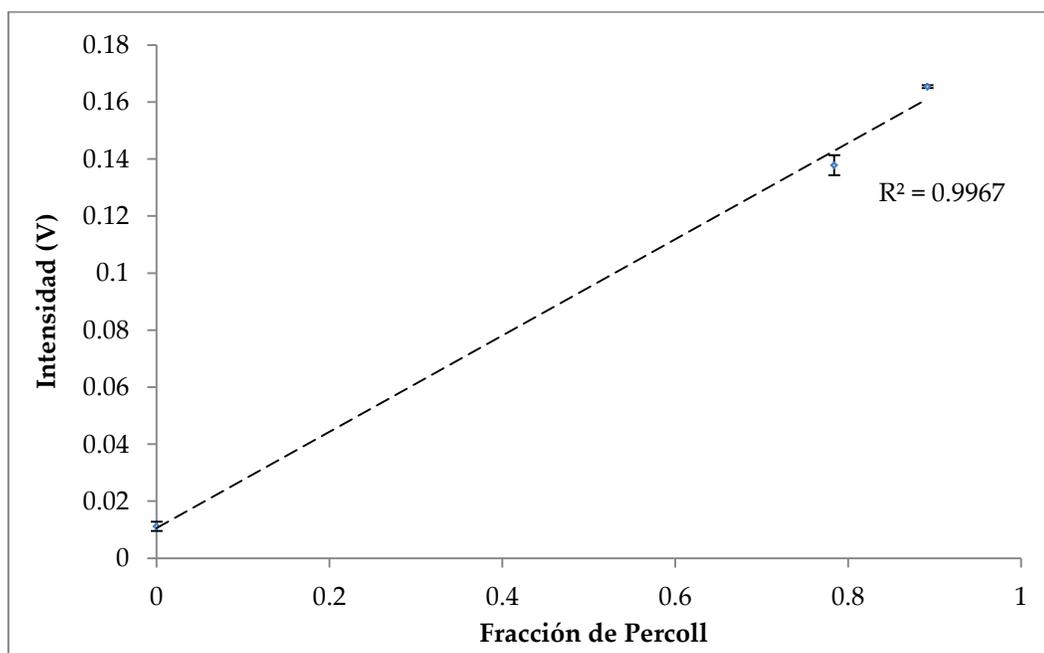
Gráfica 4-2 Variación de la intensidad de la fluorescencia al cambiar el flujo de las microgotas. Flujo de aceite: 90 $\mu\text{L/h}$, 13.36 μM SYTO 9 y 80 μM IP.

La variación, tanto de la concentración de los tintes como de la velocidad de las gotas provoca, al menos en las condiciones estudiadas, una variación similar en la intensidad de las gotas (0.0445 en el caso de la variación del flujo y 0.0604 para la concentración de los tintes)

Otro de los factores que se evaluó para conocer su efecto en la fluorescencia de las gotas fue la cantidad de Percoll que se adicionó. Se hicieron diluciones de Percoll con NaCl al 0.85%, el microchip se operó con flujo 30 $\mu\text{L}/\text{h}$ de células y 90 $\mu\text{L}/\text{h}$ de aceite, nuevamente se agregaron 8 μL de mezcla 1:1 de tintes por mL de muestra (concentración: 13.36 μM SYTO 9 y 80 μM IP).

Tabla 4—3 Intensidad de la fluorescencia al cambiar la concentración de Percoll.

Fracción de Percoll	Intensidad (V)
0	0.0112
0.784	0.1379
0.892	0.1655



Gráfica 4-3 Variación de la intensidad de la fluorescencia al cambiar la concentración de Percoll.

Los resultados muestran que hay una correlación entre la cantidad de Percoll utilizada y la fluorescencia emitida por las gotas. La causa de este fenómeno puede ser que las moléculas de los tintes forman un complejo fluorescente con la povidona del Percoll debido a su estructura química similar a las bases nitrogenadas del ADN.

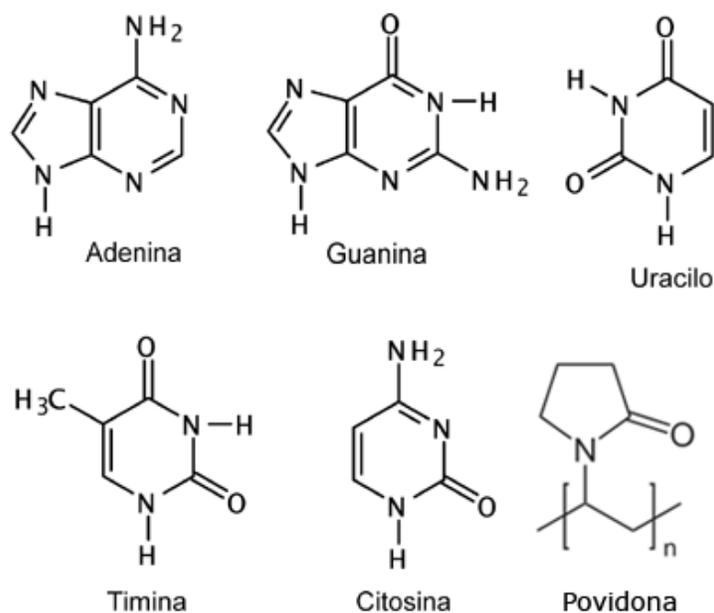


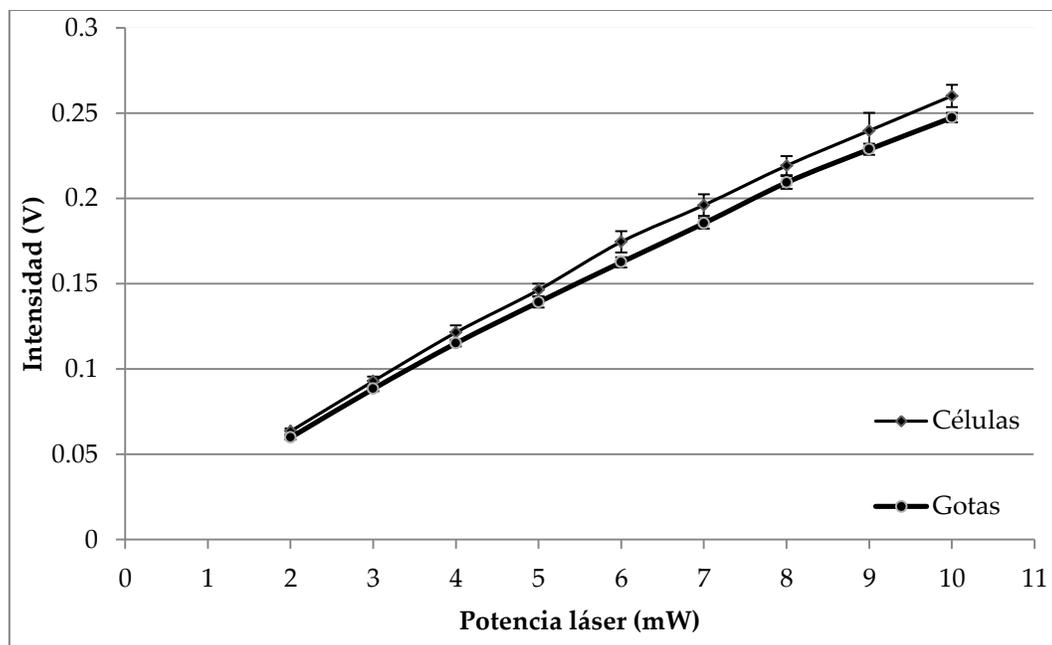
Figura 4.9 La estructura molecular de la povidona es parecida a la de las bases nitrogenadas del ADN.

De esta manera, se modificó el protocolo para mantener fija la fracción de Percoll en 800 μL de Percoll por cada mL de muestra de células a analizar.

Finalmente se analizó el efecto de la potencia del láser en la fluorescencia. En esta prueba se varió la potencia del láser desde 2 mW hasta 10 mW, fijando el flujo de células en 90 $\mu\text{L}/\text{h}$ y el de aceite en 90 $\mu\text{L}/\text{h}$ para disminuir el efecto del fotoblanqueo.

Tabla 4—4 Efecto del aumento de la potencia del láser sobre la fluorescencia.

Potencia (mW)	Intensidad gotas (V)	Intensidad células (V)
2	0.0597	0.0635
3	0.0883	0.0928
4	0.1150	0.1214
5	0.1392	0.1463
6	0.1625	0.1745
7	0.1854	0.1961
8	0.2093	0.2192
9	0.2288	0.2397
10	0.2474	0.2601



Gráfica 4-4 Efecto del aumento de la potencia del láser sobre la fluorescencia.

Se observa que, a potencias bajas, la fluorescencia de las células es muy cercana a la de las gotas. En la Figura 4.10 se muestran las señales (intensidad vs tiempo) correspondientes a cuatro gotas, en verde se graficaron las señales obtenidas al operar el láser con potencia de 2 mW, mientras que en azul se muestran las señales cuando se aumentó la potencia del láser a 10 mW.

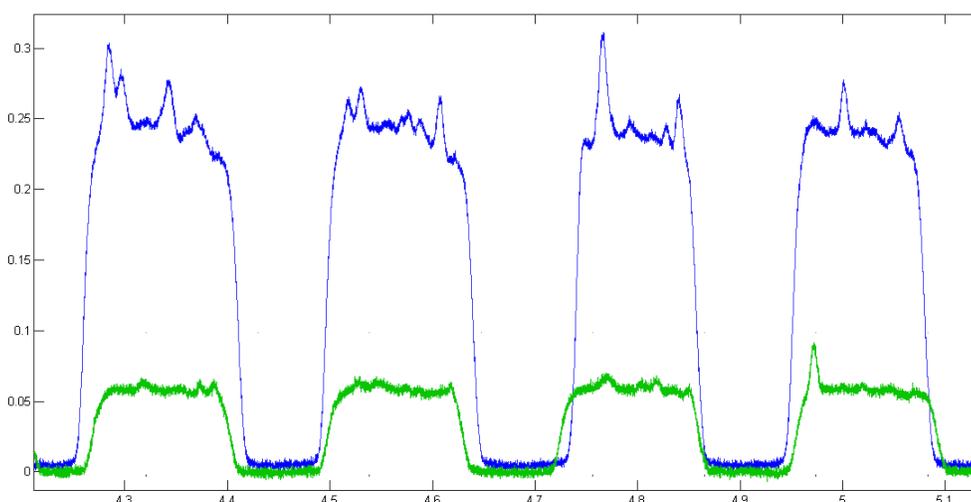


Figura 4.10 Comparación entre las intensidades de las señales usando el láser a 2 mW (verde) y a 10 mW (azul). Condiciones: 90 μ L/h de cultivo celular, 90 μ L/h de aceite, Objetivo: 40x.

Este efecto se podría explicar tomando en cuenta que dentro de la gota hay corrientes de flujo, como se muestra en la Figura 2.3. La velocidad resultante de la célula en el centro de la gota, que es la zona en donde se enfoca el láser, es la suma de la velocidad de la gota más la velocidad de la corriente interna.

Para mejorar la detección de las células y con el fin de no usar el láser a su máxima potencia, ya que esto reduce su vida útil, se decidió fijar la potencia en 8.5 mW.

4.2.1 PRUEBAS CON CÉLULAS VIVAS.

Para la caracterización de las señales correspondientes a células vivas, se hizo una prueba inicial con una densidad óptica de 0.84 a 670 nm y utilizando un filtro de entre 500 nm y 550 nm para observar sólo la fluorescencia de las células verdes (ver sección 2.4 Viabilidad celular). Las señales de las microgotas que se obtuvieron contenían un gran número de picos sobrepuestos, impidiendo su fácil identificación de manera individual.

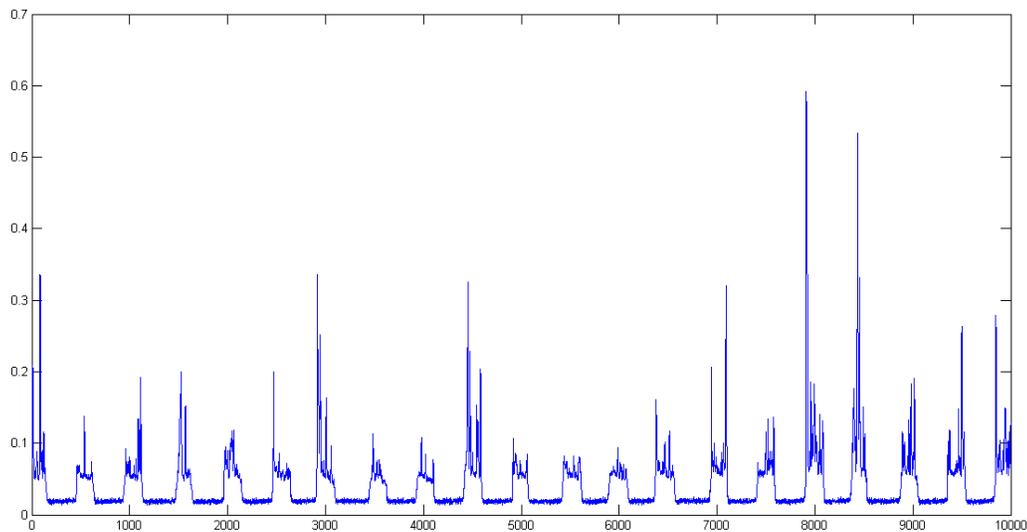


Figura 4.11 Con $DO_{670}=0.84$ el número de células por gota resulta excesivo.

A partir de este valor se comenzó a disminuir la concentración de las células y se encontró que la densidad óptica ideal a 670 nm se encuentra entre 0.2 y 0.1. En la Figura 4.12 se muestran las señales correspondientes a 6 microgotas, en este caso, las señales de las células dejaron de sobreponerse, permitiendo que su detección por medio del programa *findpeaks* en MATLAB fuera más fiable.

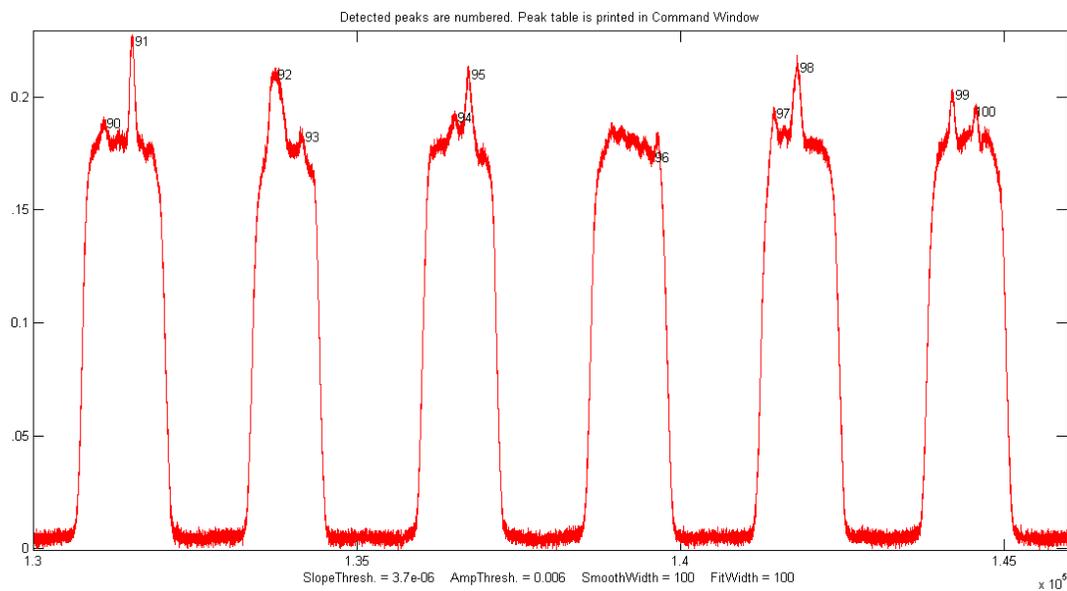
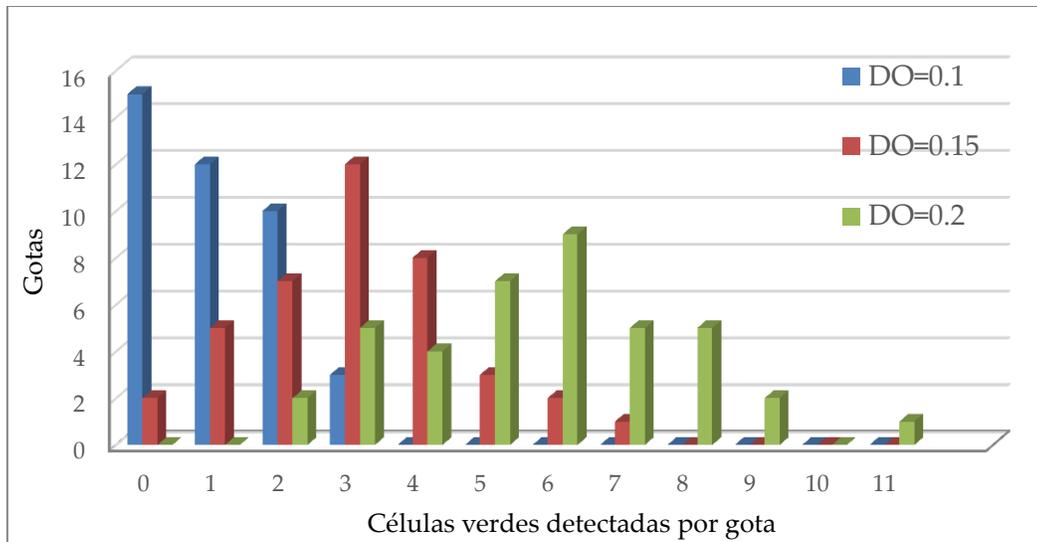


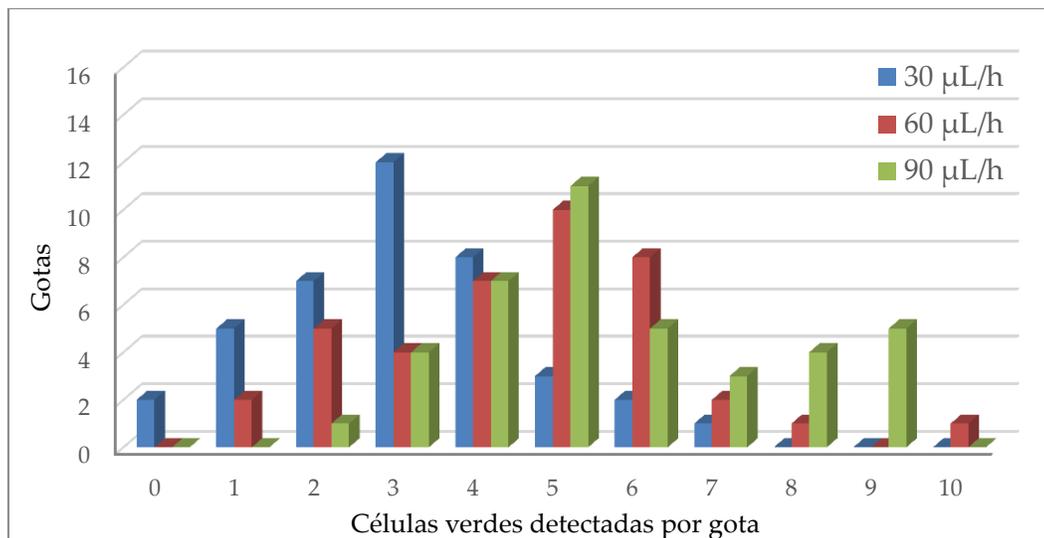
Figura 4.12 El número de células por gota disminuyó al fijar la $DO_{670}=0.1$.

En la Gráfica 4-5 se muestra la distribución del número de células por gota para diferentes concentraciones de células. El flujo de la suspensión de células fue de 30 $\mu\text{L/h}$ y el flujo de aceite se fijó en 90 $\mu\text{L/h}$.



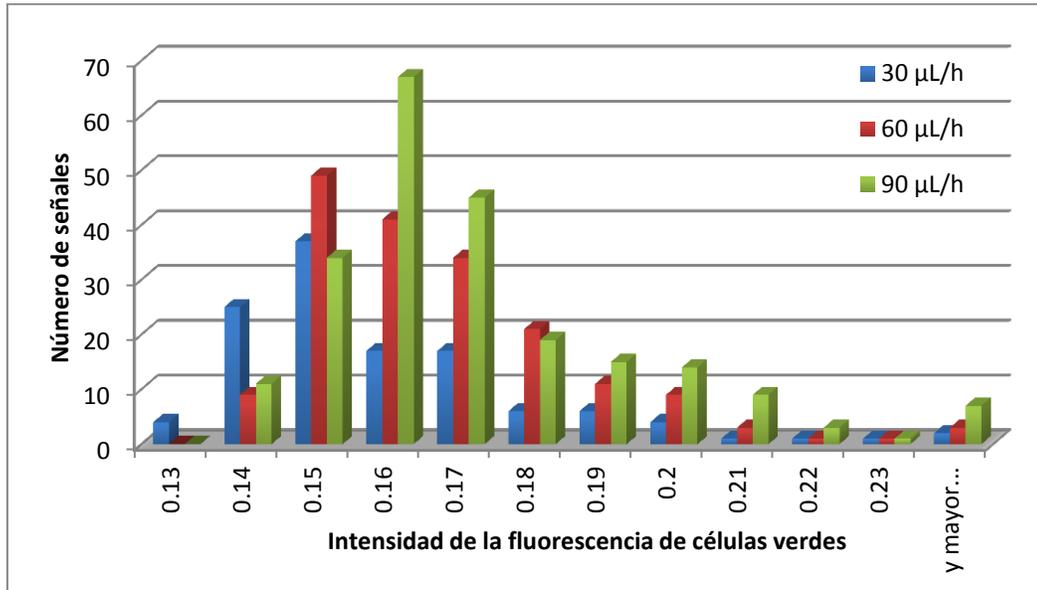
Gráfica 4-5 Distribución del número de células verdes detectadas por gota para diferentes concentraciones de células y flujo constante (células: $30 \mu\text{L/h}$, aceite: $90 \mu\text{L/h}$). Potencia del láser: 8.5 mW , Objetivo $40\times$, concentración de los tintes $5.01 \mu\text{M}$ SYTO 9 y $30 \mu\text{M}$ IP, 80% vol. Percoll. Densidades ópticas (DO) a 670 nm .

A partir de los datos observados en la Gráfica 4-5 se decidió trabajar con una densidad óptica de 0.15. Con esta concentración de células, se bombearon $30 \mu\text{L/h}$, $60 \mu\text{L/h}$ y $90 \mu\text{L/h}$ del cultivo, manteniendo el flujo de aceite fijo en $90 \mu\text{L/h}$.



Gráfica 4-6 Distribución del número de células verdes detectadas por gota para diferentes flujos de células (30 , 60 y $90 \mu\text{L/h}$), $DO_{670}=0.15$, flujo de aceite de $90 \mu\text{L/h}$. Potencia del láser: 8.5 mW , Objetivo $40\times$, concentración de los tintes $5.01 \mu\text{M}$ SYTO 9 y $30 \mu\text{M}$ IP, 80% vol. Percoll.

Gracias a la Gráfica 4-6 se observó que al aumentar la relación de flujo agua/aceite de 0.3 a 1, el número de células detectadas en cada gota se incrementa. Además, la distribución del número de células por gota de cada uno de los experimentos se desplaza hacia la derecha.



Gráfica 4-7 Distribución del intensidad de fluorescencia de células vivas para diferentes flujos de células (30, 60 y 90 µL/h), $DO_{670}=0.15$, flujo de aceite de 90 µL/h. Potencia del láser: 8.5 mW, Objetivo 40x, concentración de los tintes 5.01 µM SYTO 9 y 30 µM IP, 80% vol. Percoll.

En la Gráfica 4-7 se muestra tanto el aumento del número de células (a mayor flujo suministrado de fase acuosa inyectada, mayor es el tamaño de las gotas), como el incremento en la intensidad de la fluorescencia de las células en las microgotas.

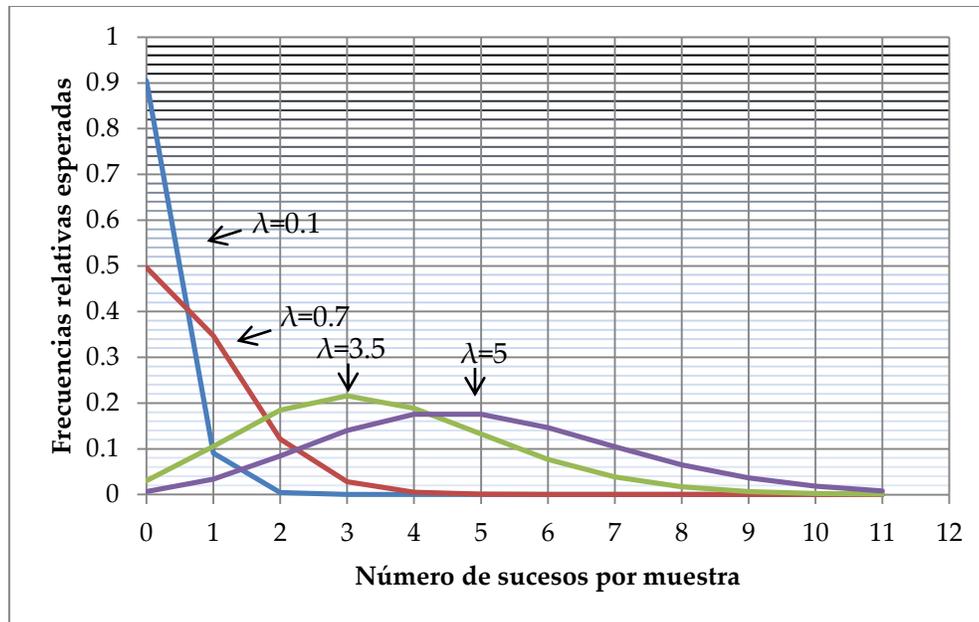
De acuerdo a Mazutis et al. [25] la frecuencia de aparición de un determinado número de células dentro de una gota sigue una distribución de Poisson:

$$P(x, \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!}$$

x = Numero de células por gota.

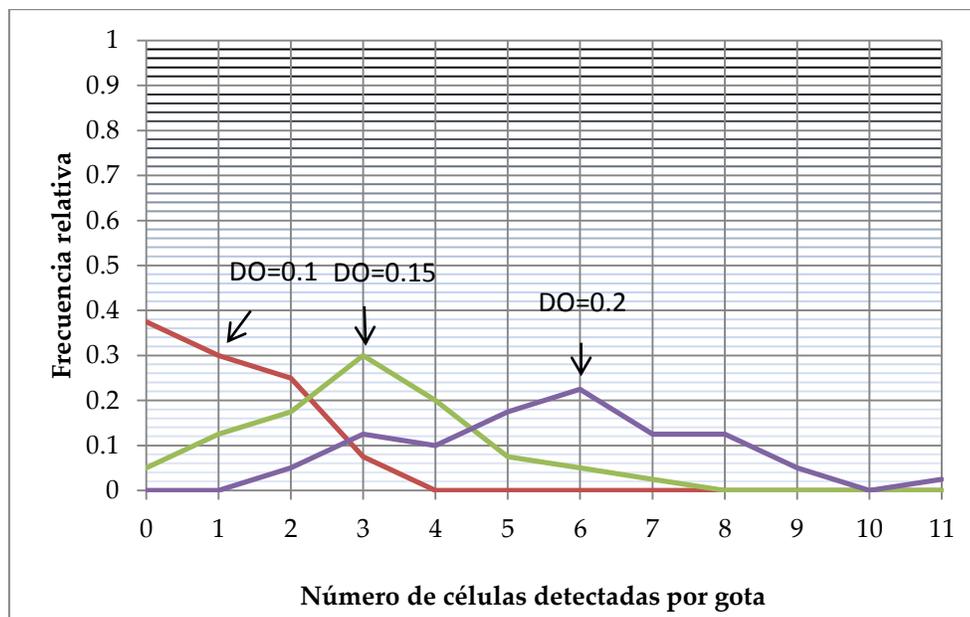
λ = Número medio de células en cada microgota.

$e = 2.71828$



Gráfica 4-8 Polígonos de frecuencias teóricas de la distribución de Poisson para diversos valores de la media.

Al pasar la Gráfica 4-5 a valores relativos, se obtiene la Gráfica 4-9.



Gráfica 4-9 Polígonos de frecuencia experimentales de la distribución del número de células por gota para diferentes concentraciones de células.

Es clara la similitud entre las Gráfica 4-8 y Gráfica 4-9, lo que demuestra que la distribución experimental de las células sigue una distribución de Poisson.

Al utilizar el filtro que permite el paso de luz roja (desde 572 nm hasta 642 nm) con un cultivo de células vivas, no se observaron señales que indicaran la presencia de células muertas (Figura 4.13), únicamente aparecieron señales con poca intensidad y en una cantidad tan pequeña que no resultan estadísticamente relevantes.

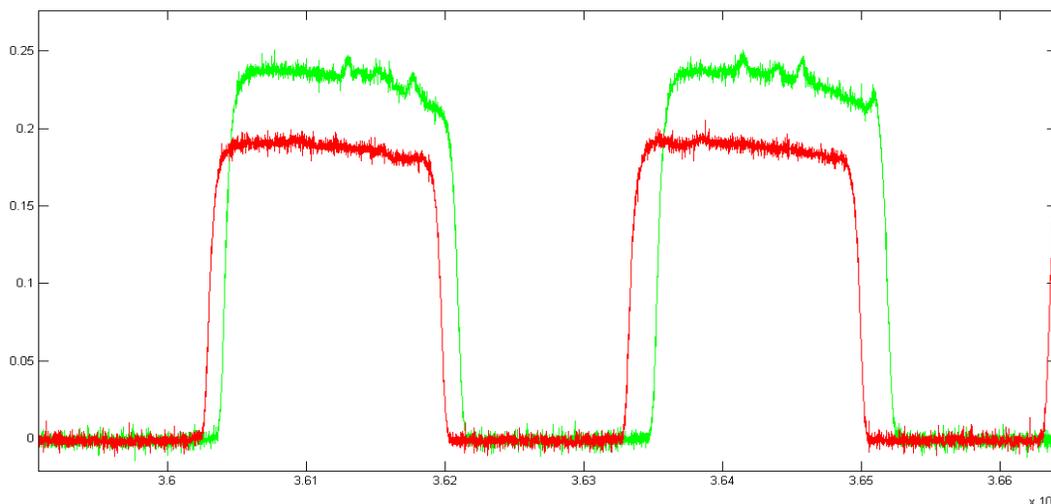


Figura 4.13 La fluorescencia verde muestra picos, indicando la presencia de células vivas; con el filtro rojo no se detectaron señales de células, en este caso muertas, en las gotas.

A diferencia de lo observado en estos experimentos, se ha reportado en estudios con otras bacterias, como la *Bacillus clausii* y la *Listeria monocytogenes*, que las poblaciones de células vivas presentan la misma intensidad de fluorescencia roja que las poblaciones de células muertas [26]. Gracias a esta evidencia, es posible descartar que las células vivas emiten fluorescencia roja.

4.2.2 PRUEBAS CON CÉLULAS MUERTAS

El protocolo proporcionado por el fabricante del kit de viabilidad [17] recomienda matar las bacterias con isopropanol al 70% para hacer la diferenciación entre células vivas y muertas. Después de seguir el procedimiento recomendado e introducir las células en los microchips no se obtuvieron señales claras de

fluorescencia con ninguno de los dos filtros. Es probable que el isopropanol no sólo dañe la membrana celular, sino que también desintegre gran parte de las células.

Se encontró que es posible dañar la membrana celular al someter las bacterias en un baño térmico a 65 °C por 30 minutos [18]. De esta manera, y después de seguir con el protocolo para la tinción de tintas, las bacterias comenzaron a emitir fluorescencia que atravesó el filtro rojo, misma que fue detectada por el fotodiodo.

En este caso se hicieron varias pruebas en las cuales se aumentó el tiempo que las células pasaron en el baño térmico. Desde 20 hasta 40 minutos. Con 40 minutos a 65 °C, hubo emisión tanto de señales en el espectro rojo como en el verde, pero es improbable que estas señales indiquen la presencia de células vivas, ya que en el estudio desarrollado por Jepras, R.I., et al. [18], sólo bastaron 30 minutos con la misma temperatura para no observar unidades formadoras de colonias (UFC) en platos de agar.

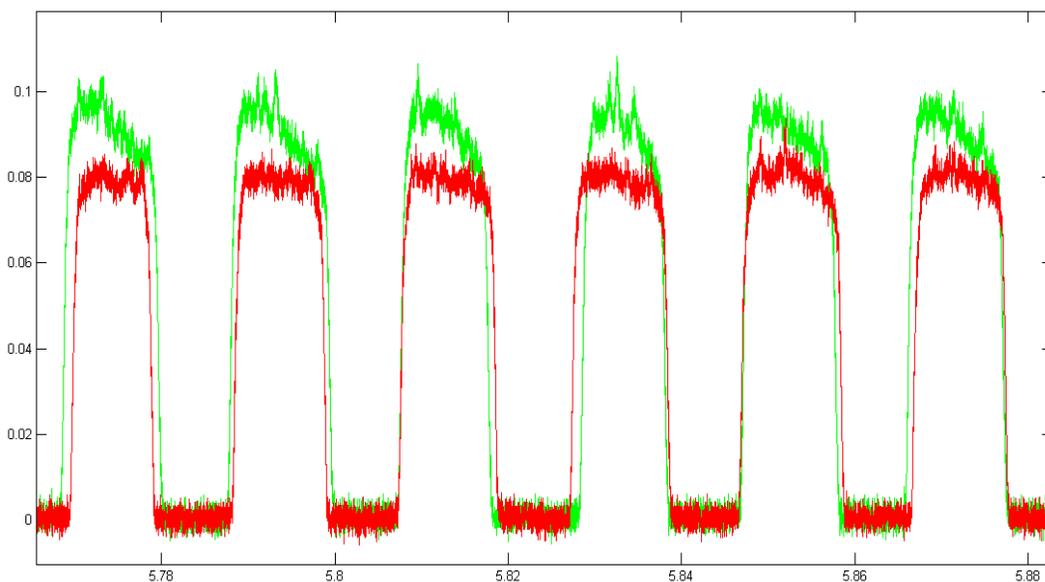


Figura 4.14 Señales emitidas por células tratadas con calor. En verde se graficaron las señales que pasaron a través del verde; en rojo, las señales que atravesaron el filtro rojo.

En la Figura 4.14 se observa que las células, a pesar de no estar vivas, emiten fluorescencia verde y roja al mismo tiempo.

El principal inconveniente de usar tiempos prolongados para dañar a las células es que el número de células detectadas se reduce con el tiempo, como lo muestran las siguientes pruebas.

4.2.3 PRUEBAS CON MEZCLAS DE CÉLULAS VIVAS Y MUERTAS

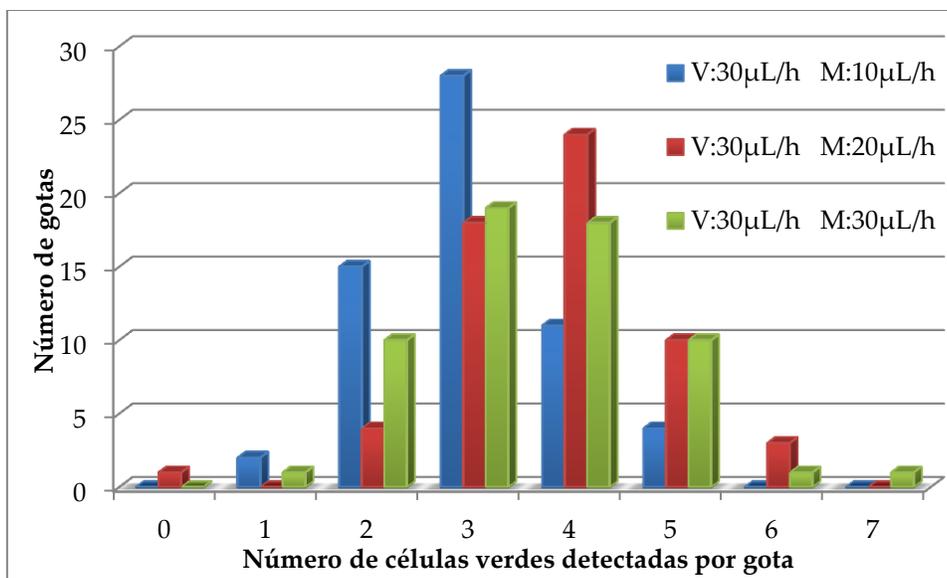
Después de caracterizar la fluorescencia de células muertas, se procedió a hacer mezclas de células vivas con muertas, esto con el objeto de observar los efectos en la fluorescencia que provoca la variación de flujos de ambos tipos de células.

La prueba se inició con un flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{h}$ de células vivas y, para observar el aumento de señales de células muertas, se incrementó el flujo de esta suspensión celular desde 10 $\mu\text{L}/\text{h}$ hasta 30 $\mu\text{L}/\text{h}$.

En esta y en las siguientes pruebas, se tomó una muestra de 60 gotas para su análisis. Los resultados se exponen en la Gráfica 4-10.

Tabla 4—5 Número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células muertas y manteniendo constante el flujo de células vivas.

Número de células verdes por gota	V:30$\mu\text{L}/\text{h}$ M:10$\mu\text{L}/\text{h}$	V:30$\mu\text{L}/\text{h}$ M:20$\mu\text{L}/\text{h}$	V:30$\mu\text{L}/\text{h}$ M:30$\mu\text{L}/\text{h}$
0	0	1	0
1	2	0	1
2	15	4	10
3	28	18	19
4	11	24	18
5	4	10	10
6	0	3	1
7	0	0	1
<i>Total de células</i>	<i>180</i>	<i>226</i>	<i>213</i>



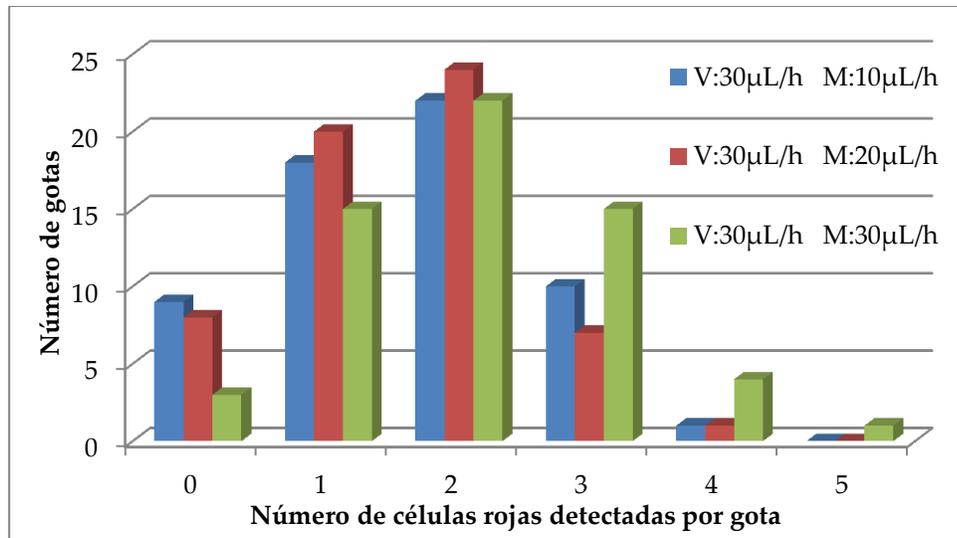
Gráfica 4-10 Distribuciones del número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células muertas y manteniendo constante el flujo de células vivas.

Se observa que el número de células verdes detectadas aumenta junto con el flujo de células muertas, este es un posible indicador de que las células muertas también emiten fluorescencia verde, lo cual puede deberse a que el yoduro de propidio no desplaza totalmente al SYTO 9 en las células muertas.

Con esos mismos flujos se midió la fluorescencia roja y en la Gráfica 4-11 se muestran los resultados de estas mediciones.

Tabla 4—6 Número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células muertas y manteniendo constante el flujo de células vivas.

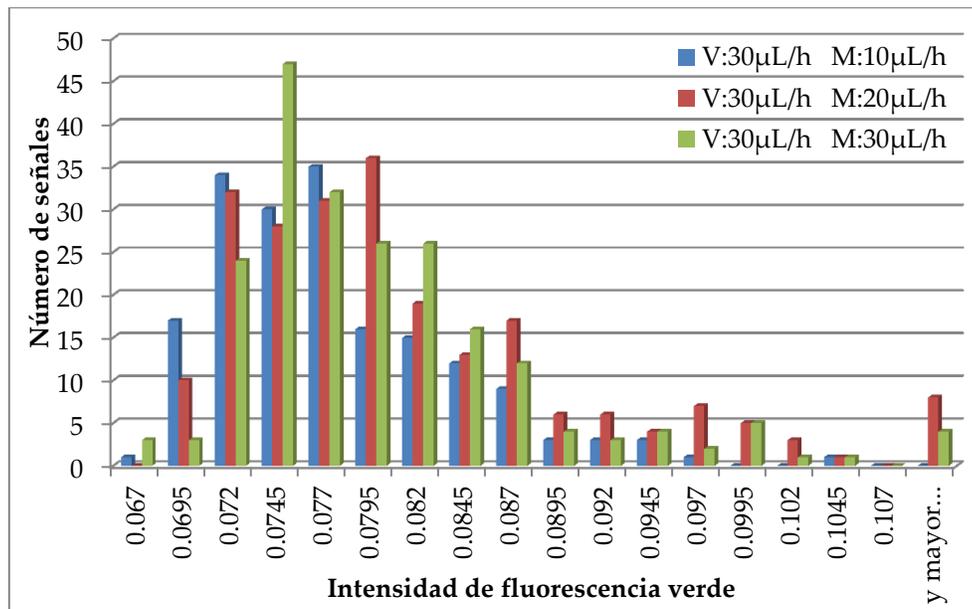
Número de células rojas por gota	V:30µL/h M:10µL/h	V:30µL/h M:20µL/h	V:30µL/h M:30µL/h
0	9	8	3
1	18	20	15
2	22	24	22
3	10	7	15
4	1	1	4
5	0	0	1
Total de células	96	93	125



Gráfica 4-11 Distribuciones del número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células muertas y manteniendo constante el flujo de células vivas.

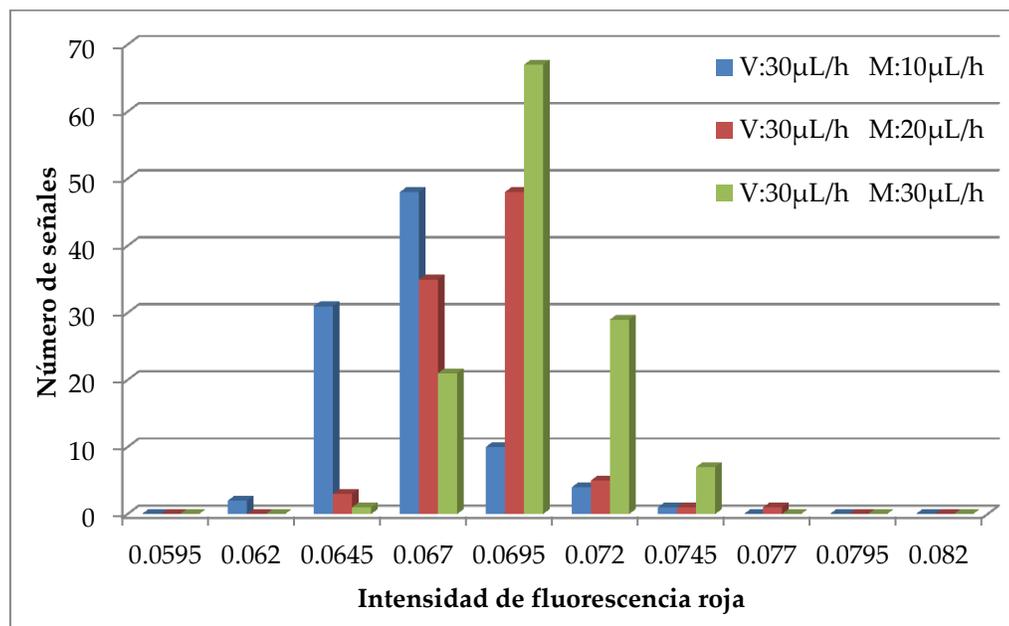
Se observó la tendencia esperada, el aumento de células rojas de 30%, pasando de 96 a 125 señales.

A continuación, en la Gráfica 4-12, se exponen las distribuciones de la intensidad de fluorescencia para células verdes a diferentes flujos totales.



Gráfica 4-12 Mediciones de intensidad de fluorescencia de células verdes, manteniendo constante el flujo de células vivas y aumentando el de células muertas.

En la Gráfica 4-12 se observa que la intensidad de fluorescencia verde se incrementa ligeramente junto con el aumento de flujo.



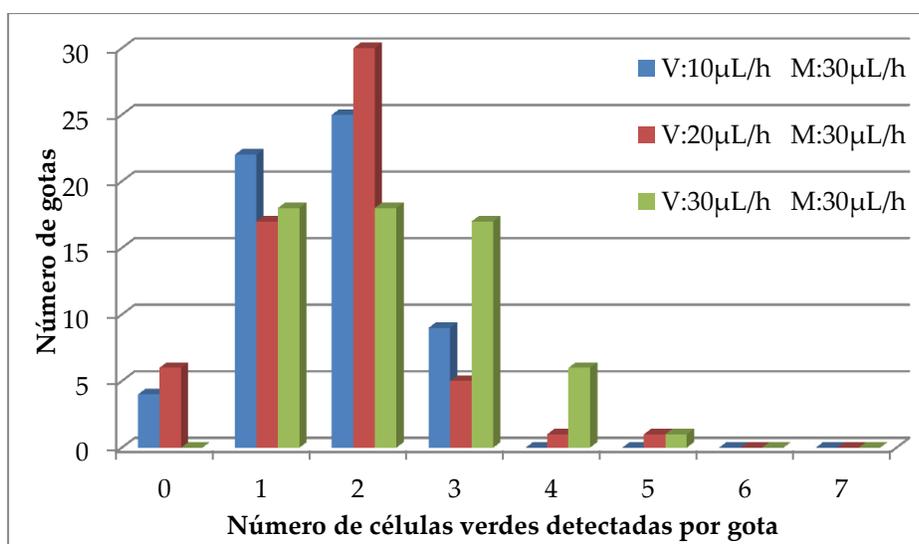
Gráfica 4-13 Distribuciones de intensidad de fluorescencia de células rojas, mientras se incrementa el flujo de células muertas, manteniendo el flujo de células vivas constante.

En la Gráfica 4-13 se observa con más claridad, debido a que las distribuciones son más angostas, que el aumento del flujo también afecta la intensidad de fluorescencia.

Con las mismas suspensiones celulares, a continuación se mantuvo constante el flujo de la suspensión con células muertas y se modificó el flujo de células vivas. En la Gráfica 4-14 se presentan los resultados de las mediciones de fluorescencia con el filtro verde.

Tabla 4—7 Número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células vivas y manteniendo constante el flujo de células muertas.

Número de células verdes por gota	V:10 μ L/h M:30 μ L/h	V:20 μ L/h M:30 μ L/h	V:30 μ L/h M:30 μ L/h
0	4	6	0
1	22	17	18
2	25	30	18
3	9	5	17
4	0	1	6
5	0	1	1
6	0	0	0
7	0	0	0
Total de células	99	101	134



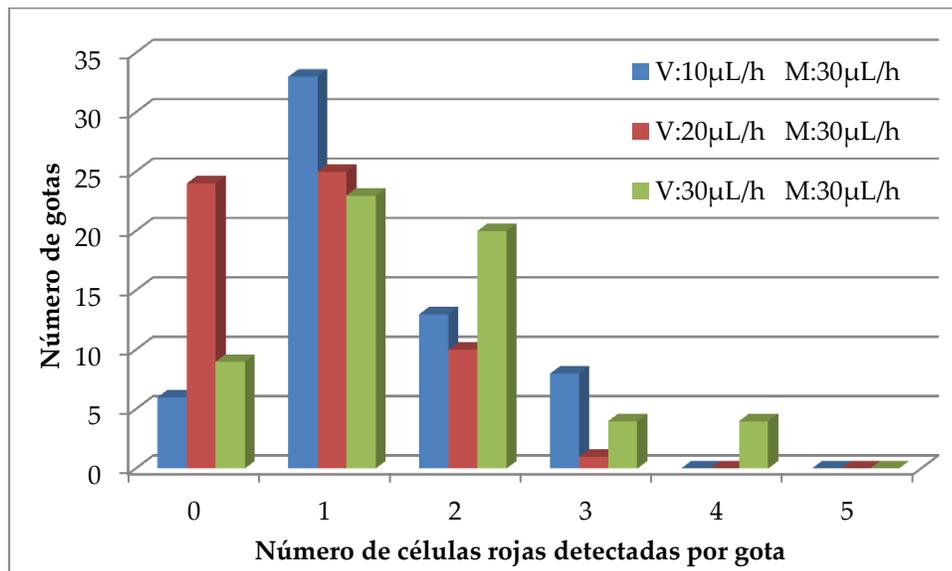
Gráfica 4-14 Distribuciones del número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células vivas y manteniendo constante el flujo de células muertas.

En la Gráfica 4-14 se observa que el número de células verdes aumentó junto con el flujo de células vivas, se pasó de 101 a 134 células, lo cual es un indicador de que las células vivas emiten fluorescencia verde.

Las mediciones con el filtro rojo se muestran a continuación en la Gráfica 4-15.

Tabla 4—8 Número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células vivas y manteniendo constante el flujo de células muertas.

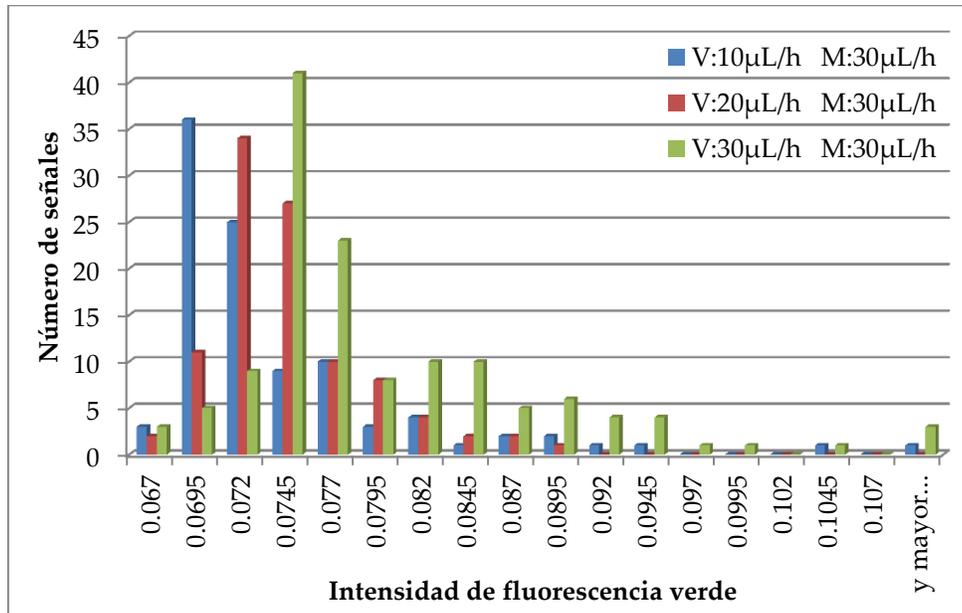
Número de células rojas por gota	V:10 μ L/h M:30 μ L/h	V:20 μ L/h M:30 μ L/h	V:30 μ L/h M:30 μ L/h
0	6	24	9
1	33	25	23
2	13	10	20
3	8	1	4
4	0	0	4
5	0	0	0
Total de células	83	48	91



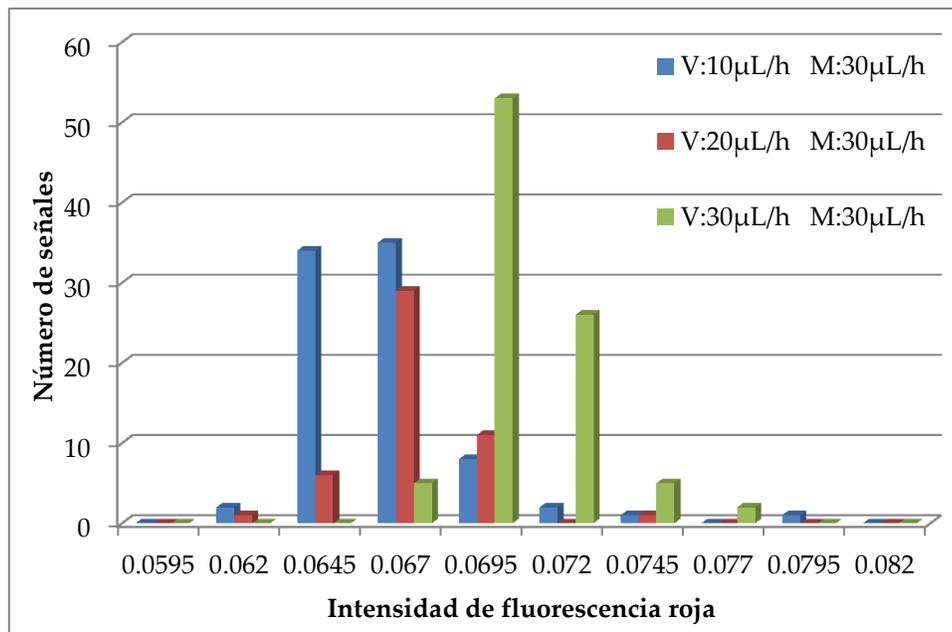
Gráfica 4-15 Distribuciones del número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células vivas y manteniendo constante el flujo de células muertas.

En la Gráfica 4-15 se muestra un comportamiento irregular del número de células rojas a pesar de no haber modificado el flujo de células muertas, una posible explicación a este efecto que no se esperaba es que para formar las microgotas sólo se usaron dos de las tres entradas correspondientes a la fase acuosa, la tercera entrada sin usar puede servir como una reserva de células vivas y muertas y es quizás esta la

razón por la cual no se observa la tendencia esperada. Lo ideal habría sido construir microchips con sólo dos entradas para evitar tener volúmenes de fluido estancados.



Gráfica 4-16 Distribuciones de intensidad de fluorescencia de células verdes, mientras se incrementa el flujo de células vivas, manteniendo el flujo de células muertas constante.



Gráfica 4-17 Distribuciones de intensidad de fluorescencia de células rojas, mientras se incrementa el flujo de células vivas, manteniendo el flujo de células muertas constante.

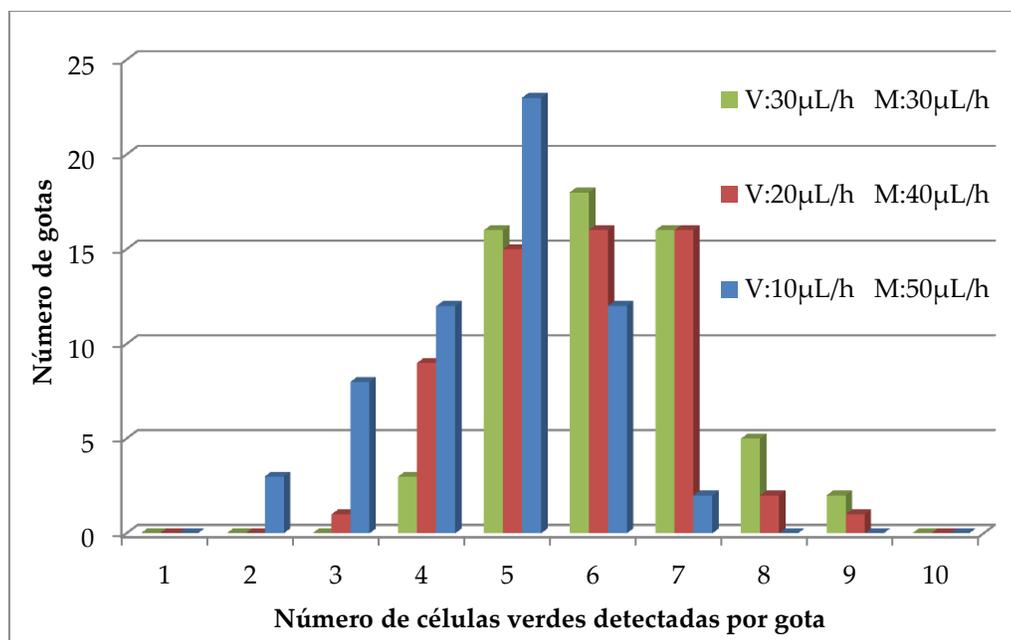
Nuevamente la tendencia con respecto a la fluorescencia, tanto verde como roja, es el aumento de la intensidad cuando los flujos se incrementan (Gráfica 4-16 y Gráfica 4-17).

Por último, si comparamos las dos mediciones con flujos de 30 $\mu\text{L/h}$ de vivas y 30 $\mu\text{L/h}$ de células muertas encontramos que entre la primera (Gráfica 4-10 y Gráfica 4-11) y la última medición (Gráfica 4-14 y Gráfica 4-15) hay disminución tanto de células verdes como de rojas. Con el filtro rojo se detectaron 92 señales menos en la segunda medición, mientras que con el filtro verde el descenso fue de 79. Estos resultados posiblemente evidencien que las células que tienen la membrana celular comprometida emiten fluorescencia roja y verde al mismo tiempo debido a que el yoduro de propidio no desplaza totalmente al SYTO 9. La disminución del número de células no viables detectadas se debe probablemente a que sufren lisis celular. Se ha observado que las células con la membrana celular dañada debido a la acción de un antibiótico betalactámico pueden sobrevivir en un medio isotónico en forma de esferoplastos o protoplastos, pero éstos son altamente sensibles a la presión osmótica [27]. Entonces, se puede suponer que las células sufren lisis debido a que el Percoll resulta ser un medio hipotónico para las células.

Se prepararon nuevas suspensiones de células vivas y muertas y se bombearon a flujos totales constantes para mantener constante el tamaño de las gotas, el flujo de aceite se mantuvo constante (90 $\mu\text{L/h}$). Los resultados se presentan a continuación.

Tabla 4—9 Número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células muertas y disminuyendo el flujo de células vivas.

Número de células verdes por gota	V:30 μ L/h M:30 μ L/h	V:20 μ L/h M:40 μ L/h	V:10 μ L/h M:50 μ L/h
1	0	0	0
2	0	0	3
3	0	1	8
4	3	9	12
5	16	15	23
6	18	16	12
7	16	16	2
8	5	2	0
9	2	1	0
10	0	0	0
Total de células	370	347	279

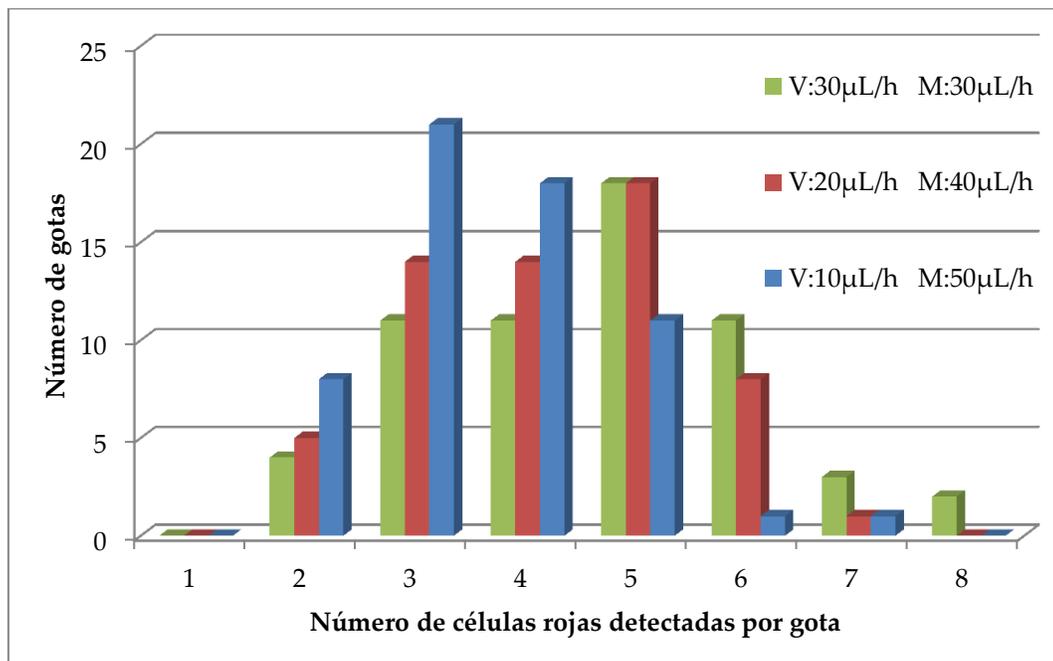


Gráfica 4-18 Distribuciones del número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células muertas y disminuyendo el flujo de células vivas.

En la Gráfica 4-18 se tiene que el número total de células verdes disminuye conforme se aumenta el flujo de células muertas y disminuye el de células vivas.

Tabla 4—10 Número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células muertas y disminuyendo el flujo de células vivas.

Número de células rojas por gota	V:30 μ L/h M:30 μ L/h	V:20 μ L/h M:40 μ L/h	V:10 μ L/h M:50 μ L/h
1	0	0	0
2	4	5	8
3	11	14	21
4	11	14	18
5	18	18	11
6	11	8	1
7	3	1	1
8	2	0	0
Total de células	278	253	219

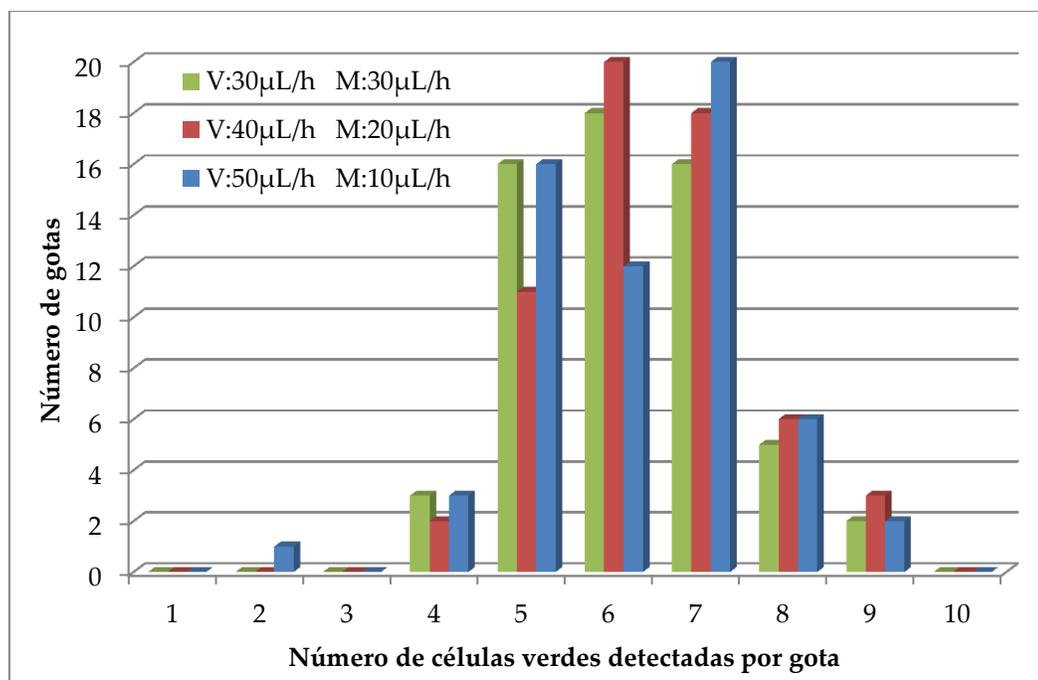


Gráfica 4-19 Distribuciones del número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células muertas y disminuyendo el flujo de células vivas.

En la Gráfica 4-19 se observa que, aunque el flujo de células muertas aumenta, el número total de células rojas disminuye de manera constante. Nuevamente la causa más probable de este fenómeno es que las células rojas, que tienen la membrana celular dañada, se desintegran debido a la presión osmótica.

Tabla 4—11 Número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células vivas y disminuyendo el flujo de células muertas.

Número de células verdes por gota	V:30 μ L/h M:30 μ L/h	V:40 μ L/h M:20 μ L/h	V:50 μ L/h M:10 μ L/h
1	0	0	0
2	0	0	1
3	0	0	0
4	3	2	3
5	16	11	16
6	18	20	12
7	16	18	20
8	5	6	6
9	2	3	2
10	0	0	0
Total de células	370	384	372



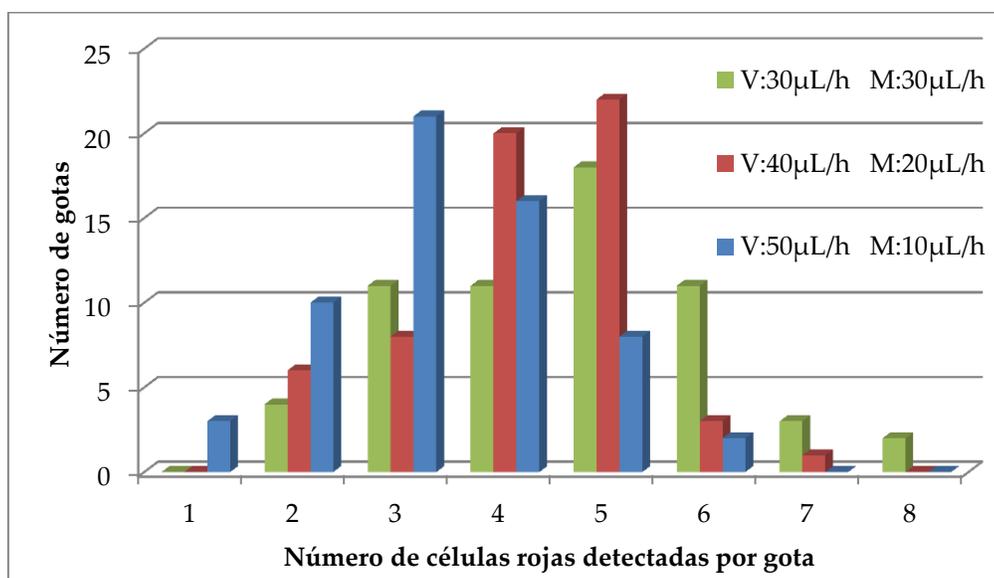
Gráfica 4-20 Distribuciones del número de células verdes por gota, aumentando el flujo de células vivas y disminuyendo el flujo de células muertas.

De la Gráfica 4-20 resulta interesante que el número de células verdes permanezca constante, a pesar de incrementar el flujo de células vivas. Una causa probable es que las células muertas fluorescen también de color verde, de manera

que, en los primeros experimentos, las células verdes que se detectan provienen del cultivo de células muertas; como estas células dañadas no son muy estables en el medio (como lo muestran las mediciones con el filtro rojo) su contribución en el número de señales verdes va disminuyendo con el tiempo, pero el hecho de incrementar el flujo de células vivas hace que el número total de células verdes se mantenga casi constante.

Tabla 4—12 Número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células vivas y disminuyendo el flujo de células muertas.

Número de células rojas por gota	V:30 μ L/h M:30 μ L/h	V:40 μ L/h M:20 μ L/h	V:50 μ L/h M:10 μ L/h
1	0	0	3
2	4	6	10
3	11	8	21
4	11	20	16
5	18	22	8
6	11	3	2
7	3	1	0
8	2	0	0
Total de células	278	251	202



Gráfica 4-21 Distribuciones del número de células rojas por gota, aumentando el flujo de células vivas y disminuyendo el flujo de células muertas.

En la Gráfica 4-21 se observa la disminución del número de células rojas debido, por un lado, a la disminución del flujo de células muertas y, por otro, a la lisis que sufren las células en este cultivo.

4.3 ENSAYOS PARA COMPROBAR EL EFECTO DE AMPICILINA EN CÉLULAS DE *E. COLI*

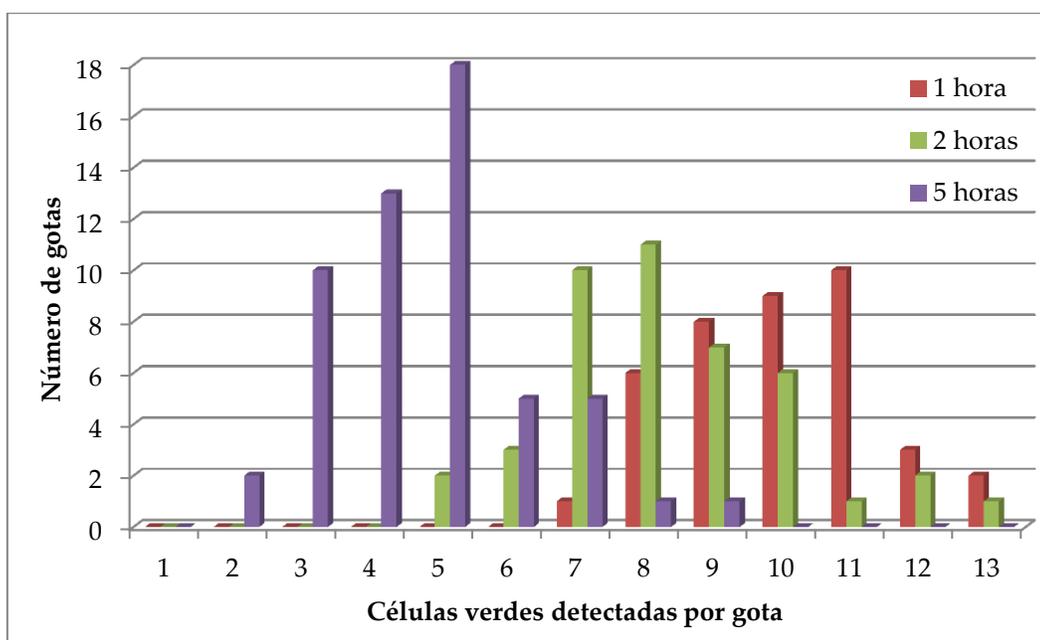
4.3.1 EFECTO DE LA AMPICILINA EN UN CULTIVO DE *E. COLI* MEDIDO DENTRO DE UN MICROCHIP

Se siguió el Protocolo para el crecimiento y tinción de cultivos de *E. coli.*, presentado en el capítulo 3.2, para obtener células sanas y observar el efecto que tiene la ampicilina sobre ellas, en la Figura 3.11 se esquematiza el arreglo experimental.

En esta prueba tanto el flujo de células como el de aceite se mantuvieron constantes, en 10 $\mu\text{L/h}$ de células y 30 $\mu\text{L/h}$ de aceite, la $\text{DO}_{670}=0.2$, la concentración de los tintes 5.01 μM SYTO 9 y 30 μM IP, potencia del láser: 8.5 mW, Objetivo 40x y 80% vol. de Percoll. Antes de cargar la suspensión de células en la jeringa, se agregaron 5 μL de ampicilina (50 mg/mL) a los 500 μL de suspensión, quedando una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$, que es 10 veces más alta que la concentración de trabajo habitual, para observar un cambio rápido en el estado de viabilidad celular .

Tabla 4—13 Número de células verdes detectadas por gota del cultivo con ampicilina.

Número de células verdes por gota	1 hora	2 horas	5 horas
0	0	0	0
1	0	0	2
2	0	0	10
3	0	0	13
4	0	2	18
5	0	3	5
6	1	10	5
7	6	11	1
8	8	7	1
9	9	6	0
10	10	1	0
11	3	2	0
12	2	1	0
<i>Total de células</i>	<i>350</i>	<i>314</i>	<i>203</i>



Gráfica 4-22 Distribuciones del número de células verdes detectadas por gota del cultivo con ampicilina. Se observa que la ampicilina provoca un descenso en el número de células por gota conforme avanza el tiempo.

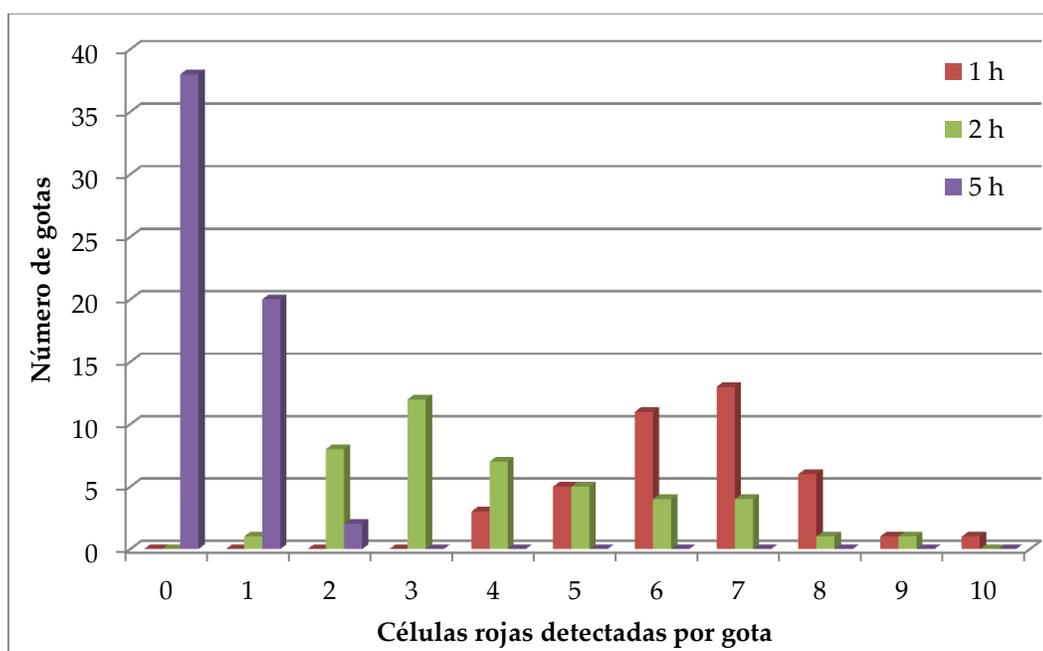
En la Gráfica 4-22 se observa que las señales correspondientes a células vivas disminuyen conforme pasa el tiempo.

Estos resultados indican que la ampicilina presenta actividad bactericida sobre las células vivas desde las primeras horas. La ampicilina funciona inhibiendo la síntesis de la pared celular de las bacterias y es más efectivo en la fase de crecimiento, teniendo poco efecto sobre las células en la fase estacionaria [28]. Es posible que el mecanismo de acción de estos antibióticos betalactámicos provoque la activación de enzimas autolíticas como parte de la respuesta restringida de las células [29].

Al analizar el cultivo con el filtro rojo, se obtuvo la Gráfica 4-23.

Tabla 4—14 Número de células rojas detectadas por gota del cultivo con ampicilina. Se observa un descenso más pronunciado en el número de células rojas que las verdes.

Células rojas detectadas por gota	1 hora	2 horas	5 horas
0	0	0	38
1	0	1	20
2	0	8	2
3	0	12	0
4	3	7	0
5	5	5	0
6	11	4	0
7	13	4	0
8	6	1	0
9	1	1	0
10	1	0	0
Total de células	261	175	24



Gráfica 4-23 Distribuciones del número de células rojas detectadas por gota del cultivo con ampicilina. Se observa un descenso más pronunciado en el número de células rojas que las verdes.

En la Gráfica 4-23 se observa que disminuyeron las células que emiten fluorescencia roja, esto podría indicar que las células muertas se están desintegrando

por acción del antibiótico, se ha reportado que la lisis (desintegración de la célula por la ruptura de la membrana celular) de *E. coli* tratadas con antibióticos betalactámicos se promueve a temperaturas inferiores a 42 °C [29]. Además, la lisis posiblemente se acelere por el rápido movimiento de las células dentro de la gota.

4.3.2 EFECTO EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS SIN AMPICILINA A LO LARGO DEL MICROCHIP

Con el fin de observar si viajar en las microgotas a través del microchip tiene un efecto en las células, nuevamente se montó el experimento esquematizado en la Figura 3.9, pero en esta prueba se realizaron mediciones de fluorescencia en la salida, además de la entrada. Se bombeó un cultivo con la $DO_{670}=0.3$ a 10 $\mu\text{L}/\text{h}$ y aceite a 20 $\mu\text{L}/\text{h}$, a este flujo, el tiempo de residencia de las microgotas dentro del microchip es de al menos 8 min 30 s. A continuación se muestra una comparación de las fluorescencias con el filtro verde a la entrada y la salida del microchip.

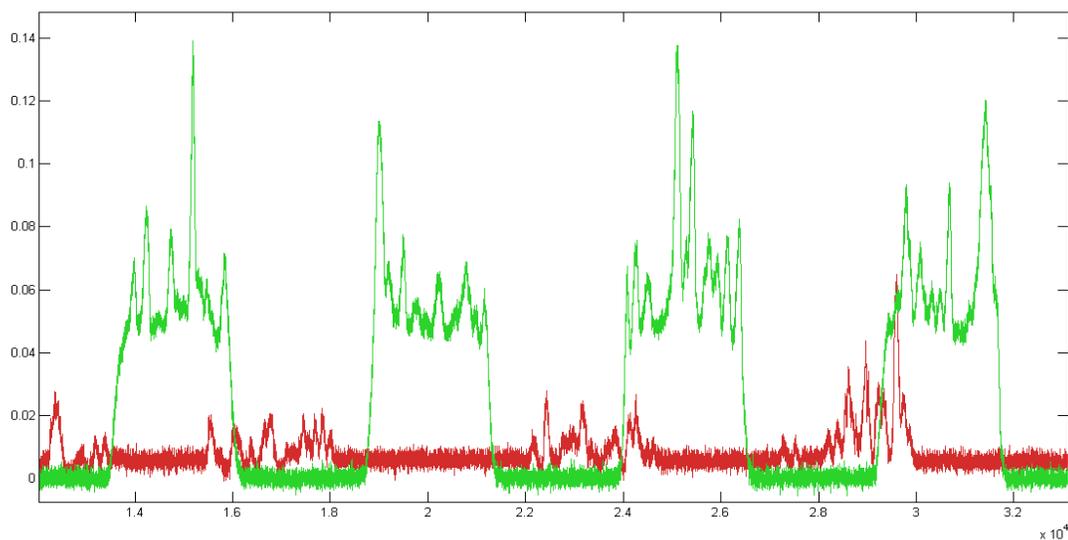
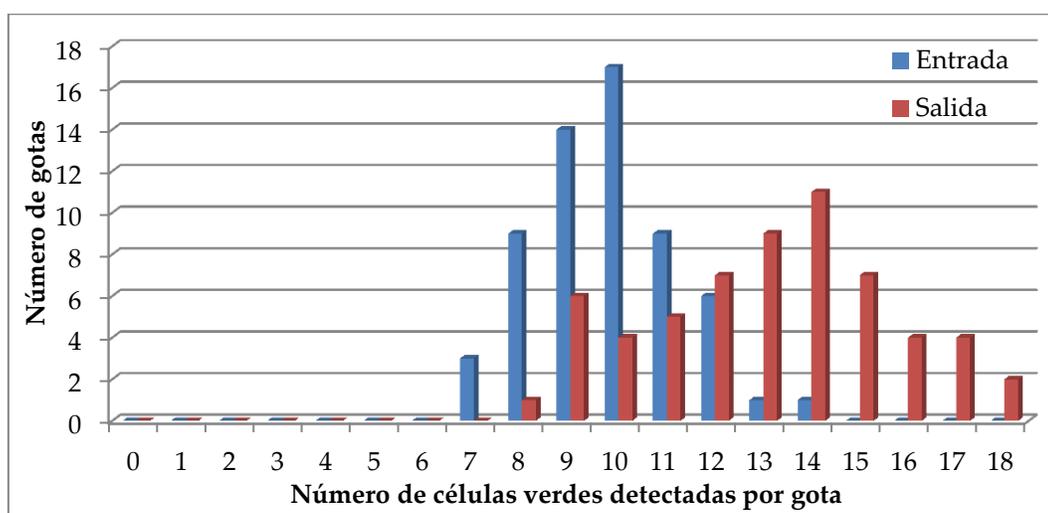


Figura 4.15 En verde se grafica la intensidad de la fluorescencia de las gotas y las células en la entrada del microchip y en rojo, la fluorescencia a la salida.

Lo primero que llama la atención de la Figura 4.15 es que la fluorescencia verde asociada a las gotas desapareció; además, la fluorescencia del aceite (línea base), que antes era de cero, alcanzó un valor promedio de 6×10^{-3} , indicando que el SYTO 9 viaja de la gota hacia el aceite. Los resultados de las mediciones se muestran en la Gráfica 4-24.

Tabla 4—15 Número de células con fluorescencia verde por gota a la entrada y salida del microchip.

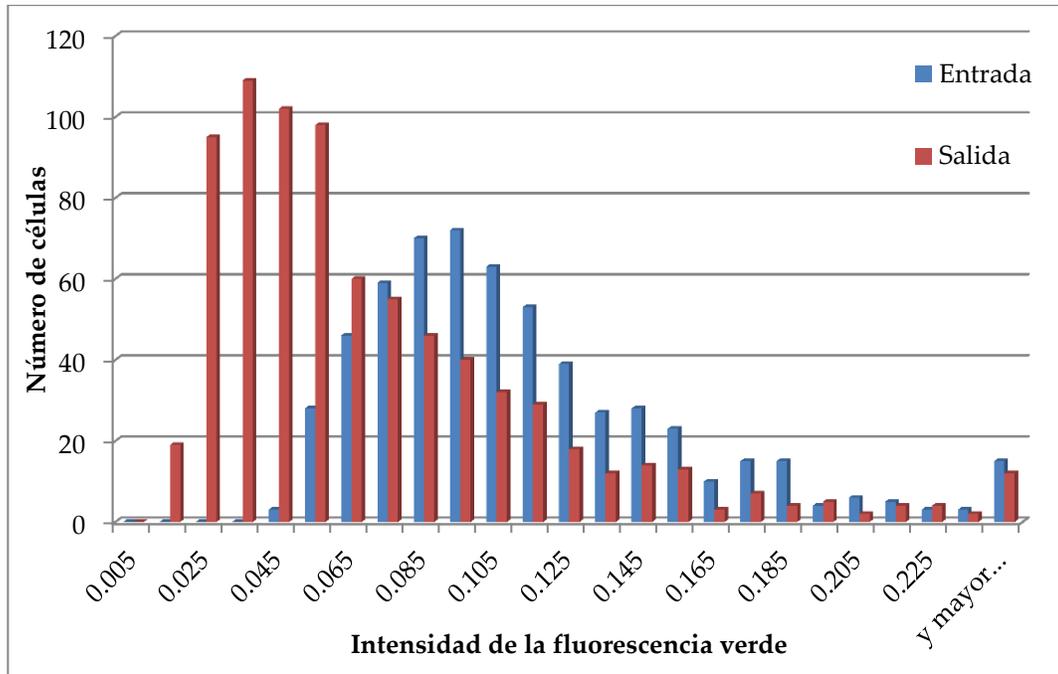
Células verdes detectadas por gota	Entrada	Salida
0-6	0	0
7	3	0
8	9	1
9	14	6
10	17	4
11	9	5
12	6	7
13	1	9
14	1	11
15	0	7
16	0	4
17	0	4
18	0	2
Total de células	587	785



Gráfica 4-24 Distribuciones del número de células con fluorescencia verde por gota a la entrada y salida del microchip.

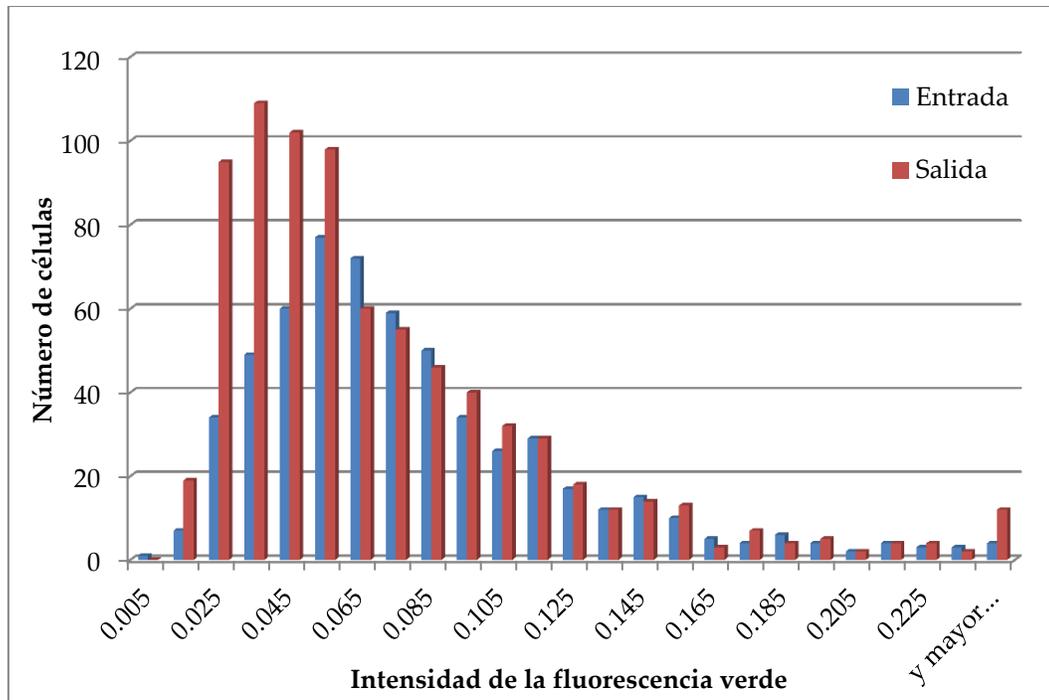
Se observa que en la salida del microchip hay un mayor número de células en cada gota, el número total de células aumento en cerca de 34%, contabilizándose 587 células al inicio y 785 al final (198 células más).

A continuación se muestran las distribuciones de intensidad de las señales de fluorescencia verde, tal y como se obtienen de los datos graficados en la Figura 4.15.



Gráfica 4-25 Fluorescencia verde a la entrada y salida del microchip sin ampicilina tomando en cuenta la fluorescencia causada por las células y las gotas.

En la Gráfica 4-25 se observa que, en la salida, hay un desplazamiento de la distribución de intensidades hacia valores más bajos. Este efecto es creado por la migración del SYTO 9 (una molécula hidrofóbica) a la fase orgánica. Para eliminar este sesgo, se decidió excluir la fluorescencia causada por la gota en la entrada del microchip. En la Gráfica 4-26 se presentan únicamente los valores de fluorescencia asociados a las células.



Gráfica 4-26 Fluorescencia de las células verdes a la entrada y salida del microchip sin ampicilina sin tomar en cuenta la fluorescencia asociada a las gotas.

En la Gráfica 4-26 se observa que hay un aumento importante del número de señales con una intensidad de 0.015 a 0.055, se pasa de 227 a 423 señales de células verdes, mientras que el número de las otras señales se mantienen.

Gracias a esto, se descarta que el aumento de las señales de baja intensidad indique el desplazamiento del SYTO 9 por el yoduro de propidio, si esta fuera la razón, entonces se esperaría que el número de células con intensidad más alta disminuyera, lo cual no sucede.

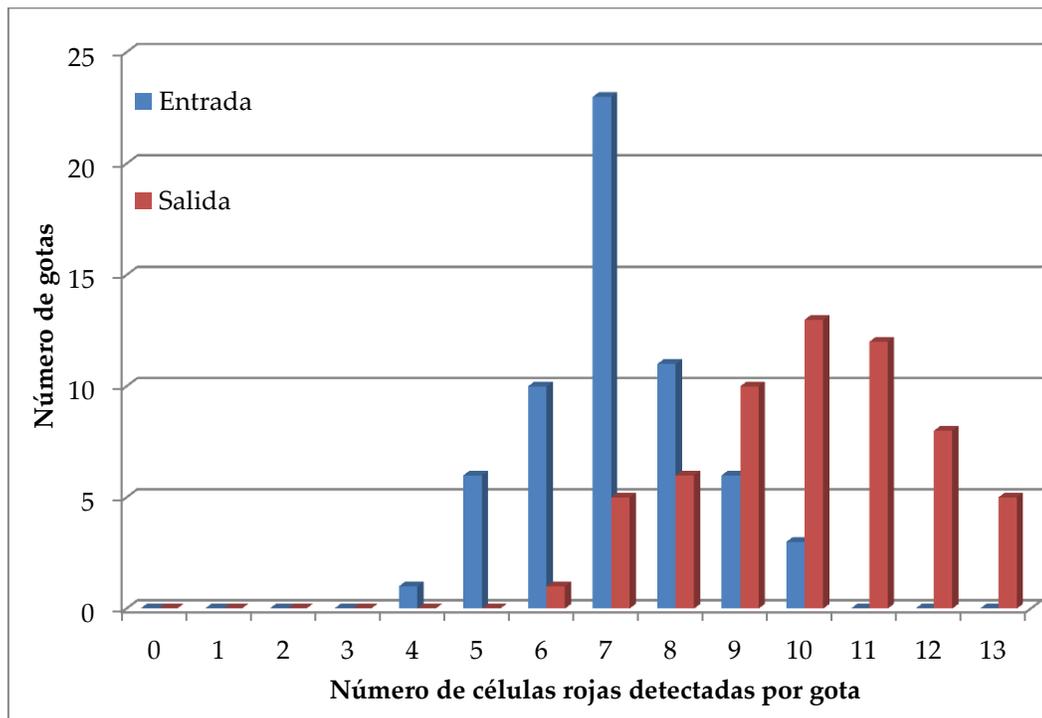
En la Gráfica 4-24 se observaron cerca de 200 señales de células verdes más en la salida que en la entrada y la Gráfica 4-26 muestra que la mayoría de esas señales tuvieron baja fluorescencia verde. Hay tres posibles explicaciones para este efecto:

- Que el aumento del número de señales sea un indicativo de la fragmentación de las células.

- Que las células, al entrar al microchip, se encuentren agrupadas debido a que las resuspensiones no son perfectas.
- Que al pasar el tiempo, el SYTO 9 se intercala en más células, por eso aumentan.
- Que la fluorescencia asociada al complejo formado entre el Percoll y los tintes enmascara la detección de la fluorescencia de las células más débiles.

Esta última posibilidad parece más probable al observar las gráficas de intensidad de fluorescencia con el filtro verde (Gráfica 4-26).

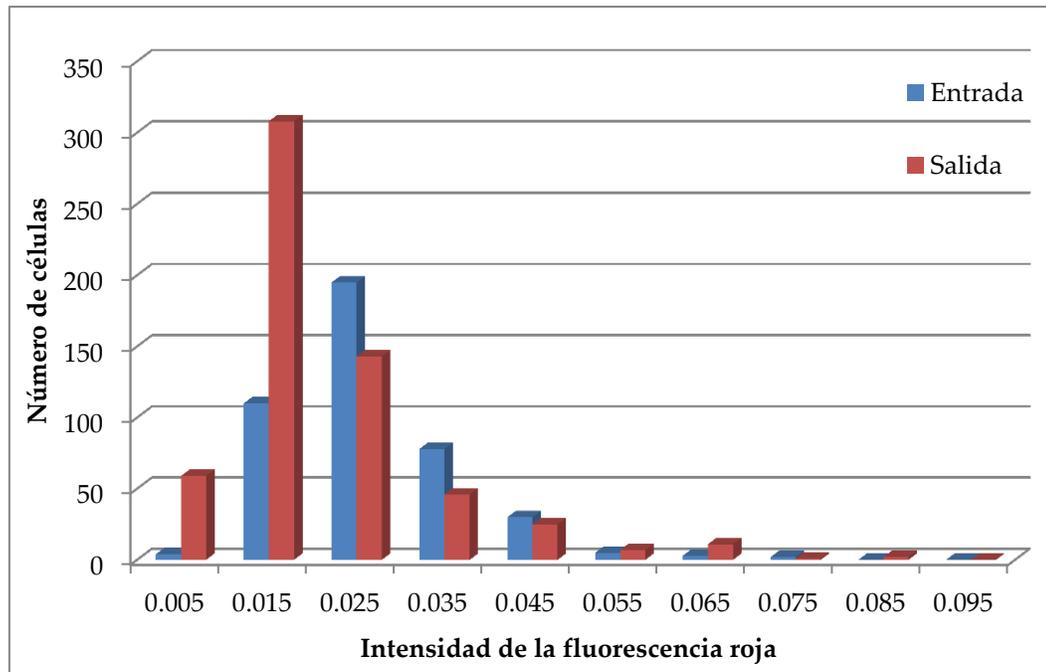
A continuación se muestran las distribuciones de número de células detectadas por gota con el filtro rojo.



Gráfica 4-27 Células detectadas con el filtro rojo.

Al igual que con el filtro verde, con el filtro rojo también se observa el aumento de número de células por gota.

Para el análisis de fluorescencia se excluyó el valor de fluorescencia de la gota. En la Gráfica 4-28 se muestran las distribuciones de la intensidad de fluorescencia de las células en la entrada y la salida del microchip.



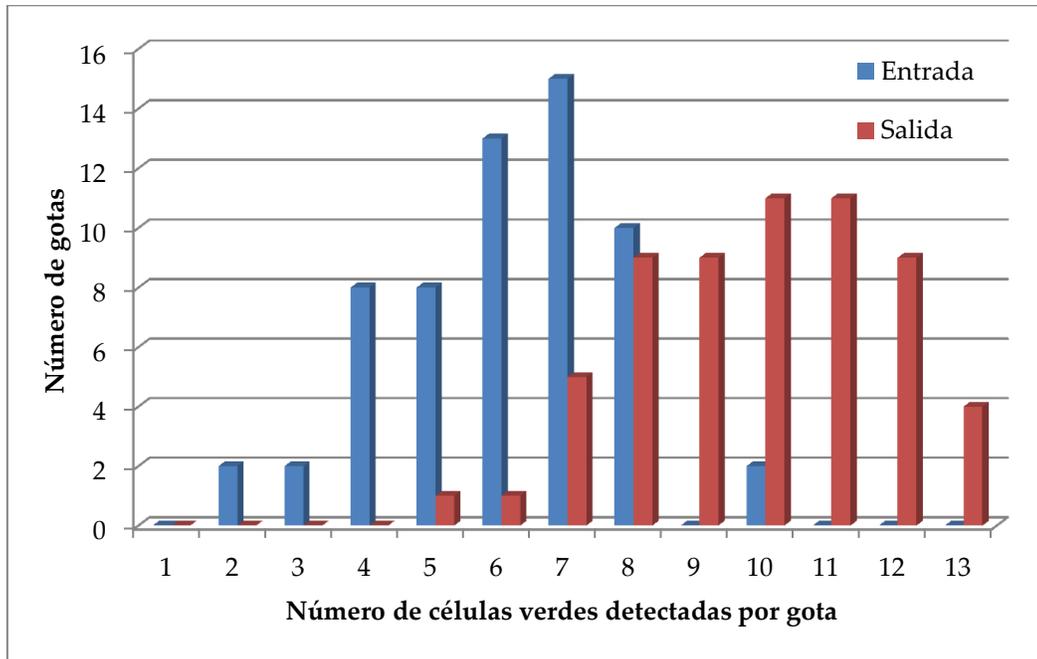
Gráfica 4-28 Fluorescencia de las células rojas a la entrada y salida del microchip sin tomar en cuenta la fluorescencia asociada a las gotas.

La frecuencia de señales con baja intensidad de fluorescencia aumenta, mientras que las señales más intensas se mantienen. El rango de la intensidad fluorescencia roja está acotado entre 0.005 y 0.085, que es aproximadamente una cuarta parte del rango de fluorescencia verde.

4.3.3 EFECTO EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS CON AMPICILINA A LO LARGO DEL MICROCHIP

Con ese mismo arreglo experimental se abrió una entrada más para bombear la ampicilina, en la Figura 3.12 se esquematizan los ajustes de la prueba.

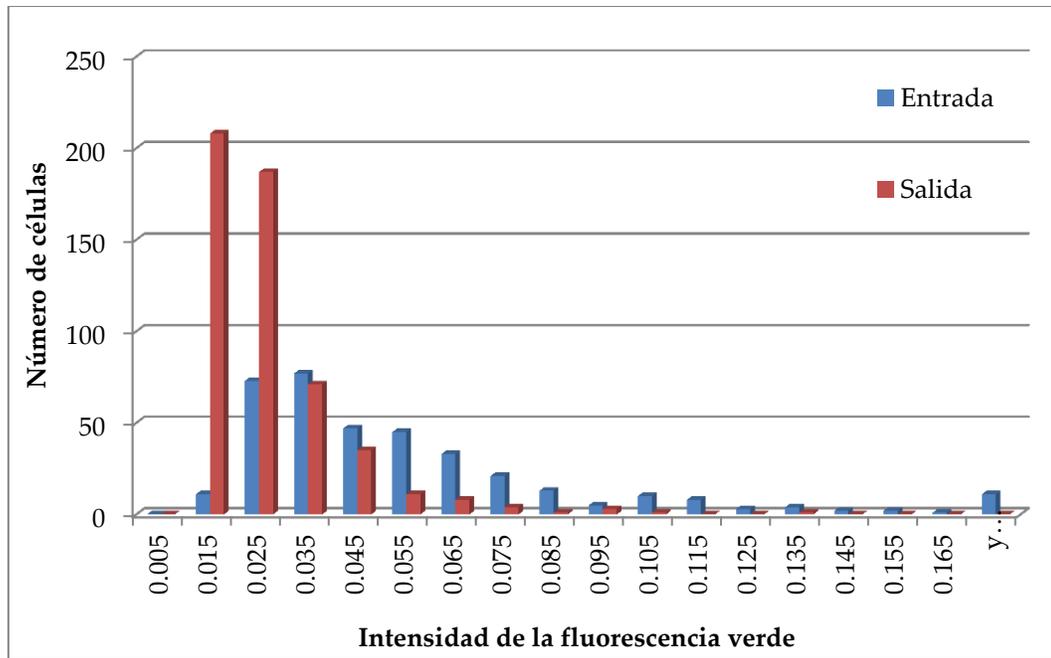
En la Gráfica 4-29 se muestran las distribuciones del número de células verdes detectadas por gota.



Gráfica 4-29 Distribuciones del número de células verdes por cada gota con ampicilina en la entrada y la salida del microchip.

En la Gráfica 4-29 se observa que el número de células por gota disminuye respecto al experimento de la Gráfica 4-24. Esto es debido a la dilución que sufre el cultivo al mezclarse con la ampicilina y entrar en el microchip. También se aprecia que las señales de fluorescencia verde aumentan de manera importante a la salida del microchip.

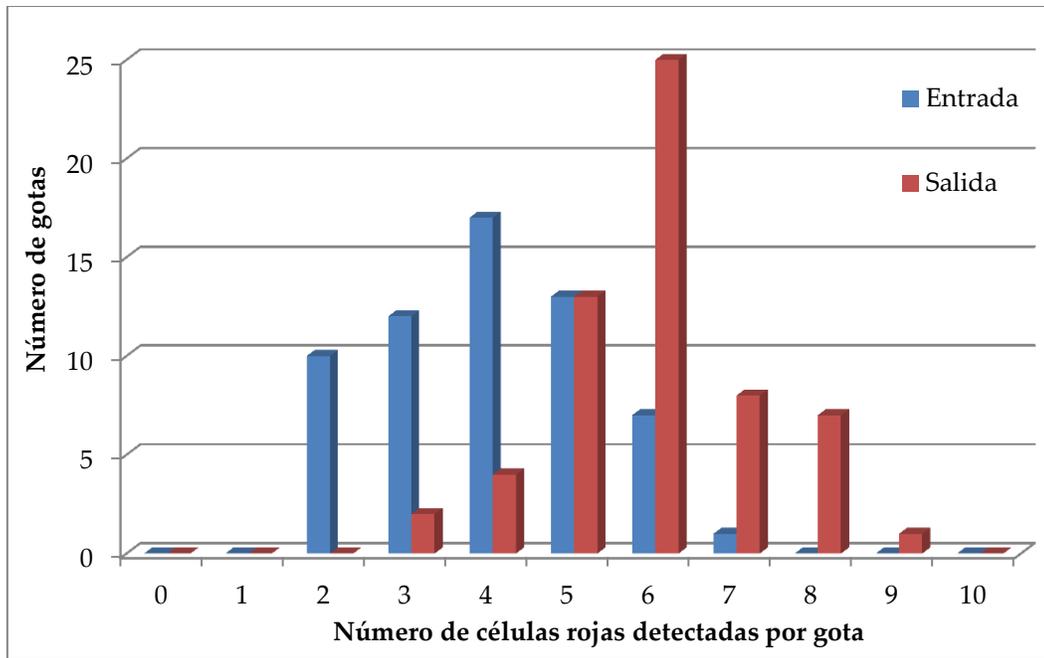
Si comparamos directamente los valores de fluorescencia entre las señales verdes (asociadas sólo a las células) de la entrada y las de la salida obtenemos la siguiente gráfica:



Gráfica 4-30 Comparación entre la intensidad de la fluorescencia verde de las células tratadas con ampicilina en la entrada y salida del microchip sin tomar en cuenta la fluorescencia asociada a las gotas.

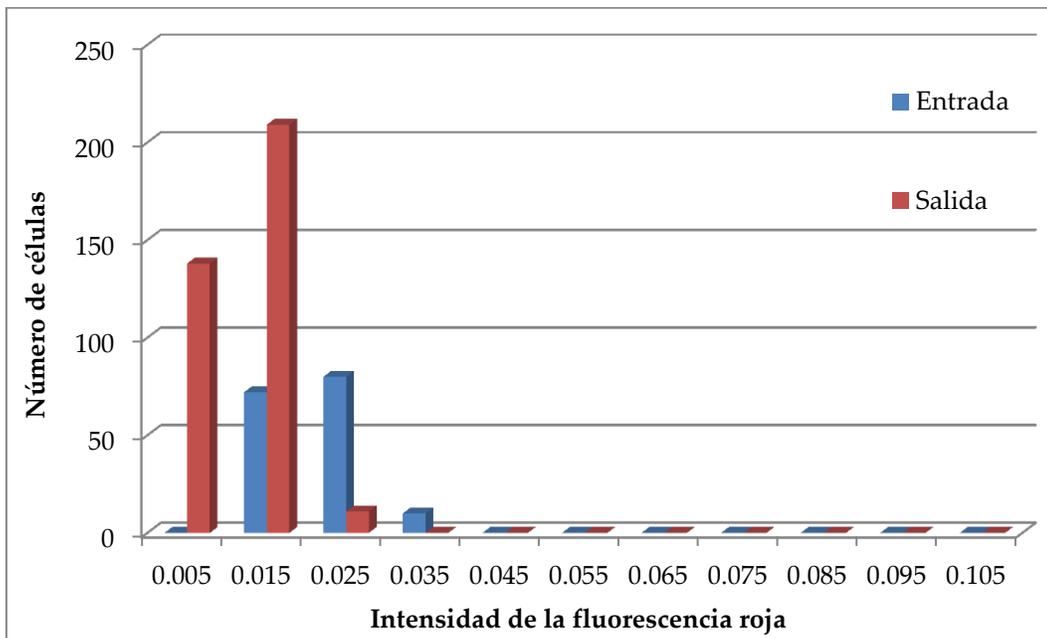
En la Gráfica 4-30 se observa la disminución de la intensidad de la fluorescencia en las células por el efecto de la dilución de la ampicilina con respecto a los resultados presentados en la Gráfica 4-26, principalmente en las señales con intensidad mayor a 0.045, de 158 a 29 señales (casi 82% menos). Al igual que con la Gráfica 4-26, se ignoró la fluorescencia asociada a las gotas.

Al graficar los histogramas de las señales obtenidas usando el filtro rojo, se obtuvo la siguiente distribución.



Gráfica 4-31 Distribuciones del número de células rojas por cada gota con ampicilina en la entrada y la salida del microchip.

En la Gráfica 4-31 se observa el aumento de las señales de fluorescencia roja a la salida del microchip. A continuación se muestran las gráficas de intensidades de señales rojas sin la fluorescencia de las gotas.



Gráfica 4-32 Fluorescencia de las células rojas a la entrada y salida del microchip.

En la Gráfica 4-32, a diferencia de la gráfica de la fluorescencia roja sin ampicilina (Gráfica 4-28), las señales no superan la intensidad de 0.035 e igualmente hay un aumento en la frecuencia de células con intensidades bajas.

En resumen, hay un aumento en el número de señales correspondientes a las células verdes y células rojas al final del microchip respecto del inicio. Este aumento se da principalmente (o casi exclusivamente) en intensidades de fluorescencia bajas. La frecuencia de señales a altos valores de fluorescencia verde no se ve afectada cuando no hay ampicilina presente, en cambio, cuando, en las microgotas, las células viajan en un medio con alta concentración de ampicilina, el número de señales con alta intensidad de fluorescencia verde disminuye. Se observó un efecto similar al utilizar el filtro rojo, sin ampicilina, las señales con baja fluorescencia roja aumentaron, mientras que la frecuencia de las señales con más alta intensidad se mantuvo; con ampicilina, el número de señales con fluorescencia roja intensa disminuyó y las señales con fluorescencia más baja aumentaron.

5 CONCLUSIONES

Se logró diseñar, construir y poner en funcionamiento un dispositivo microfluídico capaz de formar microgotas.

Se desarrolló una nueva metodología detallada para teñir y detectar células bacterianas de *E. coli* en las microgotas formadas dentro del microchip utilizando fluorescencia inducida por láser.

Las microgotas y el sistema de detección posibilitaron la realización de pruebas de viabilidad de las células de *E. coli* celular para distinguir entre células vivas y muertas.

Se identificó la fluorescencia generada por la presencia de células. La fluorescencia verde, causada tanto por células vivas o muertas, se detecta como una señal intensa y angosta.

Se caracterizó la fluorescencia generada por células sometidas a un tratamiento térmico. Con las concentraciones recomendadas por el fabricante, se encontró que estas células no viables emitían fluorescencia roja, además de la verde.

La fluorescencia verde no es un indicador fiable para saber si la célula está viva o no, sólo indica la presencia de células.

La detección de fluorescencia roja indica que hay células con membrana celular comprometida.

La reducción de señales fluorescentes verdes asociada a células cuando estas fueron incubadas con ampicilina es un indicador de que el número total de células presentes en cada gota disminuyó, debido probablemente a lisis celular.

A partir de que la membrana celular se ha comprometido, la lisis de células muertas ocurre de manera rápida, probablemente acelerada por el medio hipotónico y el rápido movimiento de la célula dentro de la gota, lo que provoca la detección de menos señales rojas y verdes asociadas a células.

Bajo las condiciones experimentales utilizadas, no se mantiene la integridad de las células con membrana celular dañada (células rojas), lo que impide realizar su seguimiento.

Por los resultados anteriormente expuestos, se concluye que la hipótesis se confirmó, pero fenómenos como la lisis celular y la detección de fluorescencia verde en las células no viables dificultan la interpretación de los datos, por lo que se hacen las siguientes recomendaciones.

Recomendaciones.

Se recomienda sólo utilizar el SYTO 9 o cualquier otro tinte que identifique las células vivas, ya que la ausencia de señales fluorescentes sería un indicador de que las células han dejado de existir como esferoplastos al ser tratados con antibióticos.

Si se desea utilizar la fluorescencia para determinar la viabilidad de las células y no sólo su presencia, es necesario optimizar las concentraciones de tintes que se le añaden a los cultivos para mejorar el desplazamiento del SYTO 9 por el yoduro de propidio, además de adecuar las condiciones experimentales para evitar el lisamiento de las células.

Construir un microchip con un tiempo de residencia más alto que permita que el antibiótico tenga un efecto más apreciable en las células. Además, sería deseable incluir zonas donde el ancho del canal se reduzca, a fin de que el haz del láser abarque una mayor proporción del canal, mejorando la sensibilidad de la detección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tran, T.M., et al., *From tubes to drops: droplet-based microfluidics for ultrahigh-throughput biology*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2013. **46**(11).
2. Dove, A., *Drug screening - Beyond the bottleneck*. Nature Biotechnology, 1999. **17**(9): p. 859-863.
3. Lagus, T.P. and J.F. Edd, *A review of the theory, methods and recent applications of high-throughput single-cell droplet microfluidics*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2013. **46**(11).
4. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 368-373.
5. Lim, Y.C., A.Z. Kouzani, and W. Duan, *Lab-on-a-chip: a component view*. Microsystem Technologies-Micro-and Nanosystems-Information Storage and Processing Systems, 2010. **16**(12): p. 1995-2015.
6. Squires, T.M. and S.R. Quake, *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*. Reviews of Modern Physics, 2005. **77**(3): p. 977-1026.
7. Solvas, X.C.I. and A. deMello, *Droplet microfluidics: recent developments and future applications*. Chemical Communications, 2011. **47**(7): p. 1936-1942.
8. Whitesides, G.M. and A.D. Stroock, *Flexible methods for microfluidics*. Physics Today, 2001. **54**(6): p. 42-48.
9. Teh, S.Y., et al., *Droplet microfluidics*. Lab on a Chip, 2008. **8**(2): p. 198-220.
10. Baroud, C.N., F. Gallaire, and R. Dangla, *Dynamics of microfluidic droplets*. Lab on a Chip, 2010. **10**(16): p. 2032-2045.
11. deMello, A.J., *Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 394-402.
12. Mogi, K., et al., *Rapid fabrication technique of nano/microfluidic device with high mechanical stability utilizing two-step soft lithography*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2014. **201**: p. 407-412.
13. Qin, D., Y.N. Xia, and G.M. Whitesides, *Soft lithography for micro- and nanoscale patterning*. Nature Protocols, 2010. **5**(3): p. 491-502.

14. Douglas A. Skoog, D.M.W., F. James Holler, *Fundamentos de química analítica*. Vol. 2. 1997, Barcelona, España: Editorial Reverté.
15. Zotta, T., et al., *A comparison of fluorescent stains for the assessment of viability and metabolic activity of lactic acid bacteria*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2012. **28**(3): p. 919-927.
16. Haubert, K., T. Drier, and D. Beebe, *PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system*. *Lab on a Chip*, 2006. **6**(12): p. 1548-1549.
17. Molecular Probes, *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits Product Information* (2004). Recuperado de <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp07007.pdf>.
18. Jepras, R.I., et al., *Development of a Robust Flow Cytometric Assay for Determining Numbers of Viable Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995. **61**(7): p. 2696-2701.
19. Vázquez, B., *Implementación de un sistema láser para detección continua de fluorescencia dentro de micro gotas*. Tesis de Maestría, Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería, UNAM, México, 2012: p. 109.
20. MathWorks. *MATLAB Central File Exchange* (2014). Recuperado de <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange>.
21. O'Haver, T. *A Pragmatic Introduction to Signal Processing with applications in chemical analysis. An illustrated essay with free software to download* (2014). Recuperado de <http://terpconnect.umd.edu/~toh/spectrum/>.
22. Calderón, J.C., *Diseño, construcción y funcionamiento de microchips, aplicados a microfluidos a través de dos métodos de microfabricación*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2012: p. 77.
23. Hirata, K., et al., *Fractal-shaped microchannel design for a kinetic analysis of biochemical reaction in a delay line*. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2012. **13**(2): p. 273-278.
24. Vazquez, B., et al., *Effect of velocity on microdroplet fluorescence quantified by laser-induced fluorescence*. *Lab on a Chip*, 2014. **14**(18): p. 3550-3555.
25. Mazutis, L., et al., *Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics*. *Nature Protocols*, 2013. **8**(5): p. 870-891.

26. Christiansen, T., et al., *Production of savinase and population viability of Bacillus clausii during high-cell-density fed-batch cultivations*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003. **83**(3): p. 344-352.
27. Tipper, D., *Mode of action of β -lactam antibiotics*. *Review of Infectious Diseases*, 1979. **1**(1): p. 39-53.
28. Tuomanen, E., et al., *The Rate of Killing of Escherichia-Coli by Beta-Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial-Growth*. *Journal of General Microbiology*, 1986. **132**: p. 1297-1304.
29. Kusser, W. and E.E. Ishiguro, *Temperature Sensitivity of the Penicillin-Induced Autolysis Mechanism in Nongrowing Cultures of Escherichia-Coli*. *Journal of Bacteriology*, 1987. **169**(5): p. 2310-2312.