



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACOPLAMIENTO DE UN INSTRUMENTO HPLC A UN MICROCHIP DE
MICROFLUÍDICA PARA ENSAYOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO

PRESENTA

JOSÉ EDUARDO CASTILLERO SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: **Profesor: LUIS TONATIHUT SÁNCHEZ LINARES**

VOCAL: **Profesor: EMMA GONZÁLES CHIMEO**

SECRETARIO: **Profesor: LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS**

1er. SUPLENTE: **Profesor: GERARDO OMAR HERNÁNDEZ SEGURA**

2° SUPLENTE: **Profesor: JOSÉ ENRIQUE BARQUERA LOZADA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 309 DE BIOFISICOQUÍMICA, FACULTAD DE QUIMICA,
UNAM**

SUSTENTANTE (S):

JOSE EDUARDO CASTILLERO SÁNCHEZ

ASESOR DEL TEMA:

LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS

ÍNDICE

Índice	4
1 Introducción	8
1.1 Planteamiento del problema.....	9
1.2 Objetivos.....	10
1.3 Hipótesis.....	10
2 Antecedentes.....	11
2.1 Microfluídica.....	12
2.2 Reacciones enzimáticas en microchip de microfluídica por el método de flujo continuo	14
2.3 Reacciones enzimáticas en microchip de microfluídica por el método de microgotas	15
2.4 Enzima β -D-Galactosidasa	16
2.5 Feniletil-D-tiogalactósido (PETG), Inhibidor de la β -D-Galactosidasa.....	17
2.6 Microchips de microfluídica de PDMS por fotolitografía suave	17
2.7 Microscopia de fluorescencia	18
2.7.1 Instrumentación de un microscopio de fluorescencia.....	19
3 Procedimiento experimental	21
3.1 Diseño y fabricación de microchips	22
3.1.1 Diseño de microchips.....	22
3.1.2 Fabricación de micromoldes por medio de fotolitografía suave	23
3.1.3 Fabricación de microchips.....	25
3.1.4 Caracterización de microchips.....	27
3.2 Formación de microgotas en microchips.....	28
3.2.1 Formación de gotas a distintos flujos	28
3.2.2 Formación de microgotas con buffer de fosfatos como fase acuosa.....	29
3.2.3 Formación de microgotas en microchip de fractales con adaptación a instrumento HPLC.....	29

3.2.4	Determinación del tiempo de residencia de microgotas dentro de los microchips	30
3.2.5	Regulación de purga en el microchip con adaptación a instrumento HPLC	32
3.3	Instrumentación fotográfica	32
3.3.1	Uso de Image J para el análisis digital de imágenes	32
3.3.2	Uso de cámara Phantom	33
3.4	Curva patrón de fluoresceína	35
3.4.1	Curva patrón de fluoresceína en microchips con diseño de serpentín	35
3.4.2	Curva de patrón de fluoresceína en microchip diseño de fractales	36
3.4.3	Curva patrón de fluoresceína en microchip con diseño de fractales con adaptación a instrumento HPLC	37
3.4.4	Comportamiento de la fluorescencia a distintos porcentajes de Metanol	37
3.5	Ensayo enzimático de β -D-Galactosidasa con FDG (Fluorescein –Di- β -D-galactopiranosido)	38
3.5.1	Ensayo enzimático de β -D-Galactosidasa + FDG en microchip con diseño de serpentín	38
3.5.2	Ensayo enzimático de β -D-Galactosidasa + FDG en microchip con diseño de fractales	39
3.5.3	Actividad enzimática a distintos porcentajes de Metanol en el espectrofotómetro	40
3.5.4	Ensayo enzimático de β -D-Galatosidasa + FDG en microchip de fractales acoplado al instrumento HPLC.....	41
3.6	Ensayo enzimático de β -D-Galactosidasa con FDG e inhibidor (PETG).....	43
3.6.1	Ensayo enzimáticos con inhibidor (PETG) + β -D-Galactosidasa + FDG en espectrofotómetro	43
3.6.2	Ensayo enzimáticos de β -D-Galactosidasa con inhibidor (PETG) y FDG en microchip de fractales acoplado a instrumento HPLC	44
3.7	Programas de elución en instrumento HPLC	45
3.7.1	Programa de elución para el inhibidor (PETG).....	45
3.7.2	Programa de elución para fluoresceína.....	47

4	Resultados y discusión.....	49
4.1	Fabricación y diseño de microchips.....	50
4.1.1	Fabricación de micromoldes construidos en el laboratorio	51
4.1.2	Medidas de los microcanales optimizados	55
4.2	Formación de microgotas	56
	Formación de microgotas en microchips	56
4.2.1	Formación de microgotas a distintos flujos.....	57
4.2.2	Formación de microgotas con buffer de fosfatos como fase acuosa.....	58
4.2.3	Formación de microgotas en microchip de fractales acoplado al instrumento HPLC	59
4.3	Instrumentación fotográfica.....	62
4.3.1	Configuración de la cámara Phantom.....	62
4.4	curvas patrón de fluoresceína	63
4.4.1	Curva patrón de fluoresceína en microchips con diseño de serpentín	63
4.4.2	Curva de patrón de fluoresceína en microchip diseño de fractales	66
4.4.3	Comportamiento de la fluorescencia a distintos porcentajes de Metanol	69
4.5	Ensayos enzimáticos de β -D-Galactosidasa + FDG (Fluorescein-Di- β -D-galactopiranosido)	71
4.5.1	Ensayo enzimático de β -D-Galactosidasa + FDG en microchip con diseño de serpentín.....	71
4.5.2	Ensayo enzimático de β -D-Galactosidasa + FDG en microchip con diseño de fractales	74
4.5.3	Ensayo enzimático de β -D-Galactosidasa + FDG en microchip de fractales acoplado al instrumento HPLC.....	76
4.5.4	Actividad enzimática a distintos porcentajes de Metanol en espectrofotómetro	78
4.6	Ensayos enzimáticos de β -D-Galactosidasa + FDG + con inhibidor (PETG)	81
4.6.1	Ensayo enzimático de β -D-Galactosidasa con inhibidor (PETG) y FDG en espectrofotómetro	81

4.6.2	Ensayo enzimáticos de β -D-Galactosidasa con inhibidor (PETG) y FDG en microchip de fractales acoplado a instrumento HPLC	83
5	Conclusiones	91
6	Apéndices.....	93
6.1	Apéndice A	94
6.1.1	Buffer de fosfatos 100mM, pH 7.5, 1 mM MgCl ₂ con Albúmina de suero bovina ABS (BSA por sus siglas en ingles).....	94
6.1.2	Buffer de fosfatos 100mM, pH 7.5, 1 mM Cloruro de Magnesio (II) con DTT. 95	
6.2	Apéndice B	96
6.2.1	Cantidad de surfactante en la fase orgánica	96
6.3	Apéndice C	98
6.3.1	Formación de microgotas a distintos porcentajes de Metanol	98
6.4	Apéndice D	100
6.4.1	Uso de aceites fluorados como fase orgánica y recubrimiento de microcanales con el polímero Aquapel	100
6.5	Apéndice E	102
6.5.1	Determinación del tiempo de retardo entre el microchip y el instrumento HPLC 102	
6.6	Apéndice F.....	103
6.6.1	Uso de cámara digital HD	103
6.7	Apéndice G	104
6.7.1	Curva patrón de absorbancia de la fluoresceína en espectrofotómetro....	104
6.8	Apéndice H	106
6.8.1	Pérdida de fluorescencia por efectos de extracción de los compuestos a la fase orgánica	106
7	Referencias	112

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A finales del año 2014 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó que al menos 40% de sus países miembros han reportado casos de bacterias comunes (*E.Coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*) con un incremento del 50 % o más de resistencia a los antibióticos comerciales comunes y a los de última generación, representando esta situación un riesgo para la salud de la población mundial [1].

Estos seres patógenos hacen uso de enzimas para desarrollarse dentro del organismo huésped, y por lo tanto es importante descubrir pronto nuevos inhibidores específicos para estas reacciones enzimáticas que combatan efectivamente a estas bacterias. Sin embargo, el descubrimiento de nuevos inhibidores enzimáticos implica un gran gasto temporal, económico y genera contaminación, pues la cantidad de ensayos que se tienen que hacer para encontrar los inhibidores y sus concentraciones efectivas son muy numerosos.

A partir de los años 70s en las prácticas de investigación se ha optado por el uso de volúmenes muy pequeños que van desde los mililitros (10^{-3} L) hasta los microlitros (10^{-6} L), esto implica un gran ahorro tanto en tiempo, dinero y generación de residuos contaminantes que son necesarios para la investigación. A pesar de estos avances, es deseable disminuir aún más los volúmenes por los beneficios para la investigación y el cuidado del medio ambiente [2].

Una forma de lograr este objetivo es mediante la miniaturización, la cual consiste en reproducir un instrumento de análisis o de separación de decenas de centímetros a escalas pequeñas de decenas de milímetros, logrando así un ahorro de reactivos usados para análisis. Se busca con la miniaturización que dispositivos convencionales de análisis como cromatógrafos de gases, instrumentos HPLC e incluso laboratorios completos se puedan hacer a escalas pequeñas con la misma utilidad. Los esfuerzos de todas las áreas investigación como la química, física, biología e ingeniería se están enfocando en el desarrollo de estos dispositivos [3].

Desde que se inventó el instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés), se ha vuelto una herramienta indispensable en el área de química analítica por su versatilidad para separar e identificar compuestos químicos. Sin embargo, los compuestos purificados por la columna cromatográfica no podían direccionarse automáticamente a sistemas que probaran alguna propiedad química en particular (como inhibición, formación de complejos, reactividad, etc.) a costos de tiempo, reactivos y desechos muy bajos.

En el presente trabajo se desarrolló un microchip de microfluídica que sirve para realizar reacciones enzimáticas con uso de volúmenes de reactivos de 0.5 mL y está acoplado a un instrumento HPLC a través del cual se pueden separar compuestos los cuales se pueden ir presentando a la reacción enzimática para saber si tienen o no propiedades inhibitorias.

1.2 OBJETIVOS

- *Diseñar un microchip de microfluídica para formar microgotas.
- *Realizar una reacción enzimática en microgotas dentro de un microchip de microfluídica y posteriormente en la presencia de un inhibidor.
- *Acoplar un instrumento HPLC a un microchip de microfluídica para realizar una reacción enzimática en microgotas e inhibirla con un compuesto separado en el HPLC.
- *Detectar cualitativamente la inhibición de una reacción enzimática dentro de un microchip de microfluídica acoplado a un instrumento HPLC.

1.3 HIPÓTESIS

Si es posible adaptar un instrumento de HPLC a un microchip de microfluídica para aprovechar su alta capacidad de separación con una columna cromatográfica, entonces será posible establecer una metodología para futuros experimentos de separación de extractos naturales en donde se puedan ir probando de manera individual las propiedades inhibitorias de cada componente de la mezcla utilizando un mínimo de reactivos.

2 ANTECEDENTES

2.1 MICROFLUÍDICA

La microfluídica es la ciencia que se encarga del estudio de fluidos contenidos en microcanales que van desde una hasta 500 micras de dimensión y con volúmenes de los 10^{-6} hasta los 10^{-15} L [4].

El desarrollo de la microfluídica en años recientes ha ido creciendo de forma paralela con el desarrollo de los llamados laboratorios en un microchip (lab-on-a-chip), que son dispositivos que tienen la función integrada de analizar, mezclar reactivos y separar productos en un mismo y pequeño dispositivo. Las ventajas que presentan los sistemas operados por microfluídica son: reducción de la cantidad de reactivos utilizados, reducción de costos en reactivos, mayor velocidad de las reacciones dentro de ellos y reducción en la emisión de contaminantes[5]. Por estas razones, la microfluídica es utilizada para ensayos biológicos y químicos miniaturizados.

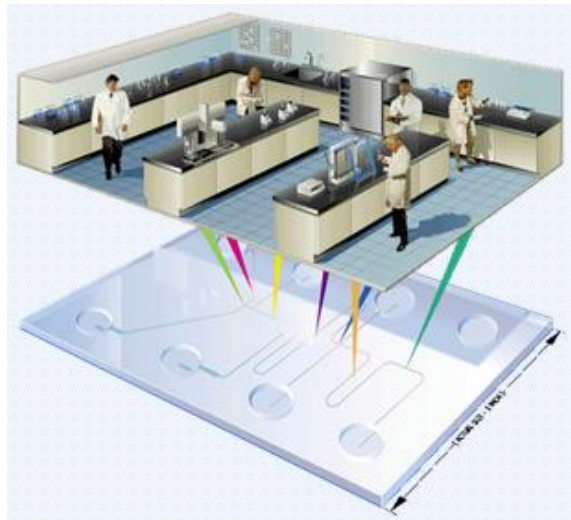


Figura 1. Representación de un Lab-on-a-chip. En la imagen se ve de qué manera estos microchips sustituirán a muchos procesos de análisis como muestro, reacción, identificación, purificación y análisis hechos hoy en día. Tomada de [6].

Un efecto tangible de las reacciones en miniaturización es que las propiedades de los líquidos a estas escalas son regidas por fuerzas diferentes a la que rigen las escalas macroscópicas. Una muestra de ello es que las fuerzas viscosas predominan sobre las fuerzas inerciales en el comportamiento de los flujos en sistemas en miniaturización.

Este tipo de interacciones se predicen por medio del Número de Reynolds de un fluido, parámetro que indica el comportamiento del flujo de un líquido dentro de canales. Para sistemas microfluídicos el Número de Reynolds (Re) es típicamente menor a 2000, esta es una situación en la que el líquido es considerado esencialmente laminar, y contrasta con los fluidos en canales a macroescala ($Re > 40000$) en donde el flujo es siempre turbulento. [7]

La ecuación de El número de Reynolds es:

$$Re = \frac{D * v * \rho}{\mu}$$

Re = Número de Reynolds.

D = Diámetro del ducto.

v = Velocidad promedio del líquido.

ρ = Densidad del líquido.

μ = Viscosidad del líquido.

$Re \leq 2000$ Flujo laminar

$Re \geq 40000$ Flujo turbulento



Figura 2. Diferencia de orden entre el flujo laminar y el flujo turbulento. Tomado de [8]

2.2 REACCIONES ENZIMÁTICAS EN MICROCHIP DE MICROFLUÍDICA POR EL MÉTODO DE FLUJO CONTINUO

Los microchips de microfluídica se han desarrollado para un número importante de análisis, incluidos análisis de ADN, análisis de proteínas e inmunoensayos. También se han llevado a cabo reacciones enzimáticas en microchips de microfluídica con el método de flujo continuo, en el cual una solución con la enzima se intersecta con una solución con el sustrato (Figura 3). Un ejemplo es la reacción entre la β -D-Galactosidasa con el sustrato Resorufin- β -D-galactopiranosido, para obtener como producto la D-galactosa y el Resorufin, que al ser un producto fluorescente, permite monitorear su concentración basándose en la intensidad de fluorescencia [9].

Los ensayos enzimáticos en microchips de microfluídica por medio del método de flujo continuo presentan dos grandes problemas: el primer problema es el lento mezclado en los microchips debido al flujo laminar y segundo, es la dispersión que se da por el flujo continuo.

El método de flujo continuo presenta el fenómeno llamado dispersión de Taylor, el cual ocurre con cualquier sustancia disuelta en un líquido que fluye a través de un canal. Debido a que el perfil de velocidad es distinto en todas las posiciones de la sección transversal del flujo; el flujo es más veloz en el centro del flujo que en las orillas, el perfil de dispersión de la sustancia disuelta toma la forma de una parábola como se muestra en la Figura 3 [10].

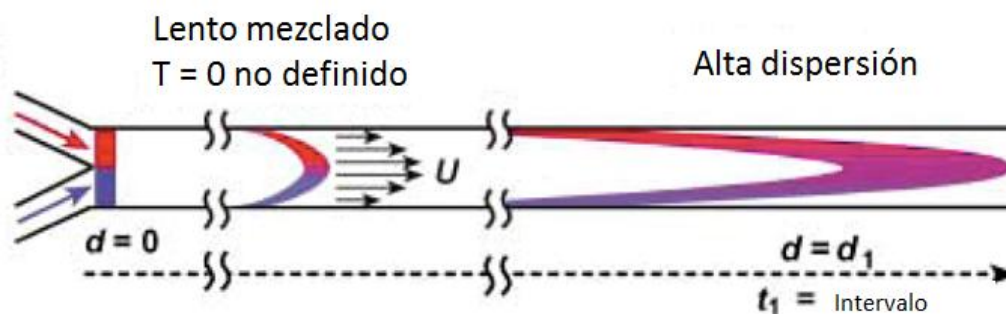


Figura 3. Dispersión de Taylor a lo largo del microcanal. En un inicio la concentración de los reactivos es igual en el perfil transversal del microcanal, después de pasado un tiempo, la concentración de los reactivos es distinta a lo largo del perfil. Imagen modificada de [11].

2.3 REACCIONES ENZIMÁTICAS EN MICROCHIP DE MICROFLUÍDICA POR EL MÉTODO DE MICROGOTAS

Un mejor método para realizar ensayos enzimáticos en microchips de microfluídica, es mediante el uso de microgotas. Las microgotas son fracciones de fase acuosa viajando dentro de una fase orgánica móvil. El volumen es variable y puede ir desde los nanos hasta los femto litros. Los reactivos dentro de las microgotas se mezclan rápidamente por medio del fenómeno de “Transformación o proceso de panadero (Baker’s transformation)” (Figura 4).

Las principales ventajas de los usos de microgotas para ensayos enzimáticos en microchips de microfluídica son [7]:

- 1) Proporcionan un compartimento en el que las especies o las reacciones pueden ser aisladas.
- 2) Son compartimentos monodispersos y por lo tanto potencialmente adecuados para llevar a cabo estudios cuantitativos.
- 3) Ofrecen la posibilidad de trabajar con volúmenes extremadamente pequeño así como células o moléculas individuales.
- 4) Ofrecen la posibilidad de llevar a cabo un gran número de experimentos, como en el caso de los llamados Lab-on-a-chip.

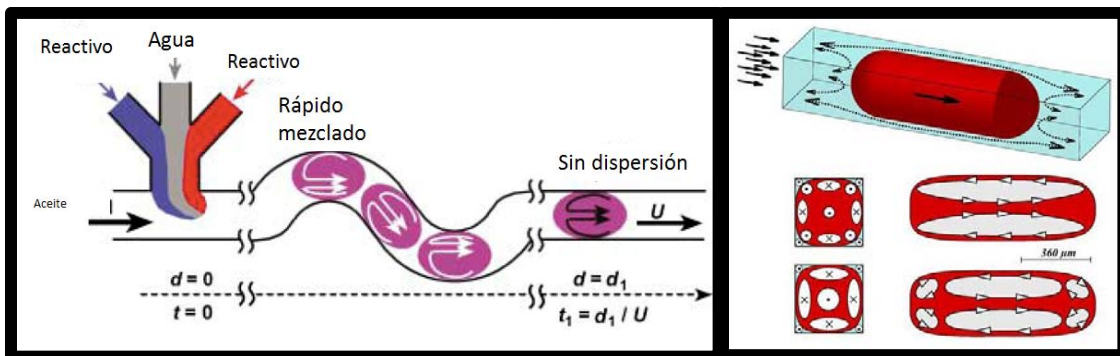


Figura 4. Izquierda Proceso de mezclado dentro de las microgotas (Baker’s transformation). Debido a las corrientes de flujo internas se puede dar un buen mezclado en las microgotas. Imagen modificada de [11]. **Derecha** Esquema que muestra las corrientes de flujo internas de las microgotas. Imagen tomada de [12].

2.4 ENZIMA β -D-GALACTOSIDASA

La enzima β -D-Galactosidasa (comúnmente llamada lactasa) es una de las más importantes enzimas usadas en la industria de los alimentos que cataliza la hidrólisis de lactosa en sus monosacáridos correspondientes, glucosa y galactosa. Esta enzima ha sido aislada de un gran número de microorganismos, pero comúnmente se usa la β -D-Galactosidasa derivada de levaduras y bacterias como la *E.Coli*[13].

La reacción enzimática llevada a cabo en este proyecto es la hidrólisis de sustrato análogo Fluoresceín-Di- β -D-galactopiranosido (FDG), que da como producto dos moléculas de galactosa y una molécula de fluoresceína. La reacción ocurre en dos pasos, el primer paso consiste en la hidrólisis del FDG a Fluoresceín-mono-D- β -galactopiranosido (FMG) más una molécula de galactosa; y el segundo paso de la reacción consiste en la hidrólisis del FMG a una molécula de fluoresceína más una segunda molécula de galactosa. La reacción se muestra en la Figura 5.

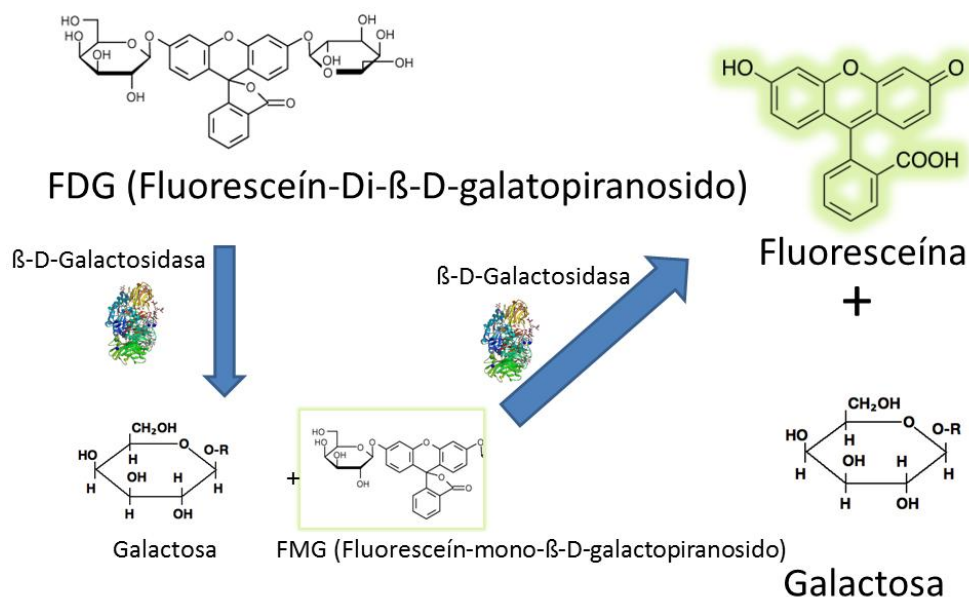


Figura 5. Esquema de la hidrólisis del FDG hasta una molécula de fluoresceína más dos moléculas de galactosa.

2.5 FENILETIL-D-TIOGALACTÓSIDO (PETG), INHIBIDOR DE LA β -D-GALACTOSIDASA

El feniletil-D-tiogalactósido es un inhibidor sintetizado artificialmente específico de la enzima β -D-Galactosidasa. Esta inhibición es de tipo competitivo, es decir, compite con el sustrato por el sitio activo en la enzima, impidiendo que la reacción se complete hasta los productos [14].

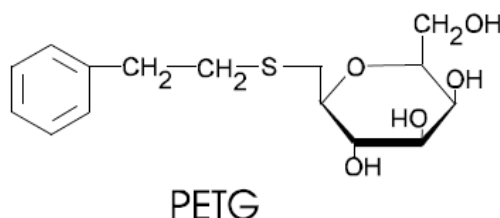


Figura 6. Estructura química del inhibidor de la β -D-Galactosidasa, el feniletil-D-tiogalactósido (PETG). El grupo tiol presente en la estructura del PETG no puede ser hidrolizado por la enzima β -D-Gal.

2.6 MICROCHIPS DE MICROFLUÍDICA DE PDMS POR FOTOLITOGRAFÍA SUAVE

El progreso acelerado de la microfluídica se ha visto favorecido gracias al desarrollo de la fotolitografía suave para fabricar microchip con el polímero polidimetilsiloxano (PDMS). Esta técnica provee buena resolución de los microcanales, así como gran precisión en los diseños. Además los microchips de PDMS ofrecen características que los hacen muy útiles para ensayos biológicos y químicos, pues es hidrofóbico, ópticamente transparente y químicamente inerte.

La obtención de los microchips de PDMS comienza con la elaboración de un micromolde, el cual se fabrica con un proceso de rotación de una oblea de silicio con la resina fotosensible (SU-8) por encima de este mismo, esto con el fin de homogenizar el espesor de la resina.

La oblea de silicio con la resina se cuece para evaporar el exceso de disolvente, y después es irradiada con luz UV colimada con una máscara del diseño elegido. Una vez que se ha irradiado la resina, se sumergue en un disolvente revelador con lo cual se elimina el exceso de resina no polimerizada, haciendo posible que solamente los relieves, que posteriormente serán los microcanales queden en la

oblea de silicio. El último paso en la elaboración de los microchips es agregar el polímero PDMS sobre los relieves de la resina polimerizada en una oblea de silicio.



Figura 7. A la izquierda de la imagen está el micromolde con los relieves que se vuelven los microcanales en el microchip de PDMS a la derecha.

2.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es la propiedad de algunas moléculas denominadas fluoróforos o fluórocromos de emitir luz visible cuando sobre ellos incide una radiación intensa. Es un fenómeno de luminiscencia de vida corta, emitida simultáneamente con la excitación.

La microscopia de fluorescencia es similar al instrumento de microscopia común, con la diferencia de que la muestra se ilumina con una luz de longitud onda específica de excitación, causando que la muestra emita fluorescencia en forma de luz a una longitud de onda de mayor longitud a la recibida. Por este fenómeno, la microscopia de fluorescencia permite alcanzar altos niveles de sensibilidad y resolución microscópica [15].

La alta sensibilidad de la técnica se debe a que aunque la molécula sea muy pequeña, puede ser observada por la luz que emite.

2.7.1 INSTRUMENTACIÓN DE UN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Los componentes básicos de un microscopio de fluorescencia son:

Fuente de luz: La luz que se utiliza debe de ser de una fuente muy intensa. Se emplean comunmente lámparas de mercurio a alta presión, también se utiliza luz ultravioleta y rayos laser.

Filtros: Son los dispositivos que permiten el paso de luz de una determinada longitud de onda, en el intervalo y color necesario para excitar al fluórocromo y bloquean las longitudes no deseadas. Una vez filtrada, la luz incide sobre el espécimen por reflexión de un espejo dicroico y la luz emitida es nuevamente filtrada para poder ser observada (Figura 8).

Objetivos: Deben tener gran capacidad para transmitir la luz y proveer una imagen de alta calidad. De igual manera deben poseer una gran apertura numérica.

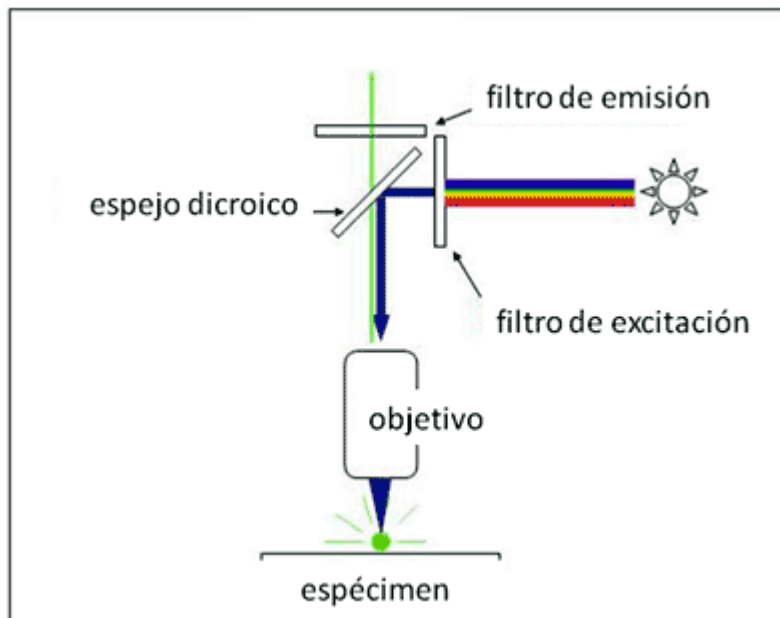


Figura 8. Esquema básico de la iluminación en el microscopio de fluorescencia. La luz blanca emitida por la fuente de luz es filtrada por el filtro de excitación dejando pasar luz de sólo cierta longitud de onda. El espejo dicroico refleja la luz de ciertas longitudes de onda pero deja pasar otras. El filtro de emisión separa la fluorescencia emanada desde la muestra de otra luz de fondo. Imagen modificada de [16].

En este proyecto se empleó la fluoresceína (figura 9) en la espectroscopia de fluorescencia, la muestra se iluminó con una luz azul monocromática pura y filtrada. Para visualizarla se empleó otro filtro, el cual es completamente opaco a la luz azul pero dejaba pasar la luz verde.

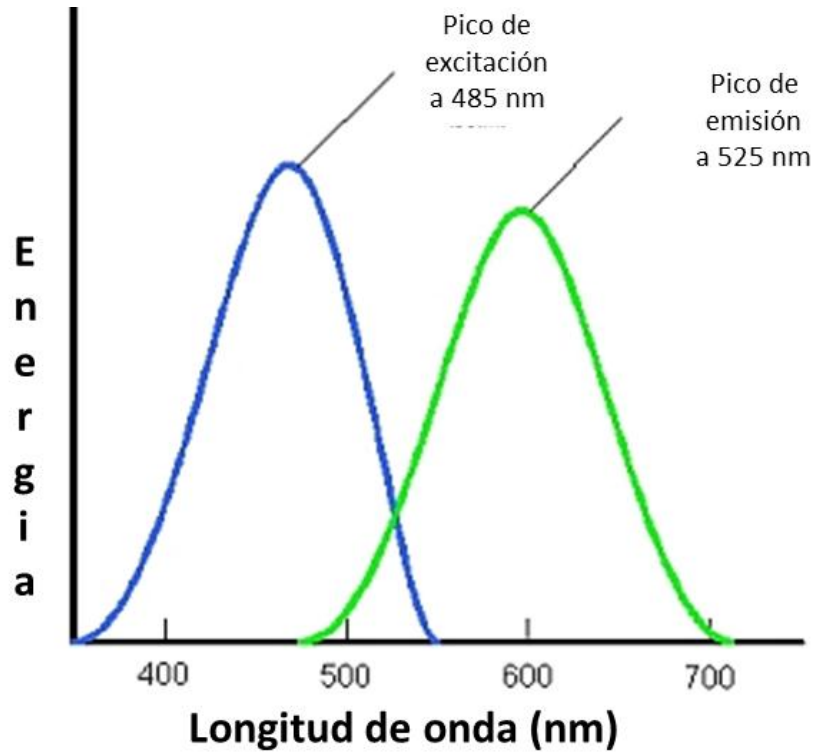


Figura 9. Espectro de excitación y de emisión de la fluoresceína. La fluoresceína cuando es irradiada con luz de longitud de onda a 485 nm (azul), emite luz con longitud de onda a 525 nm (verde). Imagen modificada de [15].

3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 DISEÑO Y FABRICACIÓN DE MICROCHIPS

3.1.1 DISEÑO DE MICROCHIPS

La fabricación de los microcanales se comenzó con el diseño del patrón de éstos en computadora con el software Adobe Illustrator CS6, el cual permite diseñar canales desde unas cuantas hasta cientos de micras de ancho y longitud.

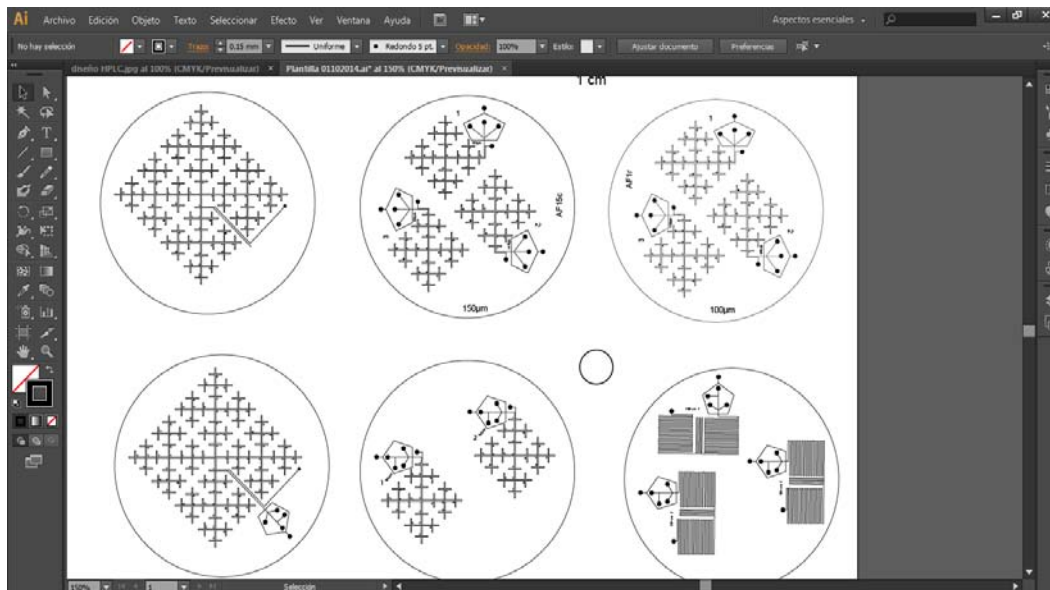


Figura 10. Diseño de patrón de micromoldes para fotolitografía suave en el software Adobe Illustrator CS6.

En este proyecto se diseñaron y utilizaron tres microchips de microfluídica para la formación de microgotas y estudios de inhibición enzimática, esto se basó en el trabajo previo de nuestro laboratorio de microfluídica[17].

Los tres diseños elegidos para este proyecto se muestran en la Figura 11:

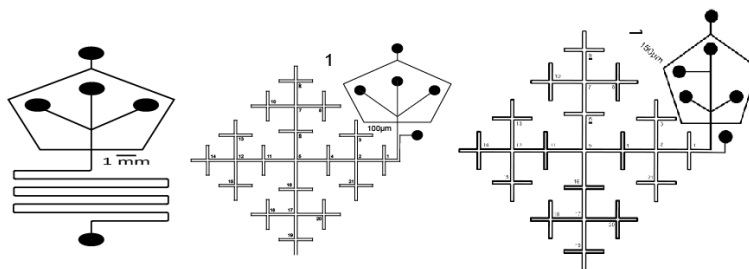


Figura 11. Diseños de microchips utilizados en este proyecto: de izquierda a derecha diseño de serpentina, diseño de fractales y diseño de fractales con adaptación a instrumento HPLC.

3.1.2 FABRICACIÓN DE MICROMOLDES POR MEDIO DE FOTOLITOGRAFÍA SUAVE

La fabricación de micromoldes para las réplicas de microchips de microfluídica se hizo por medio de la técnica de fotolitografía suave. El proceso se llevó a cabo en el cuarto limpio del laboratorio 312 perteneciente al Edificio F de la Facultad de Química, UNAM.

La fabricación de micromoldes se esquematiza en la siguiente Figura 12:

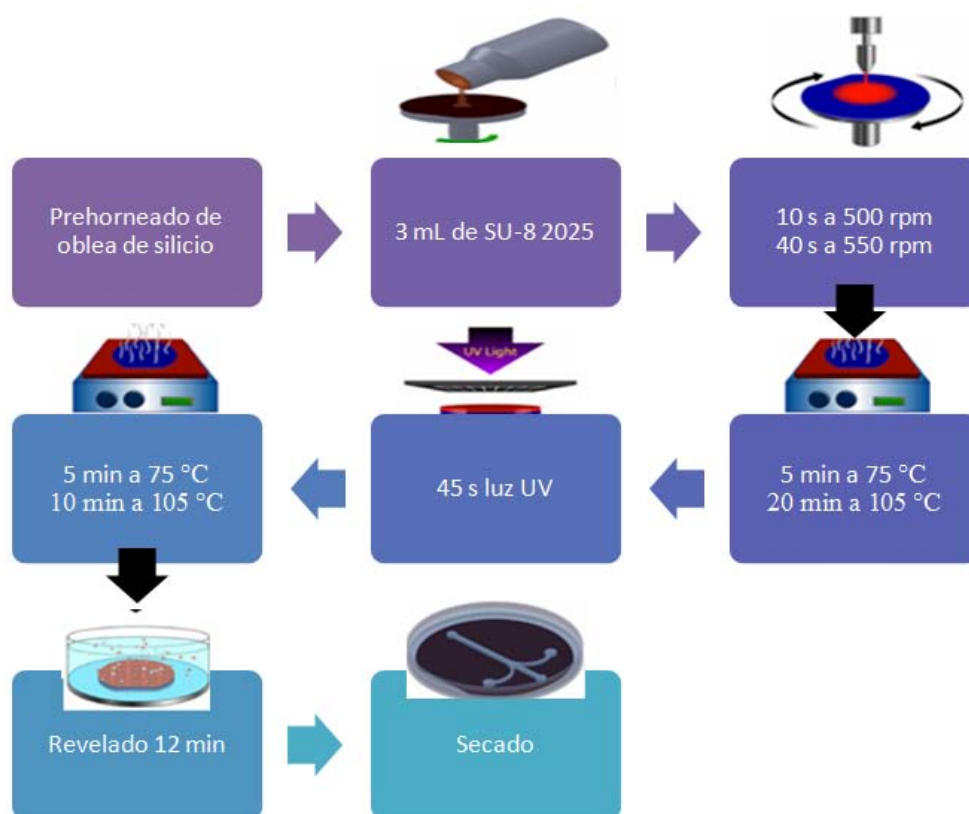


Figura 12 Proceso de fabricación de micromoldes. Imagen modificada de [18]

La elaboración de los micromoldes hechos por fotolitografía suave con resina SU-8 2025 se describe a continuación:

1.- Se retiró del empaque la oblea de silicio (7.5 cm diámetro) y se colocó en una parrilla a 210 °C por 5 minutos para remover toda humedad remanente, después se horneó por 10 minutos a 70 °C para disminuir su temperatura. Pasado este periodo de tiempo la oblea de silicio se retiró del horno y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente antes de ponerla en el Spin-coater .

2.- La oblea se centró cuidadosamente en el Spin-coater y se vertieron aproximadamente 3 mL de resina SU-8 2025 (Microchem Inc.) sobre ella.

3.- Se comenzó el programa de rotación, primero 10 segundos a 500 rpm con una aceleración de 100 rpm/s para homogenizar la distribución de la resina en la oblea y después 40 segundos a 550 rpm con una aceleración de 300 rpm/s para establecer la altura de los microcanales deseada (100 μm).

4.- Una vez depositada la resina, se pasó la oblea con la resina a un proceso de calentamiento en parrilla con el fin de ir evaporando el disolvente presente en la resina. El proceso de calentamiento (Softbake) consta de 5 minutos a 75 °C y posteriormente 20 minutos a 105 °C.

5.- Una vez que la oblea alcanzó la temperatura ambiente, se colocó sobre ella la máscara con el diseño deseado y un vidrio de 4 mm de espesor. La máscara con la oblea se colocó bajo la radiación de rayos UV de la lámpara (Black Ray B-100AP, UVP). Este proceso se optimizó en el laboratorio variando distancia (de 30 a 50 cm) y tiempo de exposición (de 25 a 45 s). Se encontró que las mejores condiciones de irradiación fueron 45 s a 30 cm de distancia para permitir la óptima polimerización de la resina.

6.-Después de la radiación de rayos UV, se retiró la máscara de la oblea y se procedió a hacer un segundo proceso de calentamiento (Post exposure bake). Primero se calentó la oblea durante 5 minutos a 75 °C y posteriormente a 105 °C por 10 minutos.

7.- Una vez que la oblea alcanzó la temperatura ambiente, se sumergió en 15 mL de disolvente revelador (Microchem, E.U.) por 10 minutos, esto con el fin de retirar el exceso de resina que no polimerizó en el proceso de irradiación. Pasados los 10 minutos, se le dio un enjuague final con 1-propanol para asegurar que no hubiera exceso de resina no polimerizada, y se secó la oblea en el horno a 70 °C por algunos minutos. Por último, se puso el micromolde en una caja Petri de 9 cm de diámetro y se agregaron 23 g de PDMS 10:0.85 (ver más adelante) recién preparado.

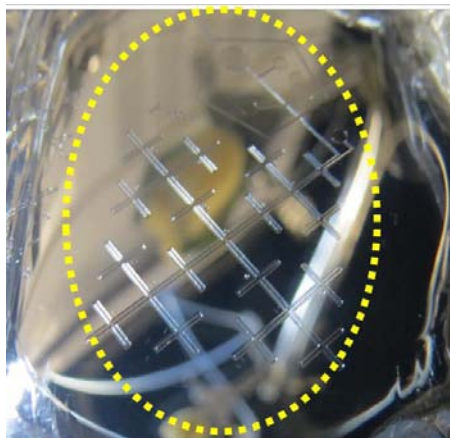


Figura 13. Relieve grabado en micromolde después del proceso de fotolitografía suave.

3.1.3 FABRICACIÓN DE MICROCHIPS

3.1.3.1 Fabricación de microchips

Una vez que se tuvo hecho el micromolde con el diseño deseado, se pueden hacer réplicas de microchips en PDMS. El proceso de fabricación de microchips se describe a continuación.

1.-Primero se limpió de polvo y partículas los micromoldes, los vasos y el área de trabajo con aire comprimido.

2.-Se mezcló el monómero de PDMS (SYLGARD 184 Silicone elastomer base, Dow corning) con agente curante (SYLGARD 184 Silicone elastomer curing agent, Dow corning) en proporción en peso 10:0.85, se mezcló vigorosamente la mezcla por 1 minuto y se vació en el micromolde.

3.- El micromolde con el PDMS se introdujo a una cámara de vacío por 25 minutos para eliminar todas las burbujas formadas durante el mezclado.

4.-Una vez que el PDMS no tuvo burbujas, se introdujo en un horno a 70 °C por al menos 3 horas para acelerar el polimerizado.

5.- Una vez que el PDMS ha polimerizado y tiene una consistencia flexible y firme, se corta el diseño del microchip con un bisturí y se retira del micromolde. El microchip de PDMS es perforado en las entradas destinadas a la entrada de líquidos con un horador de 0.75 mm de diámetro para entradas de fase acuosa y orgánica, y perforación de 1.5 mm de diámetro en la entrada para el HPLC.

3.1.3.2 Pegado de microchips a portaobjetos

Algunas consideraciones previas al pegado de los microchips son:

-Se debe de hacer en un cuarto limpio.

-Los portaobjetos tienen que estar perfectamente lavados con detergente, después enjuagados con agua destilada y por último secados en un horno a 70 °C.

Los microchips perforados son pegados a portaobjetos para microscopio (25x75 mm, Magesa) por medio de una descarga de plasma con el equipo Laboratory Corona Treater (BD-20AC, Electro-Technic Products).

1.-Primero se incidió la descarga de plasma uniformemente en el microchip de PDMS por 15 segundos, posteriormente se procedió a inducir de la misma manera la descarga de plasma sobre el portaobjetos por un minuto, de acuerdo a los datos reportados por Kathryn Haubert, Tracy Drierb y David Beebe[19].

2.-Una vez que ambas superficies han sido activadas por la descarga de plasma, se procedió a juntarlas y presionarlas un poco con las yemas de los dedos, esto con el fin de evitar burbujas. Una vez hecho el pegado, se introdujeron en un horno a 70 °C por al menos 3 horas antes de su uso.

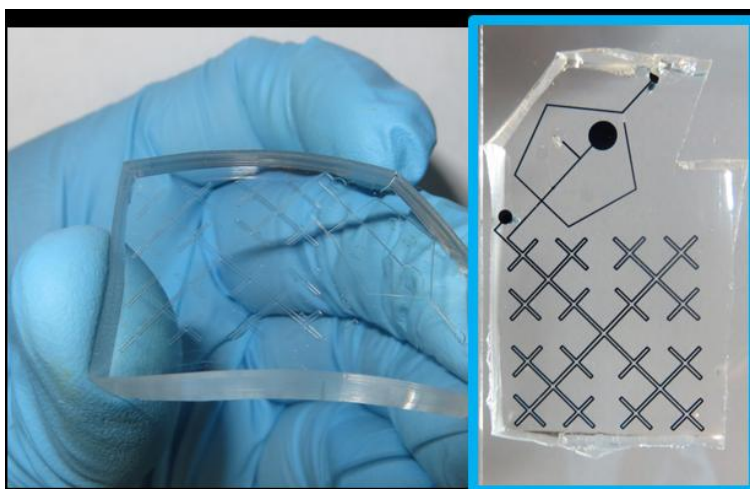


Figura 14. *Izquierda* réplica de microchip en PDMS, se puede ver la consistencia flexible del PDMS. *Derecha* microchip pegado ya a portaobjetos.

3.1.4 CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS

Una parte importante del proceso de fabricación de microchips incluye la caracterización de los microchips con el fin de reiterar que no presentan defectos de fabricación, así como conocer las medidas de altura y ancho de los microcanales a las cuales fueron diseñados. Todos estos factores de defectos, altura y ancho dependen de las condiciones en el proceso de fabricación.

3.1.4.1 Detección de defectos en el microchip

La detección de defectos de un microchip se lleva a cabo mediante la observación directa de éste bajo el microscopio. Del escaneo con el microscopio se pueden descartar defectos en la fabricación del micromolde.

3.1.4.2 Medida de altura y ancho de los microcanales

Para caracterizar las medidas de los microcanales, se procede a hacer un corte diagonal en el microchip (Figura 15) antes de ser pegado al portaobjetos, el corte garantiza evaluar la altura y ancho promedio de la gran mayoría de los microcanales.

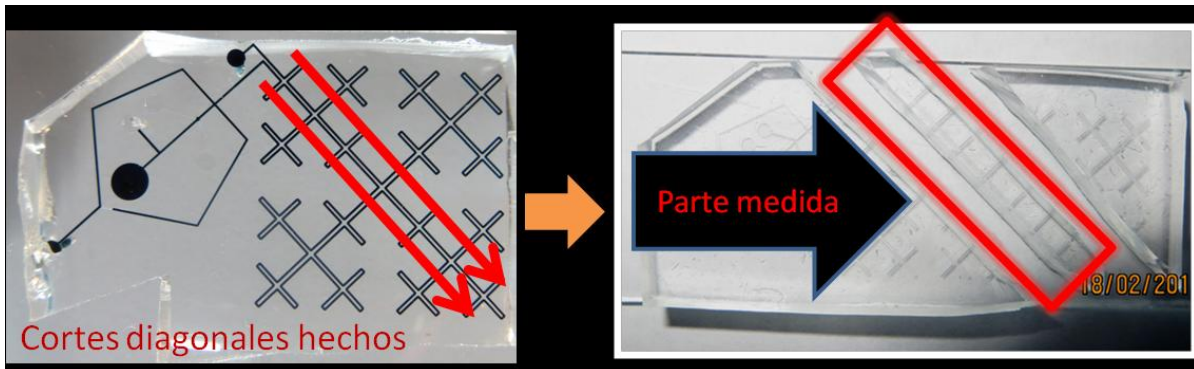


Figura 15. Izquierda Corte hecho en el microchip, el corte diagonal permite medir 7 entrecruzamientos a la vez. **Derecha** Encerrado en rojo, segmento del microchip medido en el microscopio.

El cálculo de las alturas y los anchos de los microcanales se hace mediante la relación entre la foto de una retícula microscópica (S2 Stage Mic 5mm/ 0.05 mm div, Pyser-SGI LTD) y una imagen de los microcanales del microchip tomada con la cámara Phantom. Figura 16.

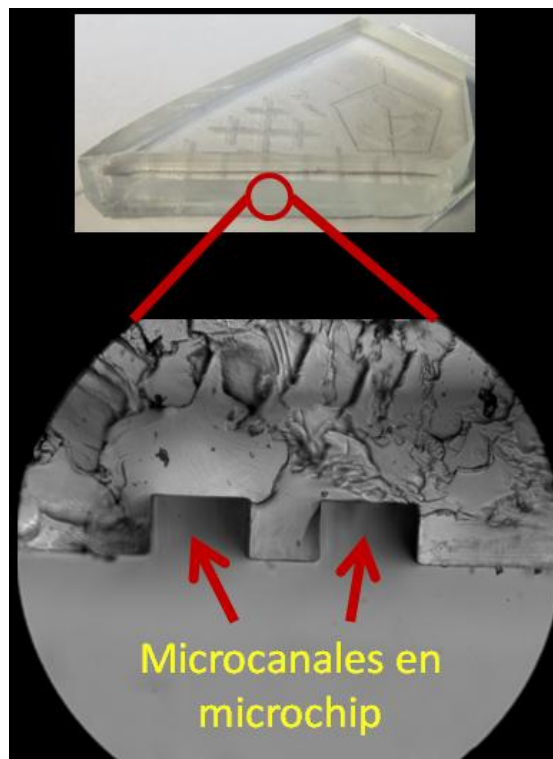


Figura 16. Imagen microscópica de los microcanales en el microchip. Se aprecia que la formación rectangular de los microcanales no presenta deformaciones.

3.2 FORMACIÓN DE MICROGOTAS EN MICROCHIPS

La formación de microgotas se hizo introduciendo los líquidos en los microchips utilizando jeringas de distintos volúmenes (1.0, 3.0, 5.0, 10.0 y 20.0 mL, BD Plastipak) y bombas para jeringas (Modelo NE-1000, New Era). Los líquidos viajan de las jeringas a los microchips por medio de un tubo de PTFE de diámetro interno 0.5 mm (modelo 06417-21, Cole Parmer). El volumen y el flujo de las microgotas formadas en esta sección es de decenas de nanolitros a flujos de ciento de microlitros por hora.

3.2.1 FORMACIÓN DE GOTAS A DISTINTOS FLUJOS

El control del flujo en los microchips de microfluídica se varió desde las bombas para jeringas que contienen un control para las unidades de flujo proporcionado ($\mu\text{L/hr}$, $\mu\text{L/min}$, nL/hr y nL/min). La finalidad de poder regular el flujo de la fase orgánica y de la fase acuosa dentro del microchip es para establecer un tiempo adecuado de residencia de las microgotas dentro del microchip. Se hicieron pruebas de formación de microgotas a distintos flujos con el fin de establecer distintos tiempo de residencia para la reacción enzimática.

3.2.2 FORMACIÓN DE MICROGOTAS CON BUFFER DE FOSFATOS COMO FASE ACUOSA

Para los ensayos enzimáticos en los microchips de microfluídica, se hizo uso de un Buffer de fosfatos 100 mM (pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$) de acuerdo a lo reportado en [20]. La formación constante, aislada de la fase orgánica y repetida de las microgotas por el tiempo que duraron los experimentos enzimáticos garantiza que esta técnica sea factible para los objetivos propuestos. Para esto, se hicieron pruebas de estabilidad de microgotas a distintas condiciones y concentraciones, las cuales son:

- Uso de buffer sólo de fosfatos 100 mM (pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$).
- El uso de albúmina de suero bovina ABS para estabilizar a la enzima (BSA por sus siglas en inglés) (Aldrich) en concentraciones de 0, 0.5, 1 y 2 mg/mL Ver apéndice A.
- Uso de DTT en el buffer de fosfatos para prevenir enlaces inter e intramoleculares en la enzima en concentración de 4.39 mg/mL de acuerdo a lo reportado en [20].

3.2.3 FORMACIÓN DE MICROGOTAS EN MICROCHIP DE FRACTALES CON ADAPTACIÓN A INSTRUMENTO HPLC

La formación de microgotas dentro de un microchip acoplado a un instrumento HPLC (LC-20AB, Shimadzu Inc.) se hizo de la misma manera que la formación de microgotas en un sistema simple, sólo que se hizo la adaptación de un sistema de succión utilizando una jeringa que succionó el flujo en exceso del HPLC en el microchip. La purga es necesaria para el correcto funcionamiento y formación de microgotas dentro del microchip, esto es debido a que el flujo proveniente del instrumento HPLC es de 6000 $\mu L/hr$, mucho mayor que los flujos desde 30 hasta 700 $\mu L/hr$ utilizados en el microchip.

El arreglo experimental para la formación de microgotas con la adaptación al instrumento HPLC se muestra en la Figura 17.

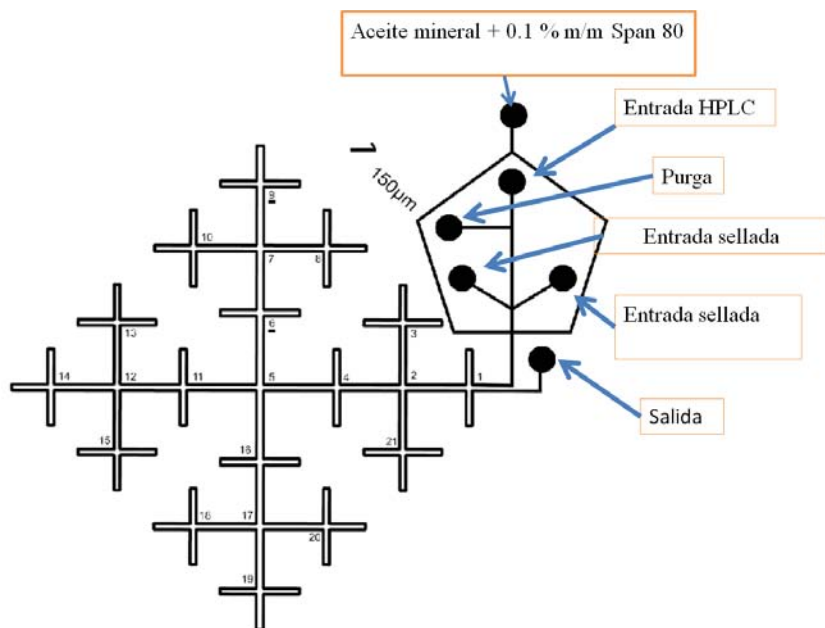


Figura 17. Esquema experimental de la formación de microgotas en microchip de microfluídica adaptado a instrumento HPLC

3.2.4 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RESIDENCIA DE MICROGOTAS DENTRO DE LOS MICROCHIPS

El tiempo de residencia de las microgotas viajando en el microchip está directamente relacionado al flujo de las microgotas y la distancia dentro del microchip. Para obtener el tiempo de residencia, así como el tiempo que lleva la gota viajando en distintos segmentos clave del microchip, se diseñó en el software Excel office (versión 2003, Microsoft) una hoja de cálculo (Figura 18) con la longitud y el ancho de los microcanales, que puede calcular a distintos flujos el tiempo de residencia de las microgotas en puntos clave dentro del microchip.

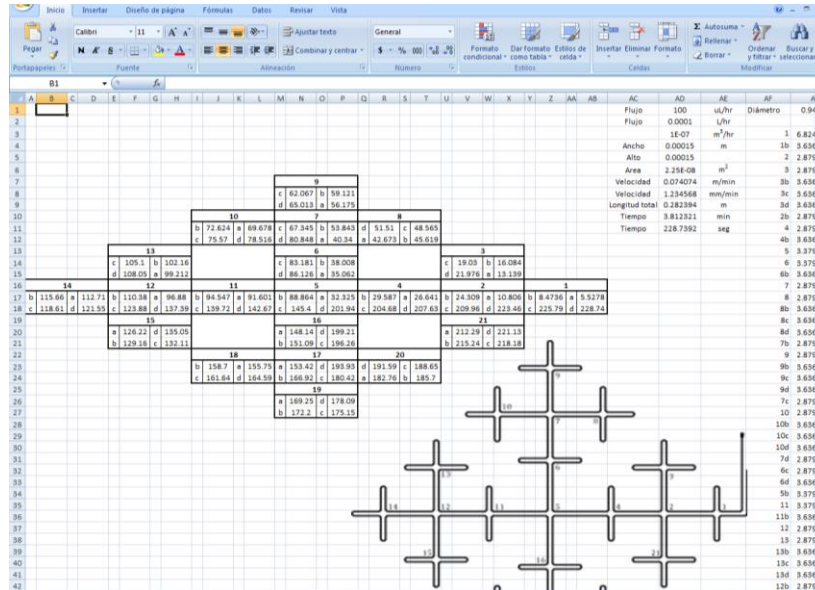


Figura 18. Plantilla en software Excel office para el cálculo de residencia de las microgotas dentro del microchip.

Para todos los ensayos hechos en los microchips se necesitó saber el tiempo de residencia de cada microgota, para hacer la relación temporal con la fluorescencia emitida por la microgota.

El tiempo de residencia de cada microgota es inversamente proporcional con el flujo de cada microgota, se encontró que entre mayor sea el flujo de la microgota, menor será el tiempo de residencia. Estos cálculos dentro de los microchips, así como el tiempo que lleva la gota en segmentos clave del microchip se obtienen en la hoja de cálculo de Excel mediante la fórmula descrita abajo:

$$T_{res} = \frac{A * D}{Q}$$

T_{res} . = Tiempo de residencia (s).

D = Longitud total del microcanal (m).

A = Área del microchip (m²).

Q = Flujo total (m³/s).

De acuerdo con las características del microchip (100 μm de altura x 150 μm de ancho) con diseño de fractales usados durante los experimentos y los flujos usados en los experimentos, se calcularon los tiempos de residencia. Algunos ejemplos de dan en la tabla 1.

Tabla 1. Tiempos de residencia total en minutos y segundos de las microgotas dentro del microchip de fractales calculados por la hoja de cálculo de Excel

Flujo total Fase acuosa + fase orgánica ($\mu\text{L/hr}$)	Tiempo de residencia de la microgota dentro del microchip (s)	Tiempo de residencia de la microgota dentro del microchip (min)
30	762	12.7
100	228	3.8
150	152	2.5
200	114	1.9
700	32	0.5

3.2.5 REGULACIÓN DE PURGA EN EL MICROCHIP CON ADAPTACIÓN A INSTRUMENTO HPLC

El sistema de purga en el microchip tiene la finalidad de disminuir el flujo proveniente del instrumento HPLC, ya que el flujo de éste es de 6000 $\mu\text{L/hr}$ y en el microchip se utilizan valores de decenas de $\mu\text{L/hr}$ para la formación óptima de microgotas. En el laboratorio se optimizó este proceso haciendo variar el flujo de succión de la purga desde 50 - 150 $\mu\text{L/min}$, obteniéndose un valor óptimo de la succión de 85.7 $\mu\text{L/min}$ (5142 $\mu\text{L/hr}$).

3.3 INSTRUMENTACIÓN FOTOGRÁFICA

3.3.1 USO DE IMAGE J PARA EL ANÁLISIS DIGITAL DE IMÁGENES

El posterior análisis de las imágenes requiere un software que mida la intensidad de la fluorescencia de forma confiable y que proporcione datos precisos sobre la cantidad de píxeles presentes en cada imagen analizada.

El software utilizado durante todo el proyecto fue: ImageJ (National Institutes of Health ; <http://imagej.nih.gov/ij/>) que es un programa que calcula áreas en las imágenes y da valores de intensidad de color basado en estadísticas de valor de píxel. (Figura 19)

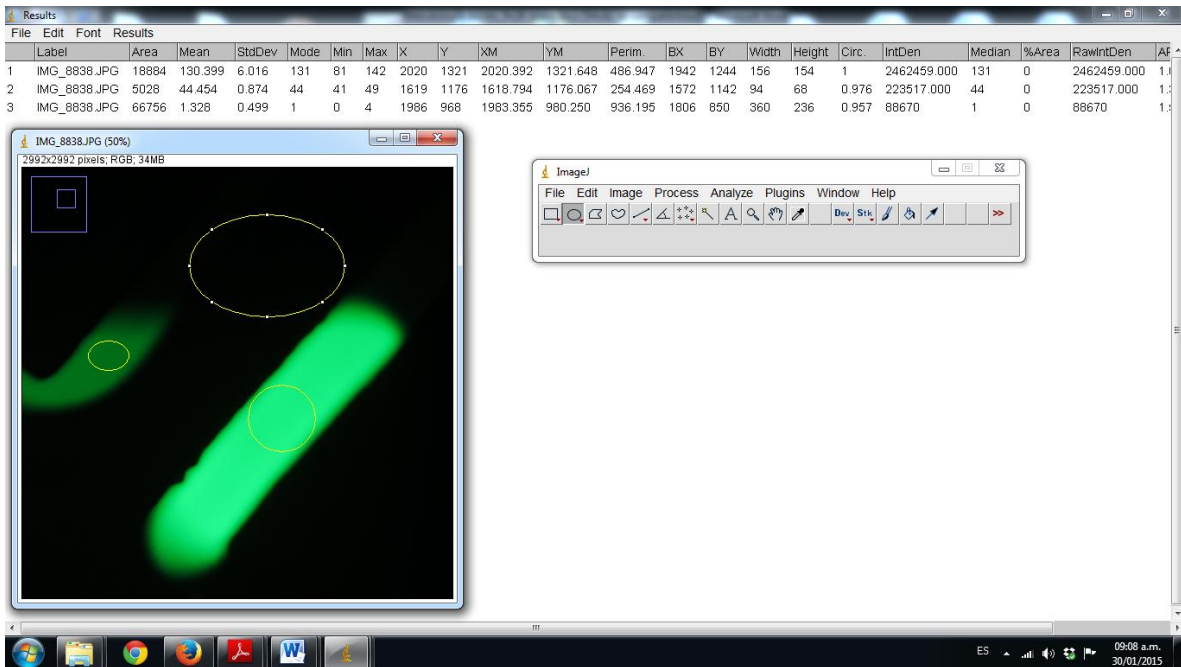


Figura 19. Muestra de pantalla de software ImageJ usado para calcular intensidad de color basado en estadísticas de valor de píxel.

3.3.2 USO DE CÁMARA PHANTOM

La cámara Phantom es un cámara de video de alta velocidad que puede grabar videos desde 1 hasta más de 5 000 cuadros por segundo, lo que permite grabar sucesos que suceden a velocidad normal y a alta velocidad [21]. La formación de microgotas a flujos $> 500 \mu\text{L/hr}$ requiere equipos de fotografía más sofisticados para poder detectar la fluorescencia individual de cada microgota con una mayor precisión, por eso fue necesario el uso de la cámara Phantom para tomar fotografías a una alta velocidad. Después de varias pruebas en el laboratorio, se optimizó la configuración de la cámara Phantom para poder hacer una correcta lectura de la fluorescencia en cada microgota. La configuración de la cámara Phantom fue: Intervalo de apertura $10000 \mu\text{s}$, Tiempo de exposición $3000.04 \mu\text{s}$ y Disparador a $660\ 722.79 \mu\text{s}$.

* ISO = Es una medida en fotografía que marca la cantidad de luz que necesita la cámara para hacer una fotografía.

** S = Tiempo de exposición es el ajuste del lapso durante el cual el captor o la película es expuesto a la luz en cada toma.

*** f = apertura del diafragma de la lente controla la cantidad de luz que pasa a través del objetivo.

La toma de imágenes se hizo con el software de la cámara, PCC versión 2.2 (imagen 20), que al tomar las imágenes las guarda en formato .PNG, formato que permite guardar una gran cantidad de datos acerca de la imagen. Una vez guardada la imagen se hizo uso del software Image J para el análisis de imágenes.



Figura 20. Pantalla del software PCC versión 2.2 con el que se toman las fotografías de las microgotas. La configuración de la cámara Phantom son: : Intervalo de apertura 10000 μ s, Tiempo de exposición 3000.04 μ s y Disparador a 660 722. 79 μ s.

3.4 CURVA PATRÓN DE FLUORESCÉINA

3.4.1 CURVA PATRÓN DE FLUORESCÉINA EN MICROCHIPS CON DISEÑO DE SERPENTÍN

Se elaboró una curva patrón de fluoresceína en un intervalo de concentraciones de 0-30 μM . Las soluciones de fluoresceína para la curva de calibración son hechas en el mismo buffer de fosfatos que se usó para el ensayo enzimático. La configuración de la cámara digital son: ISO 100, S = 1/20 s, f= 3.5, sin Zoom, medidor de luz: Ponderado central, balance de blancos: Tungsteno.

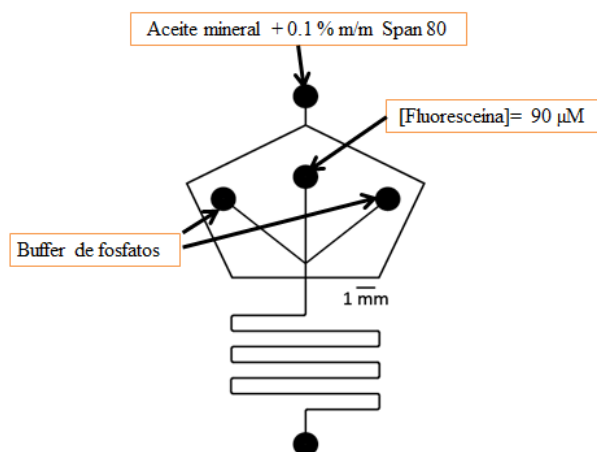


Figura 21. Conexiones en el microchip con diseño de serpentín echas para elaborar al cueva de calibración de fluoresceína 0-30 μM .

La razón por la que se utiliza en todos los experimentos el triple de la concentración requerida al final se debe al hecho de que al mezclarse los distintos flujos acuosos, se da un aumento del volumen y por ende baja la concentración. Si son dos flujos iguales, al mezclarse, la concentración del componente presente se disminuirá a la mitad, y la mezcla de tres flujos distintos da la concentración del componente disminuida a una tercera parte y así sucesivamente.

3.4.2 CURVA DE PATRÓN DE FLUORESCENCIA EN MICROCHIP DISEÑO DE FRACTALES

Las conexiones hechas en el microchip con diseño de fractales para la elaboración de las curvas de calibración, tanto con la cámara digital HD como con la cámara Phantom se muestran en la Figura 22.

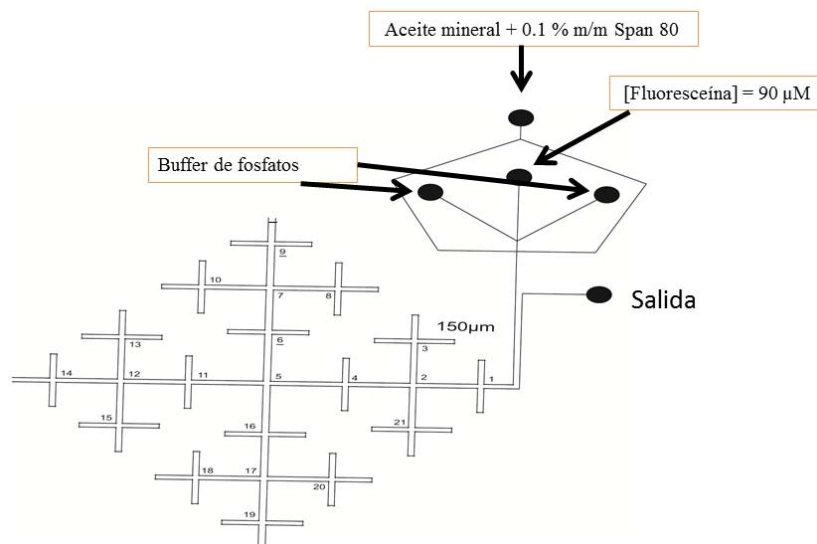


Figura 22. Conexiones en el microchip con diseño de fractales hechas para elaborar al curva de calibración de fluoresceína 0-30 μM.

3.4.2.1 Cámara digital HD

Se elaboró una curva patrón de fluoresceína en intervalo de concentraciones de 0-30 μM con la misma configuración de la cámara digital que en el diseño de serpentin sección 3.4.2

3.4.2.2 Cámara Phantom

Se elaboró una curva patrón de fluoresceína en intervalo de concentraciones de 0-30 μM de la misma forma que en el diseño de serpentin sección 3.4.2. Para la toma de imágenes se usó la cámara Phantom con la configuración: Intervalo de apertura 10000 μs, Tiempo de exposición 3000.04 μs y Disparador a 660 722. 79 μs.

3.4.3 CURVA PATRÓN DE FLUORESCÉINA EN MICROCHIP CON DISEÑO DE FRACTALES CON ADAPTACIÓN A INSTRUMENTO HPLC

Las conexiones hechas en el microchip con diseño de fractales con adaptación con instrumento HPLC para la elaboración de la curva de calibración con la cámara Phantom se muestra en la Figura 23.

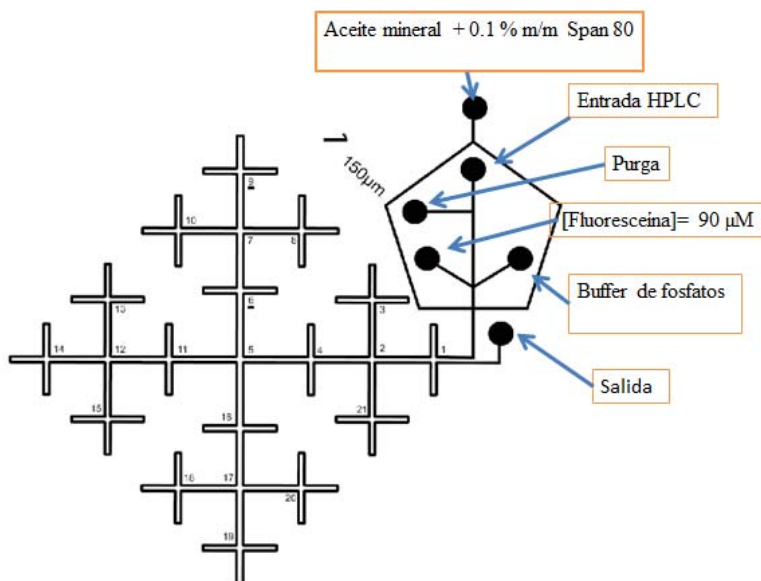


Figura 23. Conexiones en el microchip con diseño de fractales con adaptación con instrumento HPLC hechas para elaborar al curva de calibración de fluoresceína 0-30 µM

3.4.4 COMPORTAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA A DISTINTOS PORCENTAJES DE METANOL

Se evaluó la pérdida de fluorescencia a distintos porcentajes de MeOH provenientes del HPLC en el montaje experimental del microchip con diseño de fractales con adaptación a instrumento HPLC. En este diseño se evaluó la pérdida de fluorescencia en las microgotas evaluando la diferencia de fluorescencia entre las 4 gotas que quedan en el centro del microchip (intersección 5) y los tiempos que a éstas corresponden. Los porcentajes de MeOH provenientes del instrumento HPLC probados son los porcentajes del programa de elución del inhibidor usado (PETG). La curva de elución va desde 50% MeOH, sube hasta 85% y vuelve a bajar a 50% MeOH Figura 24.

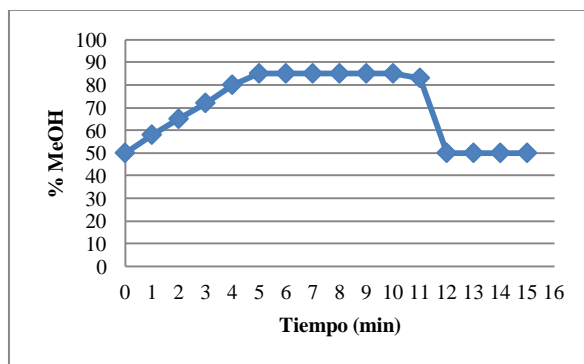


Figura 24. Primer programa de elución del inhibidor (PETG) en el instrumento HPLC. Flujo 0.1 mL/min.

La pérdida de fluorescencia por efectos de extracción de compuestos a la fase orgánica, así como las pruebas realizadas se exponen en el apéndice H.

3.5 ENSAYO ENZIMÁTICO DE β -D-GALACTOSIDASA CON FDG (FLUORESCEIN –DI-B-D-GALACTOPIRANOSIDO)

3.5.1 ENSAYO ENZIMÁTICO DE β -D-GALACTOSIDASA + FDG EN MICROCHIP CON DISEÑO DE SERPENTÍN

Se llevó a cabo el ensayo enzimático dentro del microchip con diseño de serpentín utilizando tres entradas de fase acuosa de acuerdo a la Figura 25. Se varió la concentración del sustrato (FDG) desde 2.5-30 μ M manteniendo constante la concentración de enzima (100 U/mL), esto se hizo variando los flujos del sustrato y del buffer, y no cambiando el flujo de la solución con la enzima. De esta forma se mantuvo constante el flujo total de la fase acuosa. Tanto las soluciones de sustrato y enzima se preparan frescas para los experimentos. El flujo total de reactivos y fase orgánica en el experimento es de 100 μ L/hr, 50 μ L/hr para fase orgánica y 50 μ L/hr para el total de fase acuosa.

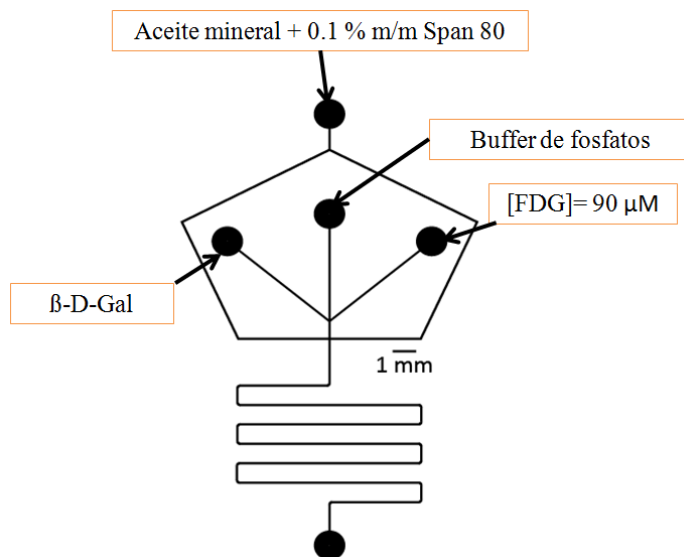


Figura 25. Conexiones en el microchip con diseño de serpentin hechas para llevar cabo el ensayo enzimático.

3.5.2 ENSAYO ENZIMÁTICO DE β -D-GALACTOSIDASA + FDG EN MICROCHIP CON DISEÑO DE FRACTALES

Se llevó a cabo el ensayo enzimático dentro del microchip con diseño de fractales utilizando tres entradas de fase acuosa de acuerdo a la Figura 26, se varió la concentración del sustrato (FDG) desde 15-30 μM manteniendo constante la concentración de enzima (25 U/mL), esto se hizo variando los flujos del sustrato y del buffer, y no cambiando el flujo de la solución con la enzima. De esta forma se mantuvo constante el flujo total de la fase acuosa. Tanto las soluciones de sustrato y enzima se preparan frescas para los experimentos. El flujo total de reactivos y fase orgánica en el experimento es de 150 $\mu\text{L/hr}$, 75 $\mu\text{L/hr}$ para la fase orgánica y 75 $\mu\text{L/hr}$ para el total de fase acuosa.

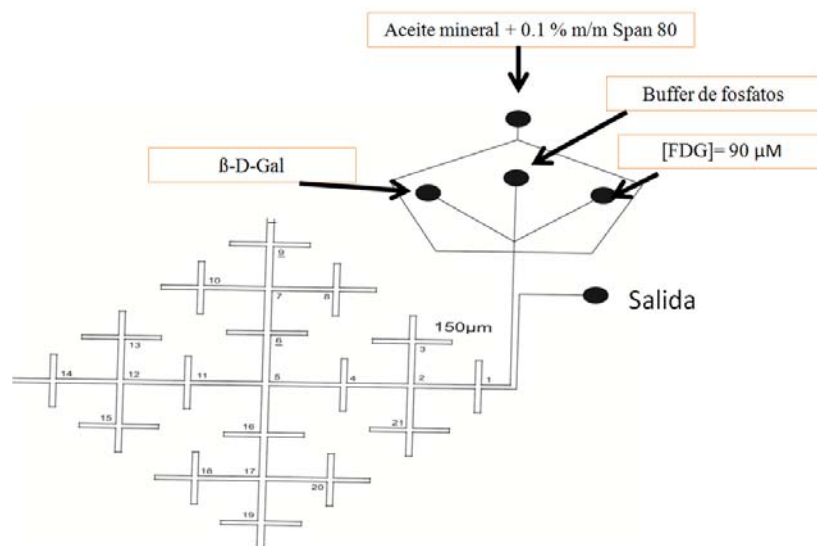


Figura 26. Conexiones en el microchip con diseño de fractales hechas para llevar cabo el ensayo enzimático

3.5.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A DISTINTOS PORCENTAJES DE METANOL EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Se hicieron ensayos enzimáticos en el espectrofotómetro, haciendo reaccionar la enzima con sustrato en distintos porcentajes de MeOH, esto con el fin de monitorear qué tanto se veía afectada la actividad enzimática por el porcentaje de MeOH. Esto se debe a que el programa de elución del inhibidor tiene una variación del porcentaje de MeOH desde el 50% hasta el 85 %, que en la microgota se ve disminuido a 18% y 29% aproximadamente. Los porcentajes de MeOH probados fueron 30, 15 y 10 %.

Los ensayos enzimáticos a distintos porcentajes de MeOH se llevaron a cabo en microceldas de cuarzo en el espectrofotómetro. La secuencia seguida para realizar los experimentos se describe a continuación.

- 1.- Se preparan cuatro soluciones distintas y totalmente frescas, una que contiene la β -D-Galactosidasa en el buffer del ensayo y las otras soluciones que contienen al sustrato (FDG) en el doble de porcentaje de MeOH, es decir 60, 30 y 0% MeOH.
- 2.- Se colocaron 30 μ L de la solución que contiene a la enzima en el espectrofotómetro, esto con el fin de que la enzima se encuentre a la temperatura del experimento 20 °C.

3.- Pasados 5 minutos, se prepara el software para recabar datos del ensayo y una vez estuvo listo, se procede a agregar 30 μL de la solución que contiene cada una de los distintos porcentajes de MeOH. Se mezcla ligeramente y se inició el programa del software.

4.-Se deja correr el ensayo durante 19 minutos.

El programa del software utilizado en este ensayo enzimático es:

Barrido de 550-350 nm, Abs máx. 4, Intervalo de medición de 10 nm, 0.05 $t_{1/2}$.

Colección avanzada:

Etapa 1 ciclo 0.5 min., final 5 min.

Etapa 2 ciclo 5 min., final 19 min.

3.5.4 ENSAYO ENZIMÁTICO DE β -D-GALATOSIDASA + FDG EN MICROCHIP DE FRACTALES ACOPLADO AL INSTRUMENTO HPLC

Programa de elución del inhibidor (sin inyectar el PETG)

Se corrió el programa de elución del inhibidor (PETG) en el HPLC (Figura 24) sin inyectar el inhibidor, a la vez que se monitoreó la reacción enzimática en el microchip bajo las condiciones cambiantes de porcentaje de MeOH. Esto se llevó a cabo monitoreando la fluorescencia de las microgotas con la reacción durante todo el programa de elución. El montaje experimental se llevó a cabo de acuerdo a la Figura 28. No se varió la concentración del sustrato ($[\text{FDG}] = 10 \mu\text{M}$) ni de la enzima ($[\beta\text{-D-Gal}] = 50 \text{ U/mL}$) ambos en microgotas. Tanto las soluciones de sustrato y enzima se preparan frescas para los experimentos. El flujo del FDG y de la $\beta\text{-D-Gal}$ es de 60 $\mu\text{L/hr}$ cada uno, el flujo de la fase orgánica es de 250 $\mu\text{L/hr}$ y la purga es de 5742 $\mu\text{L/hr}$. Esto se resume en la tabla 2.

Durante el experimento se tomaron imágenes sólo en un punto del microchip (intersección 5), como se indica en la Figura 27. La configuración de la cámara Phantom son: Intervalo de apertura 10000 μs , Tiempo de exposición 3000.04 μs y Disparador a 660 722. 79 μs . Microscopio: Objetivo 10x, 100% intensidad, 4to. cuadro de enfoque. Lámpara UV: 100% transmitancia. El programa de inyección para el inhibidor (PETG) en el HPLC es el programa de la Figura 24.

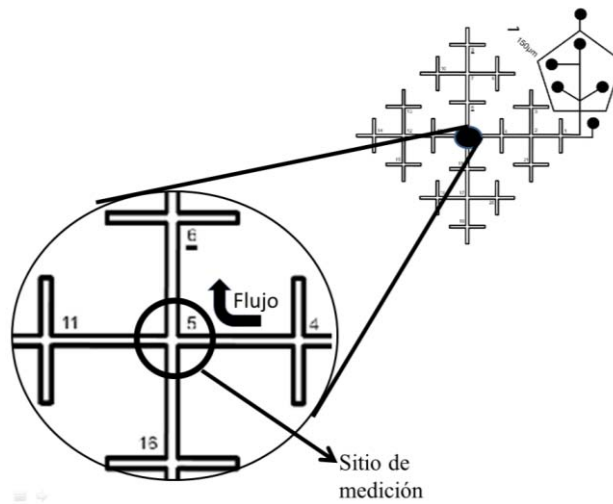


Figura 27. Forma en que se midió en el centro del microchip con diseño de fractales con adaptación a instrumento HPLC.

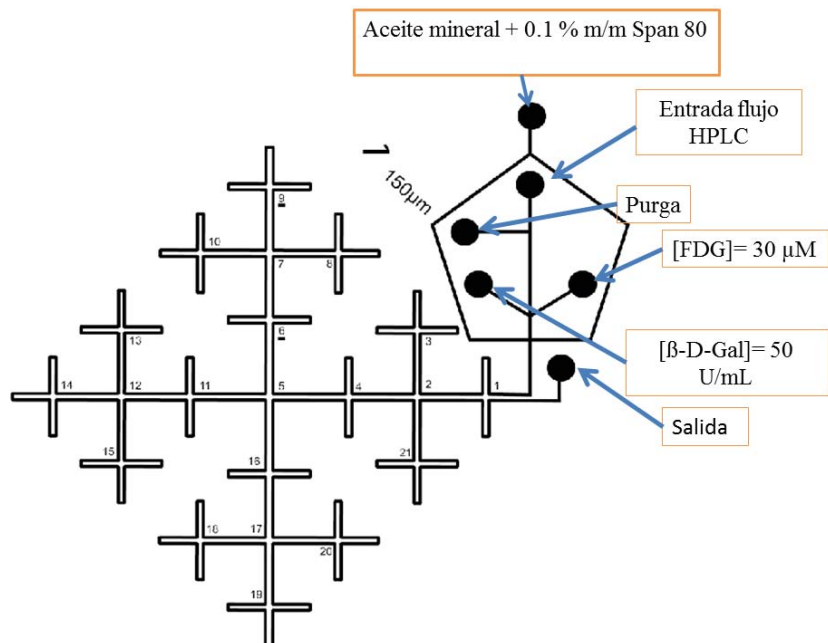


Figura 28. Conexiones en el microchip con diseño de fractales acoplado al instrumento HPLC hechas para llevar cabo el ensayo enzimático.

Una vez que estuvieron montadas las conexiones, se activó el flujo del instrumento HPLC al 50% porcentaje de MeOH inicial. En el momento en el que se comenzó a correr el flujo del HPLC, se activó la purga y el flujo de las bombas de jeringas que introducen a la enzima y sustrato al microchip. Se dejó estabilizar el sistema por 5 minutos, una vez que lo cual, se corrió el programa de elución del inhibidor.

Al tiempo que el programa de elución del inhibidor se ejecutaba se tomaron imágenes cada minuto de las microgotas. Esto se hizo hasta dos minutos más después de que terminó el programa de elución en el instrumento HPLC, esto es porque el retraso (delay) entre microchip e instrumento HPLC fue considerado (1 min 50 segundos).

Las imágenes de las microgotas fueron analizadas digitalmente con el programa Image J para obtener la intensidad de fluorescencia a lo largo del programa de elución del inhibidor.

Tabla 2. Flujos y concentraciones de reactivos usados en el experimento

	Concentración	Flujo	Volumen de la jeringa usada (mL)
β-D-Gal	50 U/mL	60 μL/hr	1
FDG	30 μM	60 μL/hr	1
Aceite	0.1% m/m Span 80	250 μL/hr	3
Purga	-	5742 μL/hr	20

3.6 ENSAYO ENZIMÁTICO DE β -D-GALACTOSIDASA CON FDG E INHIBIDOR (PETG)

3.6.1 ENSAYO ENZIMÁTICOS CON INHIBIDOR (PETG) + β -D-GALACTOSIDASA + FDG EN ESPECTROFOTÓMETRO

El procedimiento experimental es idéntico al punto 3.6.3. Las diferencias son que en las 4 distintas soluciones, una contiene la β -D-Galactosidasa en el buffer del ensayo (200 U/mL) y las otras soluciones contienen el sustrato (FDG) con el inhibidor (PETG) en el buffer del ensayo. Las concentraciones de PETG usadas son 0.1, 0.25 y 0.5 mM, de acuerdo a los datos reportados en [14].

Se dejó correr el ensayo durante 30 minutos.

El programa del software utilizado en este ensayo enzimático es:

Barrido de 550-250 nm, Abs máx. 4, Intervalo de medición de 10 nm, 0.05 t_{1/2}.

Colección simple: Etapa ciclo 0.02 minutos, final 30 min.

3.6.2 ENSAYO ENZIMÁTICOS DE β -D-GALACTOSIDASA CON INHIBIDOR (PETG) Y FDG EN MICROCHIP DE FRACTALES ACOPLADO A INSTRUMENTO HPLC

3.6.2.1 Primer programa de elución del inhibidor (inyectando inhibidor) (PETG)

El montaje experimental se hizo de la misma forma que en la sección 3.5.4. En este experimento sí se inyectó el inhibidor (PETG) a 33 mM en el instrumento HPLC. Los flujos y concentraciones usados en el experimento se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Flujos y concentraciones de reactivos usados en el experimento

	Concentración	Flujo	Volumen de la jeringa usada (mL)
β -D-Gal	50 U/mL	60 μ L/hr	1
FDG	30 μ M	60 μ L/hr	1
Aceite	0.1% m/m Span 80	250 μ L/hr	3
Purga	-	5502 μ L/hr	20

3.6.2.2 Segundo programa de elución del inhibidor (inyectando inhibidor) (PETG)

El montaje experimental se hizo de la misma forma que en la sección 3.6.4. En este experimento sí se inyectó el inhibidor (PETG) a 33 mM en el instrumento HPLC y se modificó el programa de elución al de la Figura 29. Los flujos y concentraciones usados en el experimento se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Flujos y concentraciones de reactivos usados en el experimento

	Concentración	Flujo	Volumen de la jeringa usada (mL)
β -D-Gal	50 U/mL	60 μ L/hr	1
FDG	30 μ M	60 μ L/hr	1
Aceite	0.1% m/m Span 80	250 μ L/hr	3
Purga	-	5502 μ L/hr	20

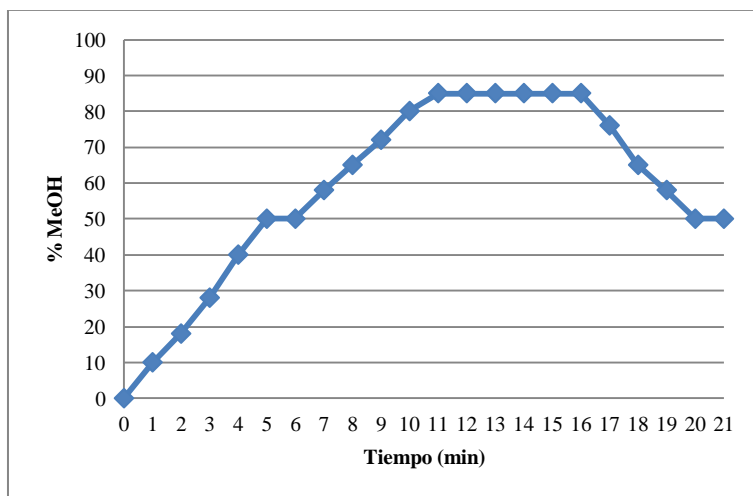


Figura 29. Segundo programa de elución del inhibidor (PETG) en el instrumento HPLC. Flujo 0.1 mL/min.

Las mediciones y el arreglo experimental se hicieron del mismo modo que en el programa de inyección 1.

3.7 PROGRAMAS DE ELUCIÓN EN INSTRUMENTO HPLC

3.7.1 PROGRAMA DE ELUCIÓN PARA EL INHIBIDOR (PETG)

Para el programa de elución se tuvo que hacer un barrido en el espectrofotómetro del inhibidor a distintas concentraciones con el fin de hallar la longitud de onda a la cual absorbe más el inhibidor. Se encontró que el Feniletil- β -D-tiogalactopiranosido (PETG) tiene una absorbancia característica a 254 nm, misma longitud de onda que se puso en el detector del HPLC. También se hizo simultáneamente un barrido de absorbancia del MeOH puro y H₂O porque se tuvo que descartar que ambos no absorbieran a la misma longitud del inhibidor. Los espectros de absorbancia del PETG, el agua y el MeOH se muestran juntos en la Figura 30.

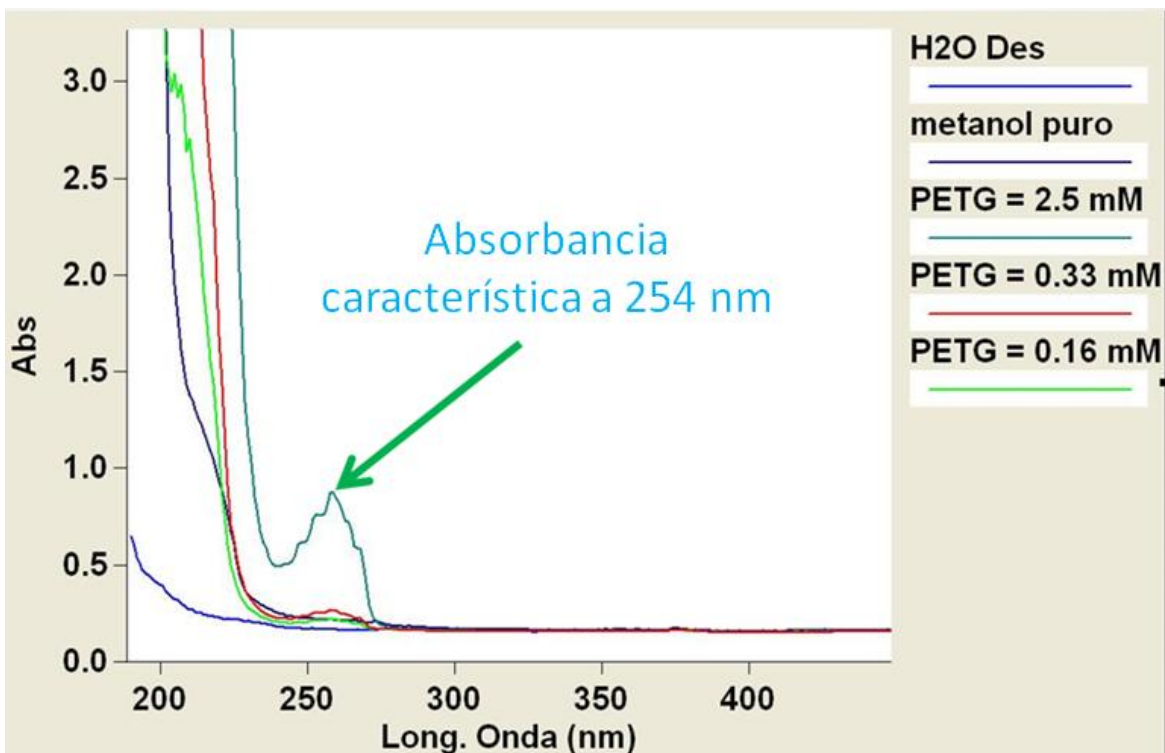


Figura 30. Espectro de absorción del inhibidor (PETG) a distintas concentraciones. Se nota una absorción característica a 254 nm y que tanto el MeOH como el H₂O no absorben en ésta longitud de onda.

Una vez encontrada la λ característica del inhibidor, se procede a crear un programa de inyección en el cual la concentración de PETG fuese detectada por el instrumento HPLC con columna cromatográfica de fase reversa (Ultra II® C18 3 μ m 30 x 2.1 mm, Restek). A lo largo de varios programas de inyección, se logró optimizar el programa de elución y la concentración de PETG inyectada y que puede ser detectada por el instrumento HPLC.

El programa de elución optimizado empieza desde un 0% de MeOH y asciende hasta 85 % MeOH, para regresar a una concentración de 50% MeOH porque bajo este programa la formación de microgotas no se ve afectada por el cambio brusco de los disolventes; con un flujo constante de 0.1 mL/min y una duración de 20 min, los detectores están en $\lambda = 210$ nm y $\lambda = 254$ nm. La λ a 210 nm es porque compuestos aromáticos como el inhibidor absorben a esta longitud de onda, mientras que se usó la λ a 254 nm porque es donde el inhibidor presenta absorción característica.

El programa de elución se representa en la figura 31.

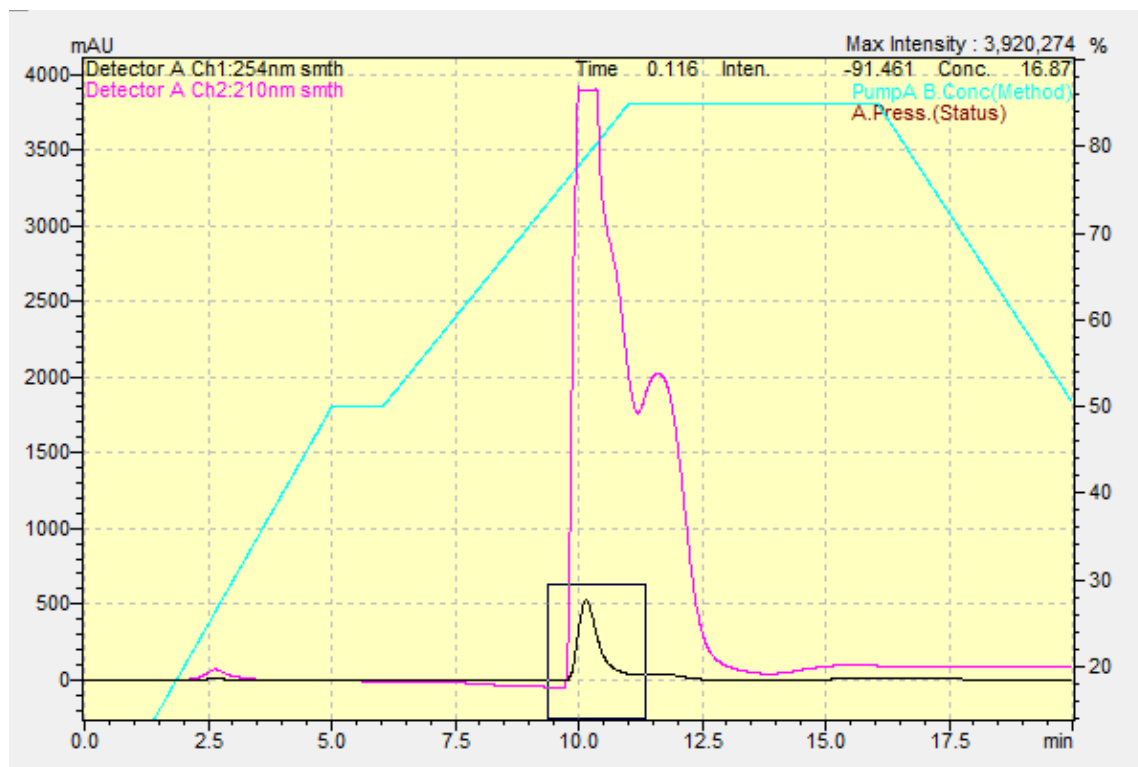


Figura 31. Programa optimizado de elución para el inhibidor PETG (inyección de 80 μ L a 8.25 mM). Flujo del HPLC 0.1 mL/min. En el cuadro a 10 minutos con 10 segundos aproximadamente se ve el tiempo en el que es detectado el PETG en el instrumento a 254 nm. De color verde agua está el porcentaje de MeOH en la fase móvil.

Tomando el tiempo de detección en el cromatograma ayudó a saber en qué momento se daba la inhibición en la reacción enzimática, ayudándose del retraso de tiempo entre instrumento HPLC y microchip ya calculado.

La forma de inyectar el compuesto es la siguiente: se cargan 80 μ L de PETG a una concentración de 8.25 mM, se carga el programa de elución en el instrumento HPLC y se abre el inyector del HPLC para dar paso al programa.

3.7.2 PROGRAMA DE ELUCIÓN PARA FLUORESCÉINA

Se creó un programa de elución para la fluoresceína en el instrumento HPLC, con el fin de relacionar en el cromatograma el tiempo en el que aparece la señal de la fluoresceína y el tiempo en el que es detectada la fluoresceína en el microchip. Esta diferencia de tiempos, es conocido como retardo de tiempo. Los detalles de la determinación del tiempo de retardo se exponen en el apéndice E.

El programa de elución optimizado empieza con un 0% de MeOH y se mantiene constante por todo el programa; con un flujo constante de 0.1 mL/min, una duración de 10 min y los detectores del HPLC a $\lambda = 492$ nm y $\lambda = 371$ nm.

El programa de elución de la fluoresceína se muestra en la Figura 32.

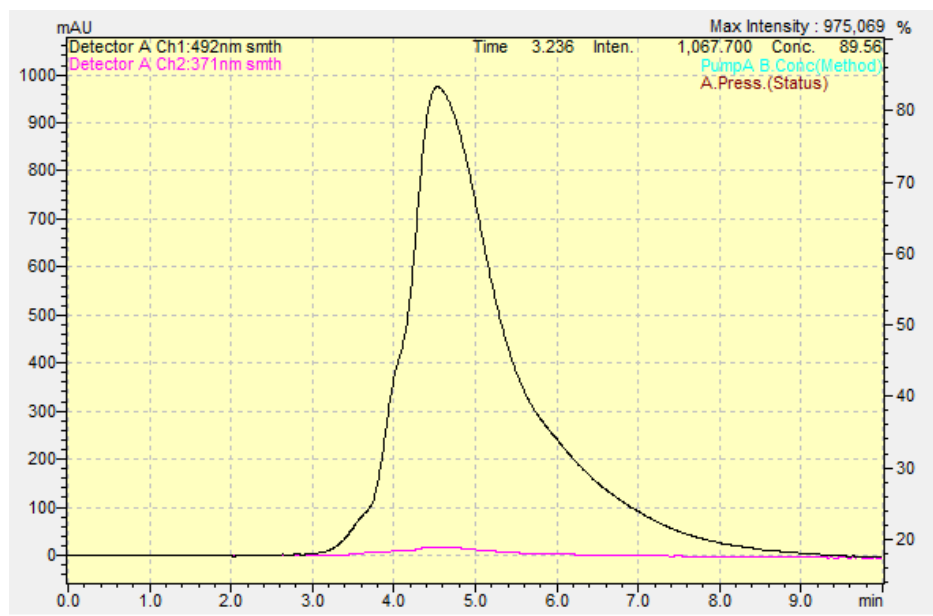


Figura 32. Programa de elución para la fluoresceína. Flujo del HPLC 0.1 mL/min. En la figura se ve el pico de absorbancia aproximadamente a 4 minutos y medio, tiempo cuando la fluoresceína es detectada por el instrumento a 492 nm.

La forma de inyectar el compuesto es la siguiente: se cargan 80 μ L de Fluoresceína a una concentración de 90 μ M, se carga el programa de elución en el instrumento HPLC y se abre el inyector del HPLC para dar paso al programa.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FABRICACIÓN Y DISEÑO DE MICROCHIPS

El diseño de los microchips se llevó a cabo con el software de diseño Adobe Illustrator CS6. El diseño se basa en el trabajo previamente realizado por el Ingeniero Químico Arturo Romero García [17], pero con las siguientes modificaciones (Figura 33): en la región de formación de las microgotas se aumentó el número de entradas de la fase acuosa a 4, una de ellas más ancha para poder acoplar el tubo del instrumento HPLC.

El diseño tiene un microcanal de 28 cm de largo en un área de 4 cm², logrando con esto un tiempo mayor de residencia para las microgotas dentro del microchip. Si se tiene un flujo total de 20 μL/hr, el tiempo de residencia de las microgotas dentro del microchip es de 19 minutos, otro ejemplo es de un flujo total de 300 μL/hr, que da un tiempo de residencia de 1.7 minutos

El diseño utilizado 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 en el centro del microchip [22].

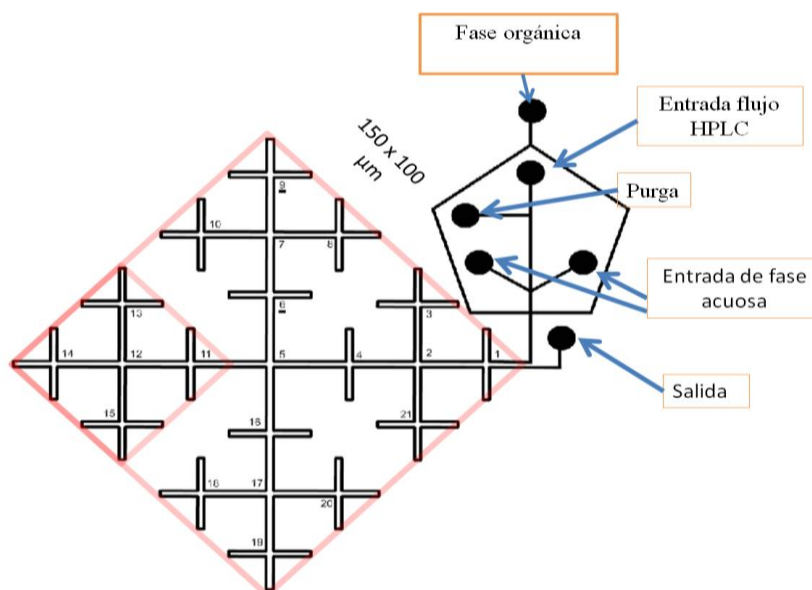


Figura 33. Microchip de microfluídica con diseño de fractales, encerrado en dos polígonos de tamaño ascendente se ve como el diseño de fractales muestra la repetición en la figura.

La manera en la que los diseños hechos de los microchips quedaron en los micromoldes se muestra en la Figura 34.

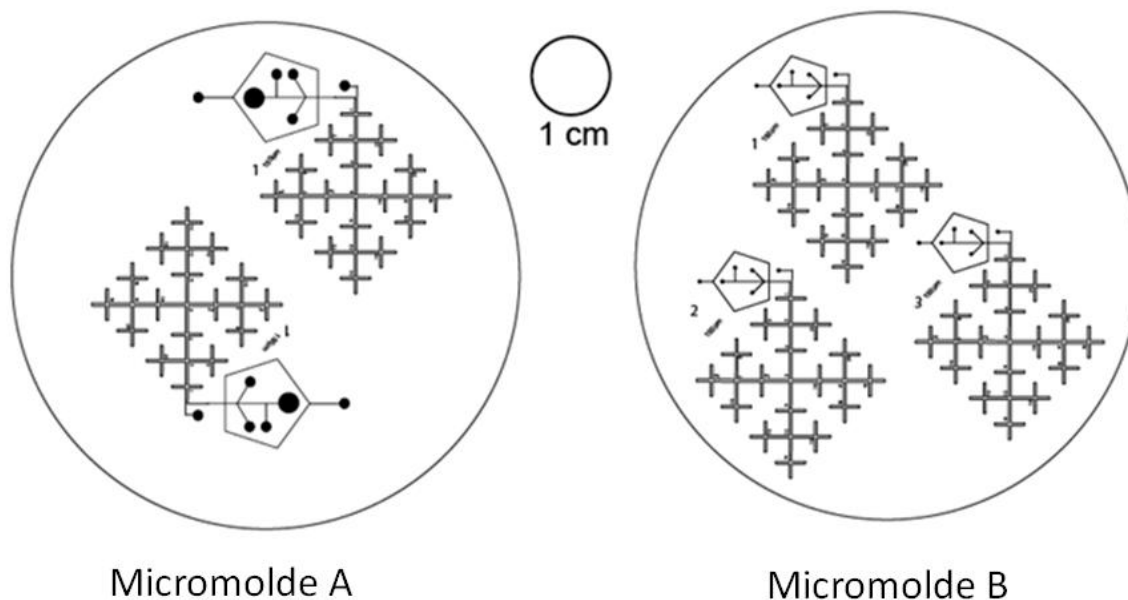


Figura 34. Arreglos que se establecieron para aprovechar el máximo espacio disponible en las obleas de silicio. El micromolde A fue el utilizado para el acoplamiento del instrumento HPLC.

La impresión de los diseños se realizó en una máscara con forma de negativos en Grupo Grafiscanner Adisa, que cuenta con una impresora digital que proporciona una resolución de 2400 puntos por pulgada (DPI).

4.1.1 FABRICACIÓN DE MICROMOLDES CONSTRUIDOS EN EL LABORATORIO

Las características de los diseños de microchip elegidos para las pruebas hechas durante todos los experimentos son: altura de los microcanales $100\ \mu\text{m}$ y ancho de $150\ \mu\text{m}$, como se muestra en la Figura 35. Tres de las paredes de los microchips son de PDMS y la cuarta corresponde al vidrio del portaobjetos.

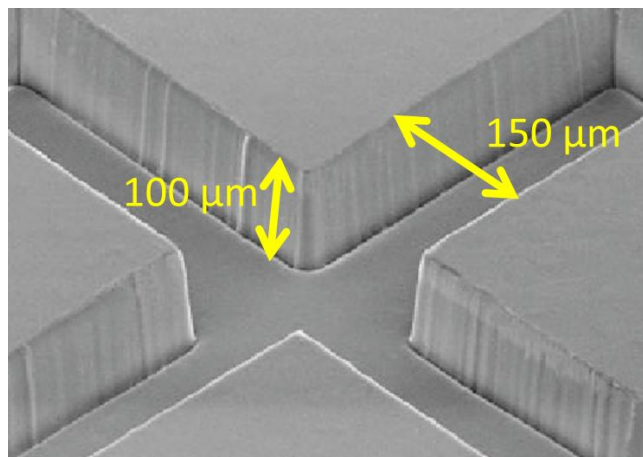


Figura 35. Características requeridas para los microcanales de los microchips usados. Imagen modificada de [7].

En total se fabricaron 7 micromoldes en el laboratorio, de los cuales los microchips del micromolde #3 (diseño de Micromolde A Figura 34) presenta las características requeridas para los experimentos. Las condiciones más relevantes que se cambiaron en los protocolos se resumen en las tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de fabricación de micromoldes usando la resina SU-8 2025

# de Micromolde	Programa spin-coater	Altura de lámpara UV (cm)	Tiempo de exposición (s)
1	1.- 10 s 500 rpm a 100 rpm/s 2.- 40 s 650 rpm a 300 rpm/s	30	60
*2	1.- 10 s 500 rpm a 100rpm/s 2.- 40 s 600 rpm a 300 rpm/s	30	40
3	1.- 10 s 500 rpm a 100rpm/s 2.- 40 s 550 rpm a 300 rpm/s	30	45

*Se desprendió parcialmente la resina de la oblea de silicio

La determinación de las alturas y los anchos de los microcanales se hizo comparando una imagen de una retícula microscópica (Figura 36) con una imagen de los relieves del microchip (Figura 37).

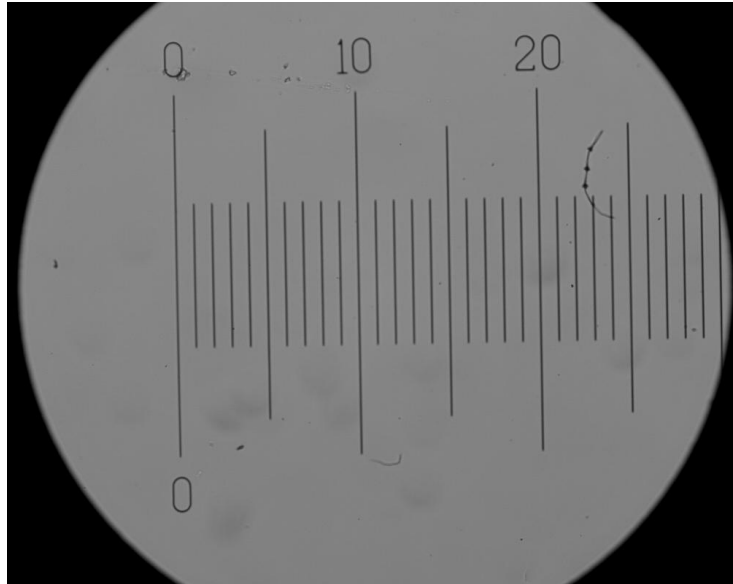


Figura 36. Imagen de la retícula microscópica con la que se hizo la relación con las imágenes de los relieves del microchip. La medida de 0 a 10 corresponde a 500 micras.

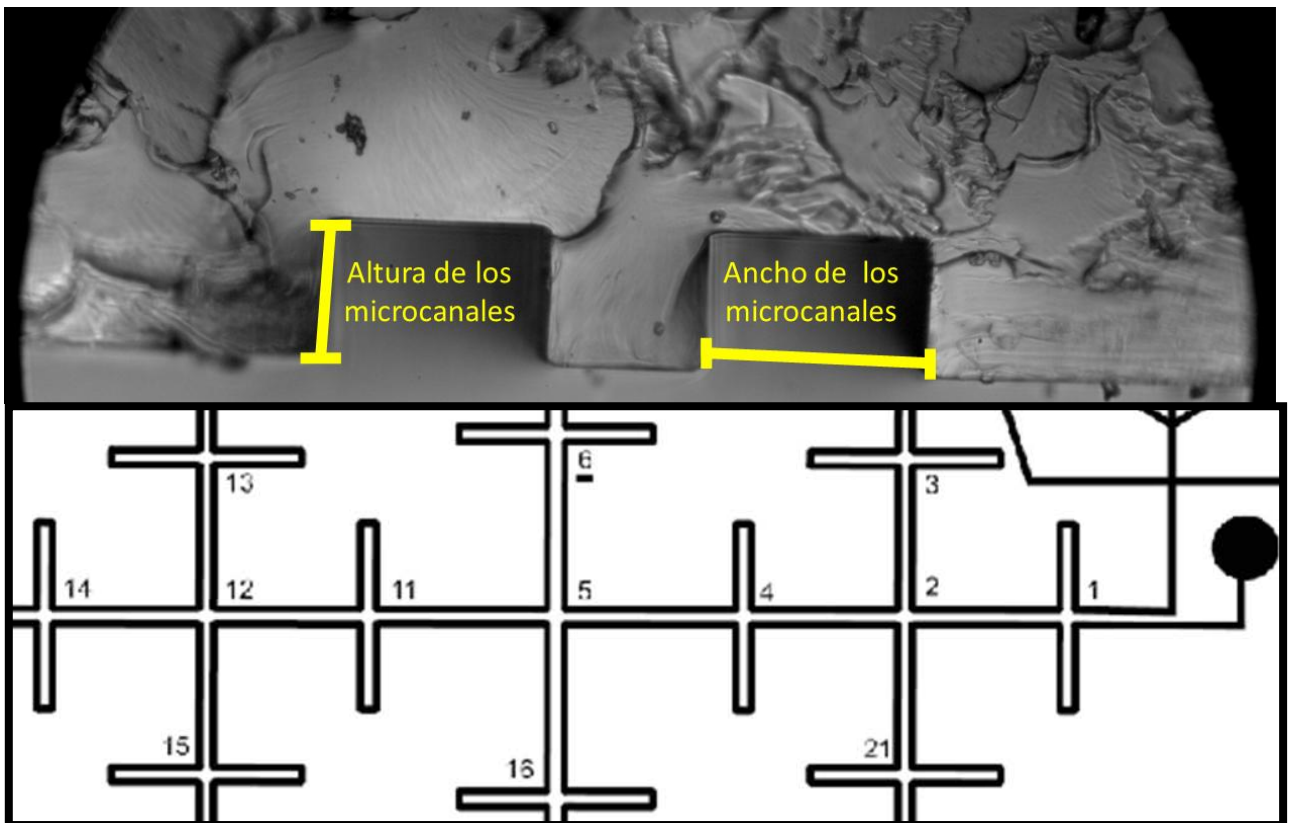


Figura 37. *Arriba* Imagen que ilustra los relieves correspondientes al alto y ancho de los microcanales. *Abajo* Enumeración de intersecciones en el microchip.

El promedio de 3 mediciones de las alturas de los microchips en 5 distintas intersecciones se resumen en la Figura 38.

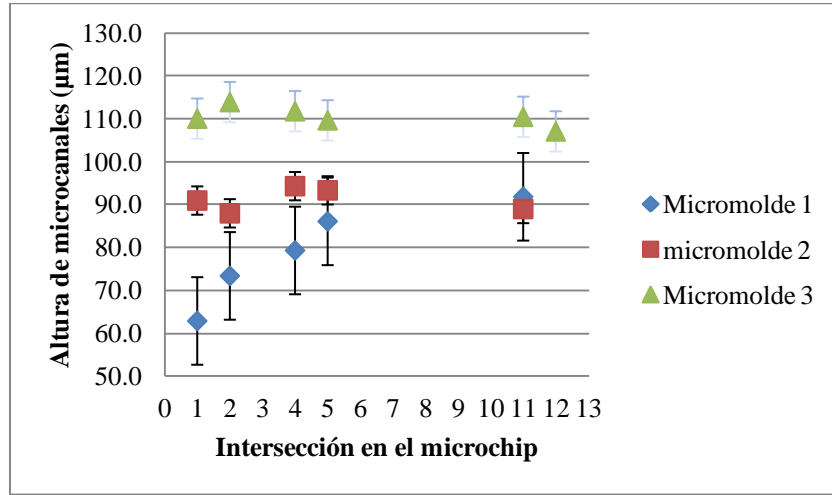


Figura 38. El promedio de tres mediciones de las alturas en 5 distintas intersecciones de los microcanales de 3 distintos microchips hechos con los micromoldes 1, 2 y 3.

El promedio de tres mediciones de los anchos en 5 distintas intersecciones de los microcanales de 3 distintos microchips hechos con los micromoldes 1, 2 y 3 se resumen en las Figuras 39, 40 y 41.

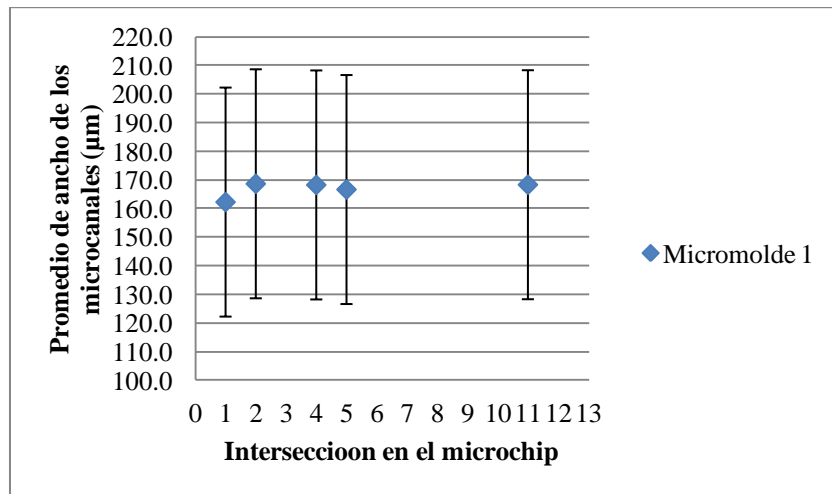


Figura 39. El promedio de tres mediciones de los anchos en 5 distintas intersecciones de los microcanales de 3 distintos microchips del micromolde 1.

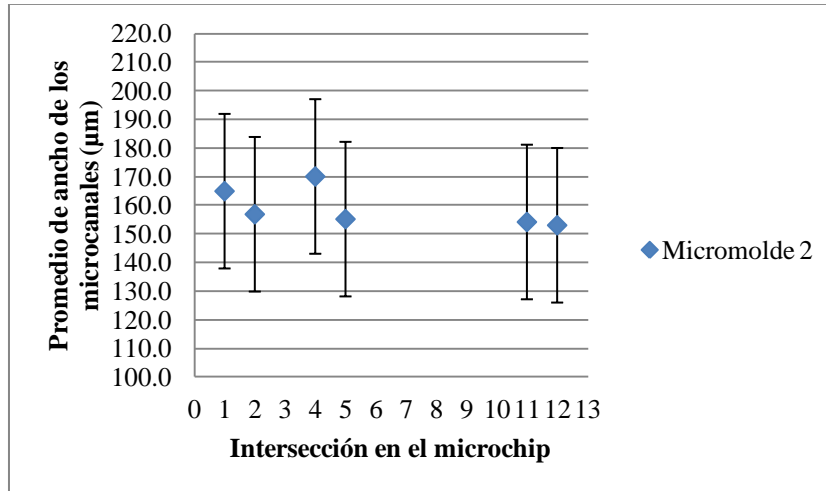


Figura 40. El promedio de tres mediciones de los anchos en 5 distintas intersecciones de los microcanales de 3 distintos microchips del micromolde 2.

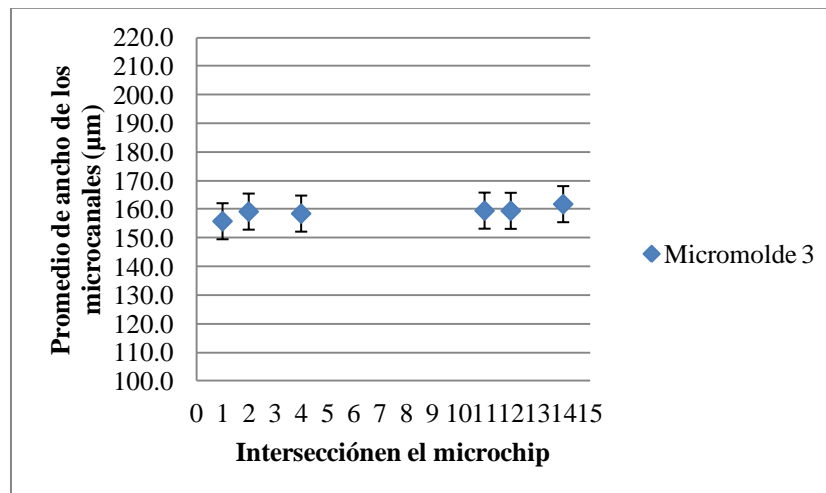


Figura 41. El promedio de tres mediciones de los anchos en 5 distintas intersecciones de los microcanales de 3 distintos microchips del micromolde 3.

4.1.2 MEDIDAS DE LOS MICROCANALES OPTIMIZADOS

Las medidas del micromolde fabricado, optimizado y utilizado en los experimentos llevados a cabo en este proyecto, se resumen en la tabla 6.

Las consideraciones previas a la fabricación del micromolde para evitar el desprendimiento de resina de la oblea de silicio, así como homogeneidad en la altura de los microcanales se citan a continuación:

*Antes de utilizar la oblea de silicio se tuvo que hacer un calentamiento para eliminar todo resto de humedad que pudiera tener, esto se consigue calentando la oblea a 200°C por 5 minutos y posteriormente se dejó enfriar a 70°C por 10 minutos.

** La irradiación de los rayos UV a la resina con la máscara se hizo por partes, es decir, se cubrió con un trozo de cartón uno de los relieves y mientras el resto se irradió con rayos UV, posteriormente se cubrió la parte irradiada con anterioridad y se irradió la zona aun no irradiada.

Tabla 6. Promedio de las alturas y de los anchos del microchip hecho con el micromolde #3 en 6 distintas intersecciones

Micromolde #3	Intersección 1	Intersección 2	Intersección 4	Intersección 5	Intersección 11	Intersección 12
Promedio de altura (µm)	110.0 ± 4.7	113.8 ± 2.7	111.7 ± 2.3	109.6 ± 1.5	110.4 ± 2.9	107.0 ± 2.3
Promedio de ancho (µm)	155.7 ± 5.0	159.1 ± 5.6	158.4 ± 4.5	174.3 ± 2.8	159.4 ± 1.3	159.3 ± 7.1

4.2 FORMACIÓN DE MICROGOTAS

Formación de microgotas en microchips

La formación de microgotas dentro de un microchip se lleva a cabo cuando una fracción de fase acuosa viaja dentro de una fase orgánica móvil, esto se logra mediante el corte repetido de la fase acuosa por una fase orgánica Figura 42. Dentro del sistema de microgotas, cada una de ellas es considerada un reactor independiente en el cual pueden llevarse a cabo reacciones químicas de forma aislada, sin dispersión y sin contaminación.

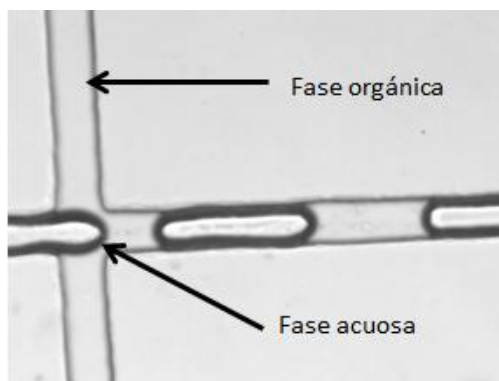


Figura 42. Formación de microgotas dentro de microchip.

4.2.1 FORMACIÓN DE MICROGOTAS A DISTINTOS FLUJOS

El montaje experimental para la formación de microgotas y de los experimentos llevados a cabo en este proyecto se muestra en la Figura 43.

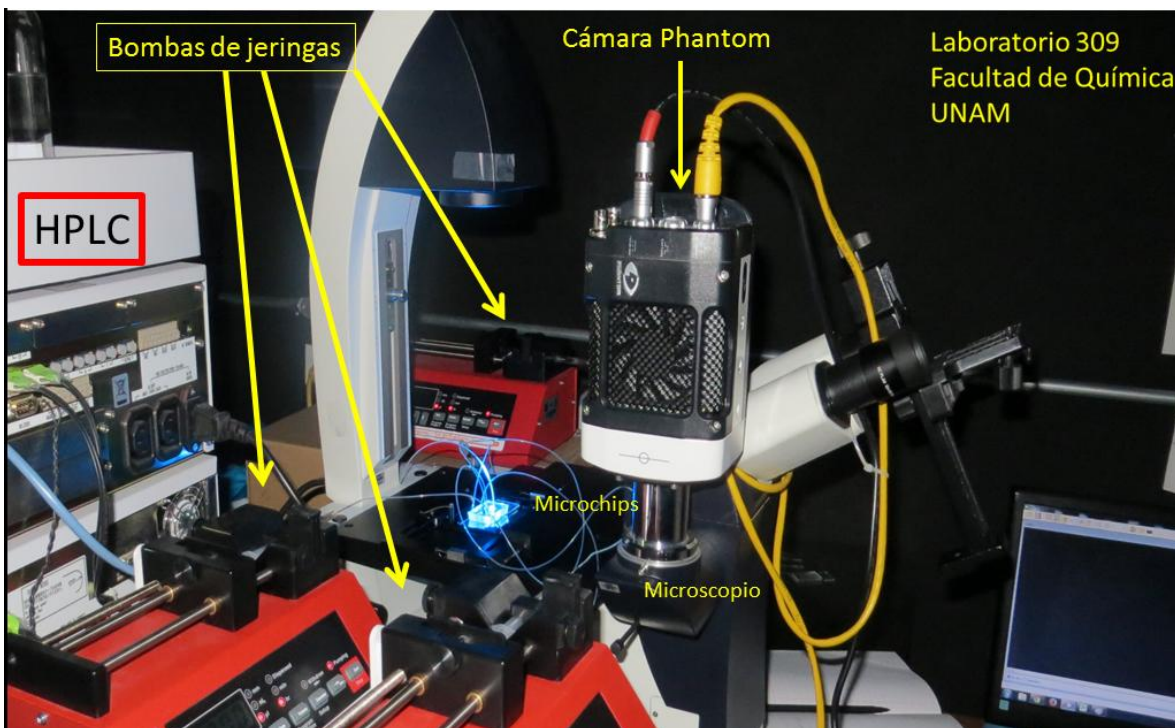


Figura 43. Montaje experimental de microchips de microfluídica.

La variación de los flujos del agua y el aceite (fases acuosa y orgánica) modificaron tanto la frecuencia como el tamaño de las microgotas, a partir de la proporción de fase acuosa con fase orgánica 1:1 se produjeron gotas muy estables y constantes.

Entre mayor fue la proporción de fase orgánica respecto a la acuosa, mayor fue la distancia entre las microgotas; si la proporción entre las dos fases era menor, el tamaño de las microgotas fue menor, esto se ilustra en la Figura 44.

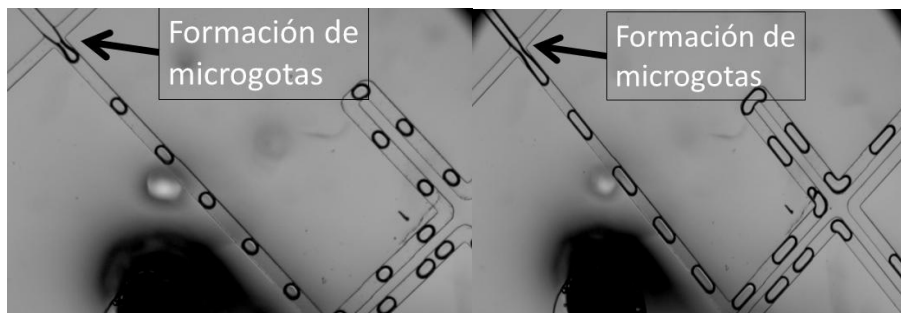


Figura 44. a) Formación de microgotas pequeñas con menor frecuencia. Proporción entre fase orgánica y acuosa de 6:1. B) Formación de microgotas más grandes. Proporción entre fase orgánica y acuosa de 1:1.

Los flujos utilizados para la formación de microgotas en los experimentos de la sección 4.2.1 donde la proporción de las fases (orgánica y acuosa) es 1:1 son:

Tabla 7. Flujos utilizados en la formación de microgotas

Flujos	Agua	Aceite mineral + 0.1% m/m Span 80
	50 $\mu\text{L/hr}$	50 $\mu\text{L/hr}$
Volumen de la jeringa utilizada (mL)	1	1

4.2.2 FORMACIÓN DE MICROGOTAS CON BUFFER DE FOSFATOS COMO FASE ACUOSA

Para realizar ensayos enzimáticos se hicieron pruebas de estabilidad de microgotas con distintos buffers de fosfatos 100 mM (pH 7.5, 1 mM MgCl_2) en la fase acuosa. La formación constante, aislada de la fase orgánica y repetida de las microgotas por el tiempo que duraron los experimentos enzimáticos garantiza que esta técnica sea factible para los objetivos propuestos. Para esto, se hicieron pruebas de estabilidad de microgotas a distintas condiciones y concentraciones, las cuales son:

-Uso de buffer sólo de fosfatos 100 mM (pH 7.5, 1 mM MgCl_2).

-El uso de albúmina de suero bovina ABS para estabilizar a la enzima (BSA por sus siglas en inglés) (Aldrich) en concentraciones de 0, 0.5, 1 y 2 mg/mL Ver apéndice A.

- Uso de DTT en el buffer de fosfatos para prevenir enlaces inter e intramoleculares en la enzima en concentración de 4.39 mg/mL de acuerdo a lo reportado en [20].

4.2.2.1 Buffer de fosfatos 100mM, pH 7.5, 1 mM MgCl₂.

De las pruebas hechas para estabilización de microgotas con el buffer de fosfatos 100 mM pH 7.5, 1 mM MgCl₂, se concluyó que el buffer sin DTT y sin ABS sería utilizado para los ensayos enzimáticos debido a los resultados obtenidos con el uso de DTT y ABS (ver más adelante).

4.2.3 FORMACIÓN DE MICROGOTAS EN MICROCHIP DE FRACTALES ACOPLADO AL INSTRUMENTO HPLC

El arreglo experimental para la formación de microgotas con la adaptación al instrumento HPLC se muestra en la Figura 45. En este microchip se incluye una purga en las conexiones del microchip. La purga es necesaria para el correcto funcionamiento del microchip y la satisfactoria formación de microgotas dentro de él; esto es debido a que el flujo proveniente del instrumento HPLC es de miles de microlitros por hora y en el microchip se usan flujos de decenas de microlitros por hora. También puede considerarse un acoplamiento del microchip con un sistema nano HPLC, pero el uso de un sistema nano HPLC incrementaría los costos de operación y mantenimiento.

En este experimento de formación de microgotas la proporción de disolventes provenientes de HPLC es de 100% H₂O y 0% MeOH, esto para acoplar la purga en el microchip y dar una satisfactoria formación de microgotas. Se intentó que las condiciones de estabilidad de las microgotas fueran de un flujo parecido (decenas de microlitros por hora) al usado en los ensayos enzimáticos tanto en el diseño de serpentín como en el diseño de fractales.

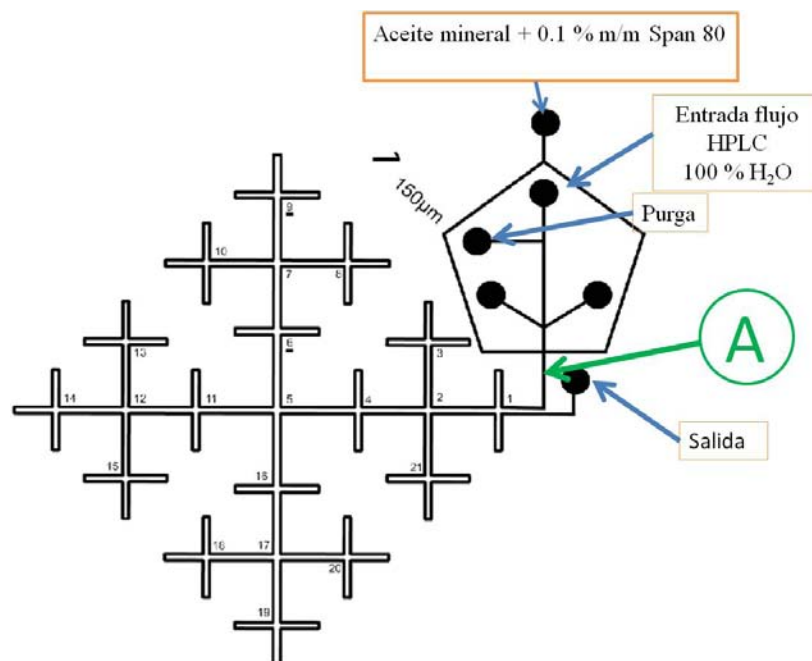


Figura 45. Esquema experimental de la formación de microgotas en microchip de microfluídica adaptado al instrumento HPLC. En el punto A se monitoreó la formación de microgotas.

El flujo proveniente del instrumento HPLC (100 % H₂O) es de 6000 μL/hr, pero se requería que el flujo que pasara a la formación de microgotas fuera de 30 μL/hr. Se probaron distintos flujos de purga con el fin de establecer cuál era el mejor flujo de purga para obtener el flujo requerido para los ensayos enzimáticos y la formación de microgotas.

El cálculo del flujo proveniente del instrumento HPLC para la formación de microgotas se hizo con el software PCC 2.2. El flujo calculado se hace en el punto A (Figura 45) justo en la intersección donde se forman las microgotas, el software PCC 2.2 calcula la velocidad de la gota en el video y mediante la relación del volumen de la gota y la velocidad de ésta, se calcula el flujo de gotas, a este flujo se le suma el flujo de la fase orgánica para obtener el total de flujo.

Los flujos totales obtenidos del instrumento HPLC después de pasar por el canal de purga, así como el flujo de purga usado se resumen en la Figura 46.

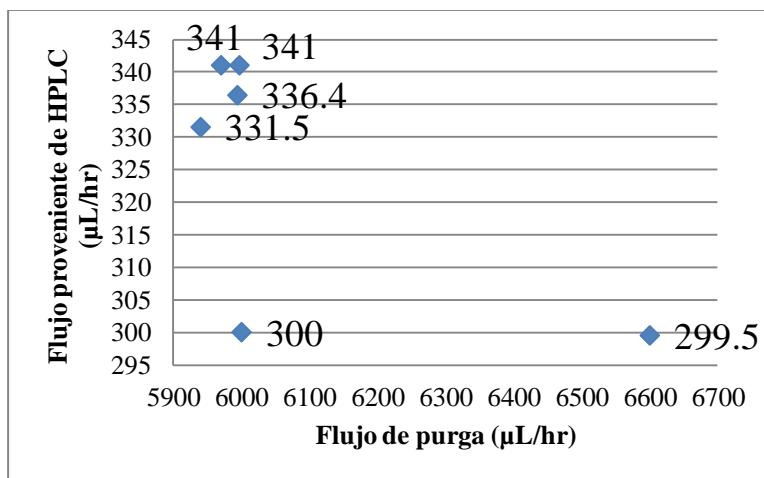


Figura 46. Flujos totales obtenidos del instrumento HPLC después de pasar por el microcanal de purga.

De la Figura anterior, se observa que la mayoría de los flujos finales se encuentran entre 330-340 µL/hr. Éstos resultados son debido a las limitaciones técnicas de la bomba de jeringa que se usó para la purga. A flujos de purga mayores a 6600 µL/hr no hay formación de microgotas porque todo el flujo proveniente del instrumento HPLC se va por el microcanal de purga. El flujo de purga utilizado estuvo en el intervalo para los experimentos estuvo entre 5900-5940 µL/hr.

Se hicieron pruebas de formación y estabilización de microgotas modificando varios factores como la cantidad de surfactante en la fase orgánica (Span 80 al 0.1% m/m y al 1% m/m en aceite mineral), la composición del buffer de fosfatos (Con albumina de suero bobina al 0.5, 1 y 2 mg/mL de buffer, además del uso de DTT a 4.39mg/mL de buffer), el porcentaje de MeOH proveniente del instrumento HPLC y el usos de aceites fluorados como fase orgánica y el recubrimiento de los microcanales con el polímero Aquapel. Los resultados se que se exponen en los apéndices A, B, C y D respectivamente.

Las condiciones ideales para la formación y estabilización de microgotas son:

- Cantidad de surfactante en la fase orgánica, Span 80 al 0.1 % m/m en el aceite mineral.
- Uso de buffer de fosfatos 100 mM pH 7.5, 1 mM MgCl₂ sin DTT y sin ABS (albumina de suero bovina).

-La formación y estabilización de microgotas no se ve afectada por la concentración de MeOH (0-85 %) a la que se trabajó en este proyecto.

-No usar aceites fluorados como fase orgánica ni recubrir los microcanales con el polímero Aquapel.

4.3 INSTRUMENTACIÓN FOTOGRÁFICA

4.3.1 CONFIGURACIÓN DE LA CÁMARA PHANTOM

Las pruebas para establecer la configuración óptima de la cámara Phantom consistieron en variar la velocidad de captura y el tiempo de exposición de la cámara en una curva de calibración de fluoresceína desde 0.5 - 30 μM , este intervalo de concentración se consideró porque es la concentración máxima que se esperaba por parte de producto de la hidrólisis de FDG. También con este mismo experimento se estableció la configuración para el mínimo de detección a una concentración de fluoresceína de 0.5 μM .

Después de varias pruebas en el laboratorio, se optimizó la configuración de la cámara Phantom para poder hacer una correcta lectura de la fluorescencia en cada microgota. La configuración de la cámara Phantom son Intervalo de apertura 24 pps μs , Tiempo de exposición 3000.04 μs y Disparador a 660 722. 79 μs . Figura 47.

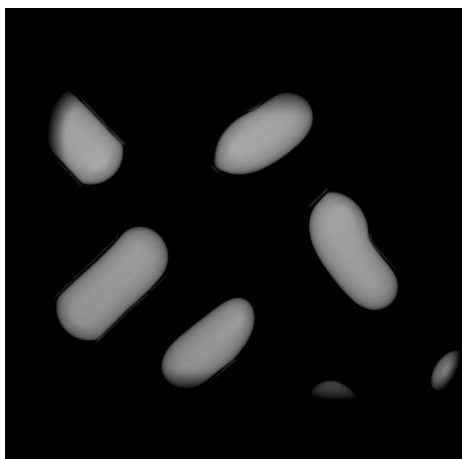


Figura 47. Gotas de fluoresceína a 30 μM . Imagen tomada con la configuración óptima de la cámara de la cámara Phantom, captura de 24 pps , Tiempo de exposición 3000.04 μs .

Se tuvo que hacer uso de la cámara Phantom en vez de la cámara digital, puesto que se presentó el problema de que las imágenes tomadas con la cámara digital no tenían la misma intensidad, incluso bajo las mismas condiciones. Esto se debió a que el portacámara que se monta en el microscopio de luz UV es externo y por ende el acomodo rara vez se pudo hacer de la misma manera.

La cámara Phantom se puede montar de forma reproducible en el microscopio porque éste tiene una entrada para montar cámaras como ésta al microscopio.

4.4 CURVAS PATRÓN DE FLUORESCEÍNA

4.4.1 CURVA PATRÓN DE FLUORESCEÍNA EN MICROCHIPS CON DISEÑO DE SERPENTÍN

Se elaboró una curva patrón de fluoresceína en intervalo de concentraciones de 0-30 μM . Las soluciones de fluoresceína para la curva de calibración son hechas en el mismo buffer de fosfatos que se usó para el ensayo enzimático. La configuración de la cámara digital: ISO 100, S = 1/20 s, f= 3.5, sin Zoom, medidor de luz: Ponderado central, balance de blancos: Tungsteno. Microscopio: Objetivo del microscopio 10x, 100% intensidad, 4to. cuadro de enfoque. Lámpara UV: 100% transmitancia.

Las imágenes de las microgotas formadas fueron tomadas en el punto señalado en la Figura 48. Una vez tomadas las imágenes, se utiliza el software Image J para obtener la intensidad y con ello hacer la curva de calibración.

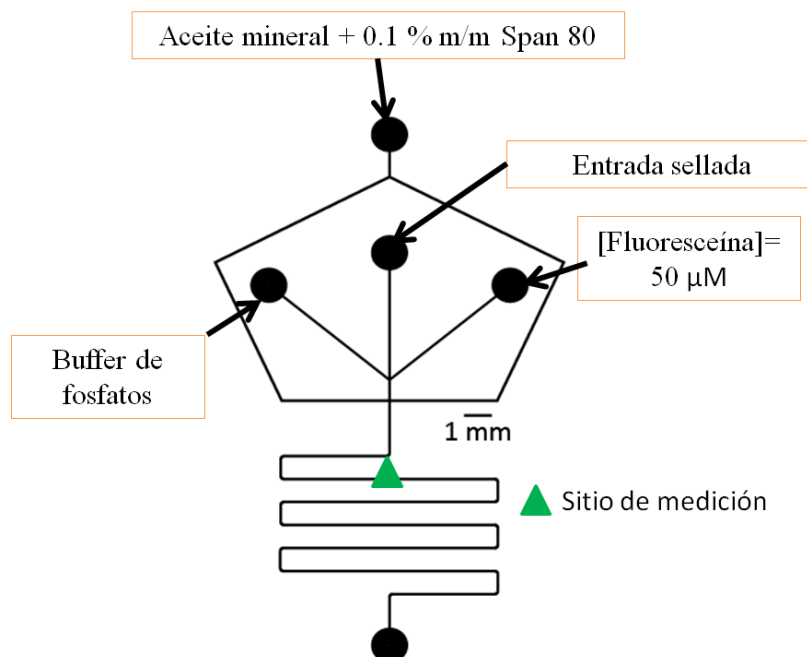


Figura 48. Sitio de medición para la elaboración de la curva de calibración de una solución de fluoresceína 0-30 μM en buffer de fosfatos a una concentración 100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de MgCl_2 .

El flujo total fue de 100 $\mu\text{L/hr}$ durante la elaboración de la curva. Los flujos utilizados en la elaboración de la curva, así como la curva de calibración obtenida se resumen en la tabla 8 y en la Figura 50.

Tabla 8. Flujos utilizados para la curva de calibración de 0-30 μM

[Flu] 50 μM	Flujos $\mu\text{L/hr}$			[Fluoresceína] resultante μM
	Buffer de fosfatos	Aceite mineral + 0.1% m/m Span 80	*Mean	
30	20	50	123.691	30
25	25	50	104.149	25
20	30	50	103.406	20
15	35	50	83.919	15
10	40	50	56.837	10
5	45	50	47.701	5
0	50	50	0.018	0

*Intensidad de fluorescencia detectada por el software Image J

Se muestra la secuencia de imágenes en las que se ve la disminución de la intensidad de fluorescencia debido a la disminución de la concentración de fluoresceína.

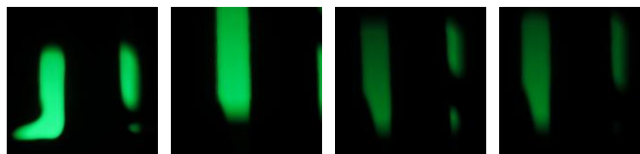


Figura 49. Secuencia de imágenes que muestra cómo va disminuyendo la intensidad de fluorescencia a medidas que disminuye la concentración de fluoresceína. Disminución de izquierda a derecha 30, 20, 10 y 5 μM . La configuración de la cámara: ISO 100, S =1/20 s, f= 3.5, sin Zoom, medidor de luz: Ponderado central, balance de blancos: Tungsteno. Microscopio: Objetivo 10x, 100% intensidad, 4to. cuadro de enfoque. Lámpara UV: 100% transmitancia.

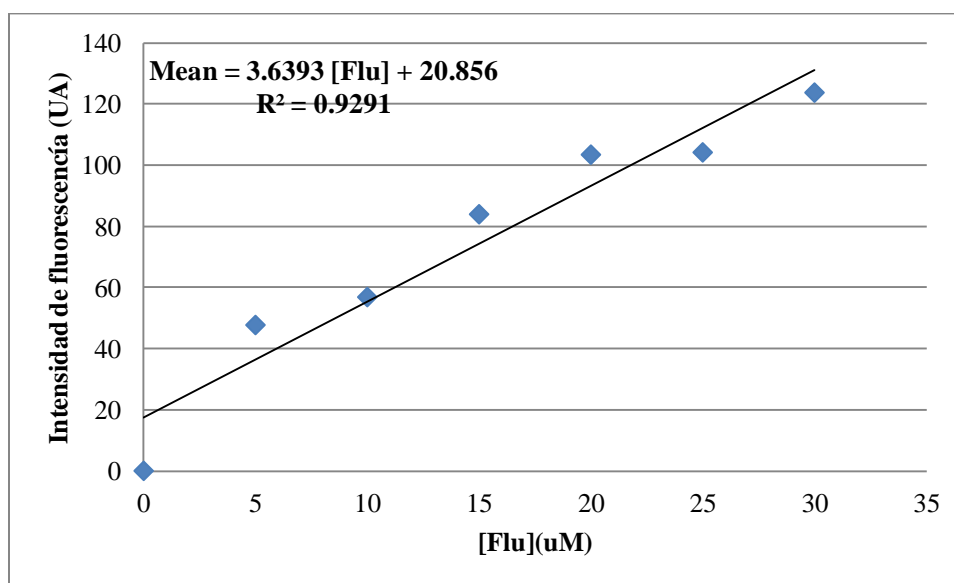


Figura 50. Curva de calibración de fluoresceína buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de MgCl_2) obtenida de los datos de las imágenes de microgotas en microchips, [Flu] 0-30 μM en buffer de fosfatos, sin BSA, S =1/20 s, f= 3.5, ISO 100, flujo total= 100 $\mu\text{L/h}$.

La ecuación de la curva de calibración que relaciona la concentración de fluoresceína con la intensidad de fluorescencia se obtuvo después del análisis digital, dando como resultado:

$$\text{Mean} = 3.6393 [\text{Flu}] + 20.856$$

$$R^2 = 0.9291$$

Esta ecuación fue utilizada para posteriores análisis enzimáticos.

La determinación de la configuración óptima de la cámara digital HD y las pruebas hechas para la determinación se exponen en el apéndice F.

4.4.2 CURVA DE PATRÓN DE FLUORESCÉINA EN MICROCHIP DISEÑO DE FRACTALES

Se elaboró una curva patrón de fluoresceína en el microchip con diseño de fractales en un intervalo de concentraciones de 0-30 μM . Las soluciones de fluoresceína para la curva de calibración son hechas en el mismo buffer de fosfatos que se usó para el ensayo enzimático. La configuración de la cámara digital: ISO 100, S = 1/20 s, f = 3.5, sin Zoom, medidor de luz: Ponderado central, balance de blancos: Tungsteno. Microscopio: Objetivo 10x, 100% intensidad, 4to. cuadro de enfoque. Lámpara UV: 100% transmitancia.

Las imágenes de las microgotas formadas fueron tomadas en el punto señalado en la Figura 51. Una vez tomadas las imágenes, se utiliza el software Image J para obtener la intensidad y con ello hacer la curva de calibración. Se obtuvieron en la imagen al menos la intensidad de 3 microgotas (Figura 52), de las cuales se mide la intensidad y se promedia para obtener la intensidad de fluorescencia promedio.

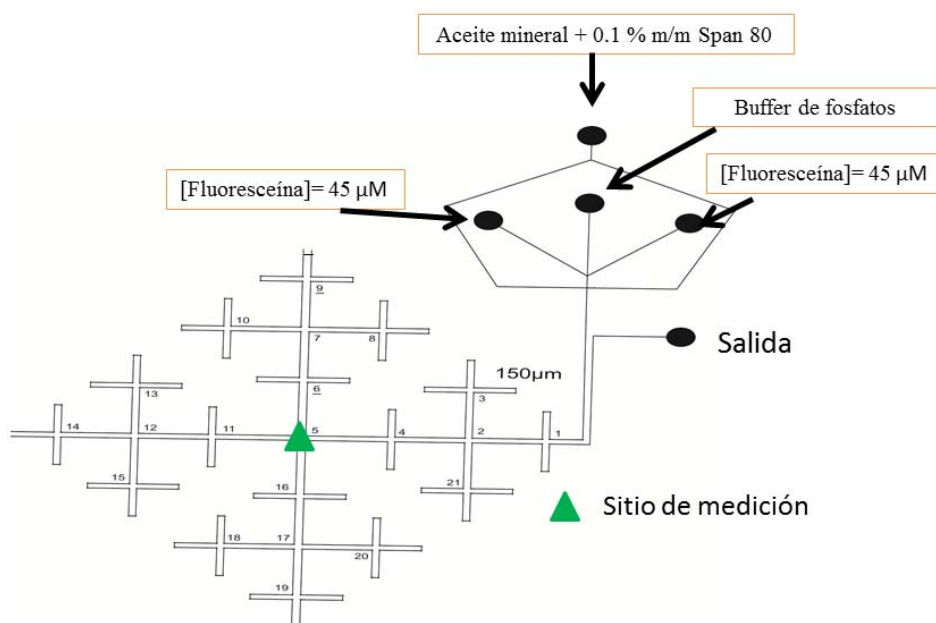


Figura 51. Sitio de medición para la elaboración de la curva de calibración 0-30 μM .

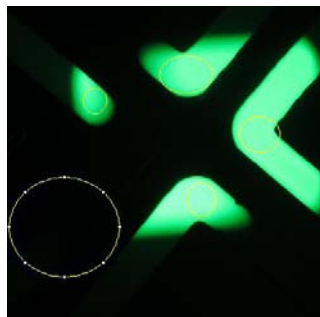


Figura 52. Medición de intensidad en microgotas, al menos se tenían 3 microgotas por imagen.

El flujo total fue de 150 $\mu\text{L/hr}$ durante la elaboración de la curva. Los flujos utilizados en la elaboración de la curva, así como la curva de calibración obtenida se resumen en la tabla 9 y en la Figura 54.

Tabla 9. Flujos utilizados para la curva de calibración de 0-30 μM

Flujos $\mu\text{L/hr}$					
Jeringa 1	Jeringa 2	Jeringa 3	Jeringa 4	*Mean promedio	[Flu] en microgotas μM
[Flu] 45 μM	[Flu] 45 μM	Buffer de fosfatos	Aceite mineral + 0.1% m/m Span 80		
25	25	25	75	243	30
20.8	20.8	33.4	75	228	25
16.6	16.6	41.8	75	217	20
12.5	12.5	50	75	167	15
8.3	8.3	58.4	75	139	10
4.1	4.1	66.8	75	91.	5
0	0	75	75	0	0

*Intensidad de fluorescencia detectada por el software Image J

Se muestra la secuencia de imágenes en las que se ve la disminución de la intensidad de fluorescencia debido a la disminución de la concentración de fluoresceína.



Figura 53. Secuencia de imágenes que muestra cómo va disminuyendo la intensidad de fluorescencia a medidas que disminuye la concentración de fluoresceína. Disminución de izquierda a derecha 30, 25, 15 y 5 μM . Configuración de la cámara: ISO 100, S =1/20 s, f= 3.5, sin Zoom, medidor de luz: Ponderado central, balance de blancos: Tungsteno. Microscopio: Objetivo 10x, 100% intensidad, 4to. cuadro de enfoque. Lámpara UV: 100% transmitancia.

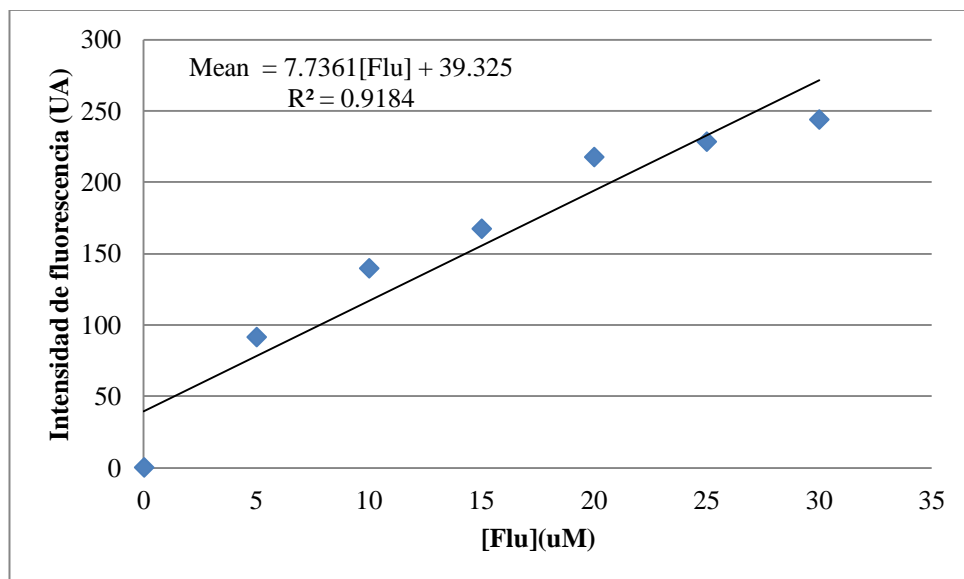


Figura 54. Curva de calibración de fluoresceína en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de MgCl_2) obtenida de los datos de las imágenes de microgotas en microchips. [Flu] 0-30 μM en buffer de fosfatos, sin BSA, S =1/20 s, f= 3.5, ISO 100, flujo total= 150 $\mu\text{L/h}$.

La ecuación de la curva de calibración que relaciona la concentración de fluoresceína con la intensidad de fluorescencia se obtuvo después del análisis digital, dando como resultado:

$$\text{Mean} = 7.7361[\text{Flu}] + 39.325$$

$$R^2 = 0.9184$$

Esta ecuación fue utilizada para posteriores análisis enzimáticos. De aquí se concluye que es satisfactorio realizar curvas de calibración de fluoresceína en microchips de microfluídica con diseño de fractales desde 0- 30 μM . La comparación de las curvas de calibración hechas en los distintos microchips, no es equiparable porque ambos diseños difieren del tiempo de residencia, lo que repercute en una pérdida de fluorescencia por extracción a fase orgánica mayor a mayor tiempo de residencia.

4.4.3 COMPORTAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA A DISTINTOS PORCENTAJES DE METANOL

Dentro de las pruebas necesarias para establecer que el sistema de adaptación microchip-instrumento HPLC es factible, está el de establecer el comportamiento de la fluorescencia por la presencia de MeOH. Se evaluó el comportamiento de la fluorescencia a distintos porcentajes de MeOH provenientes del HPLC, el montaje experimental del microchip con diseño de fractales adaptado a instrumento HPLC se muestra en la Figura 55. Los porcentajes de MeOH provenientes del instrumento HPLC probados va desde 50% MeOH, sube hasta el 85% y vuelve a bajar a 50% MeOH.

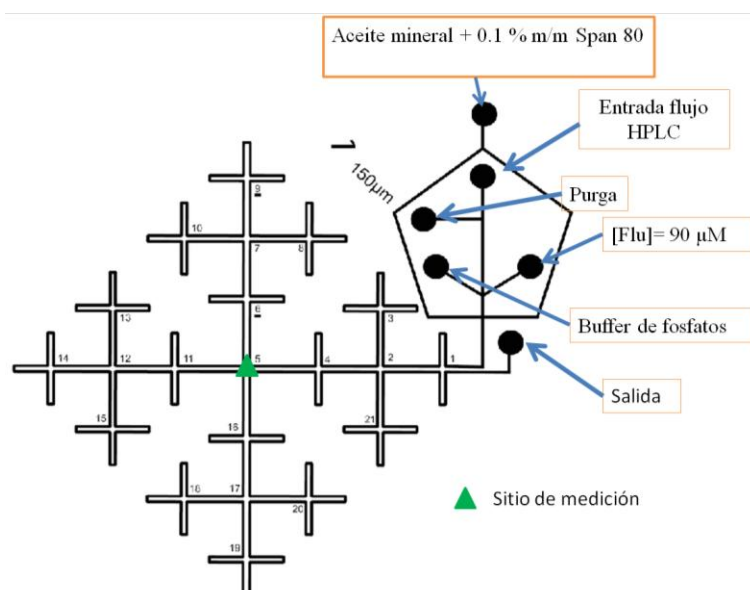


Figura 55. Montaje experimental del microchip con diseño de fractales acoplado a un instrumento HPLC para evaluar el comportamiento de la fluorescencia a distintos porcentajes de MeOH.

La medición de la intensidad de la fluorescencia se hizo en la intersección 5 del diseño de fractales marcada en la Figura 55.

El MeOH proveniente del instrumento HPLC al pasar por el lugar del microcanal donde converge con las dos entradas de fase acuosa, disminuye su porcentaje de concentración a 1/3 del original. Esto se debe a que las fases acuosas lo diluyen y cuando entra en la microgota, el porcentaje ya es 1/3 del original. Por ejemplo, si del instrumento HPLC se tiene un porcentaje de MeOH de 60%, en la parte del

microchip donde se juntan los tres flujos (HPLC y las dos fases acuosas) toda la concentración se divide en 3, dando para este ejemplo un 20% de MeOH resultante.

Se dejó correr el programa de elución del inhibidor (sin inyectar inhibidor aún) y se monitoreó el comportamiento de la fluorescencia conforme se daba el programa. Los flujos usados en el experimento se resumen en la tabla 10. Los resultados del monitoreo de la fluoresceína se resumen en la Figura 56.

Tabla 10. Flujos utilizados a lo largo del programa de elución

Flujos	Purga	Instrumento HPLC	[Flu] = 90 μM	Buffer de fosfatos	Aceite mineral + 0.1% m/m Span 80
	5940 $\mu\text{L/hr}$	6000 $\mu\text{L/hr}$	20 $\mu\text{L/hr}$	20 $\mu\text{L/hr}$	130 $\mu\text{L/hr}$
Volumen de la jeringa Usada (mL)	-	-	1	1	3

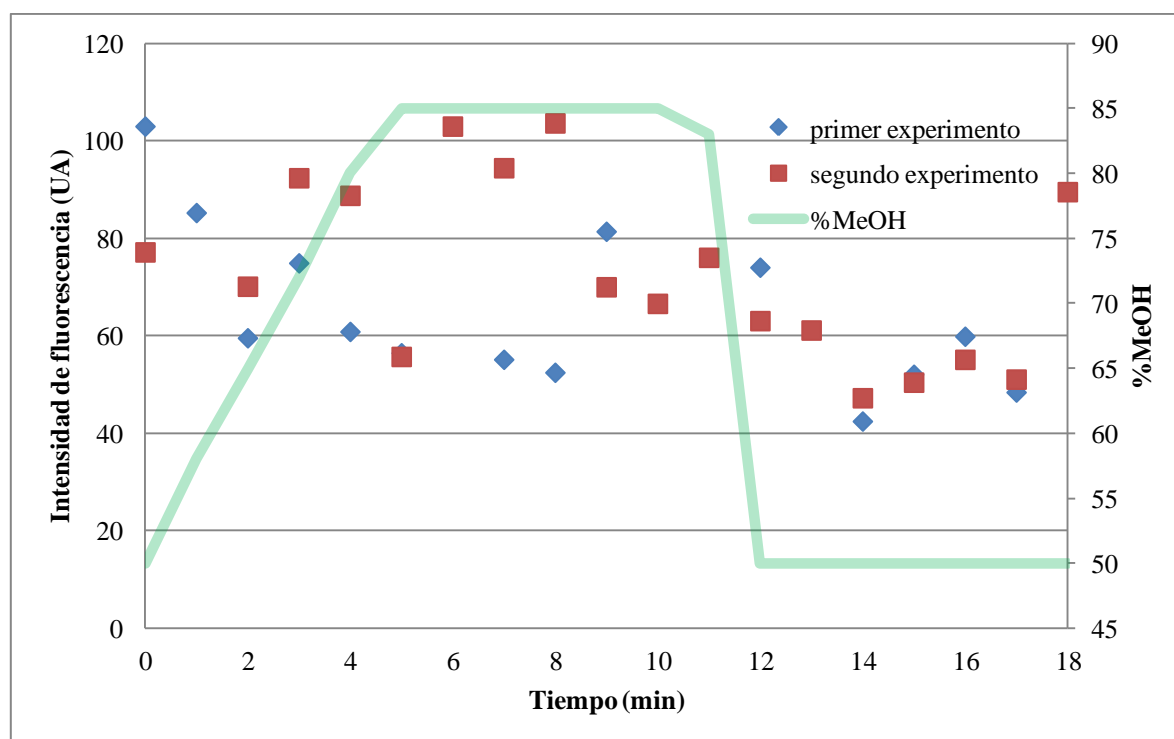


Figura 56. Promedio de la intensidad de la fluorescencia de 4 gotas con fluoresceína durante el programa de elución del HPLC que se empleó con el inhibidor enzimático.

De los resultados del comportamiento de la fluorescencia lo largo del programa de inyección, se observa una variación en la intensidad de la fluorescencia que oscila entre 40 y 100 UA . Esto se debe a la inconsistencia de los flujos proveniente de las bombas para jeringas (buffer y fluoresceína) porque al ser flujos muy bajos, no hay una estabilización permanente del sistema ya que el flujo que proviene del HPLC es en promedio 3 veces más grande que el flujo proveniente de las bombas de jeringas.

4.5 ENSAYOS ENZIMÁTICOS DE β -D-GALACTOSIDASA + FDG (FLUORESCEIN-DI-B-D-GALACTOPIRANOSIDO)

4.5.1 ENSAYO ENZIMÁTICO DE β -D-GALACTOSIDASA + FDG EN MICROCHIP CON DISEÑO DE SERPENTÍN

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del sustrato FDG con la enzima β -D-Galactosidasa dentro del microchip con diseño de serpentín de acuerdo a la Figura 25. Se hicieron diferentes experimentos en los cuales se varió la concentración inicial del sustrato en las microgotas desde 2.5-30 μ M, esto se hizo variando los flujos de las jeringas con el buffer y con el sustrato para mantener un flujo de fase acuosa total constante. Tanto las soluciones iniciales de sustrato (90 μ M) y enzima (300 U/mL) se preparan frescas para los experimentos. Los flujos usados en el experimento se resumen en la tabla 11. Durante el experimento se tomaron imágenes a las microgotas en distintos puntos de los microcanales (señalados como triángulos en la Figura 57). La configuración de la cámara digital son: ISO 100, S =1/20 s, f= 3.5, sin Zoom, medidor de luz: Ponderado central, balance de blancos: Tungsteno. Microscopio: Objetivo 10x, 100% intensidad, 4to. cuadro de enfoque. Lámpara UV: 100% transmitancia.

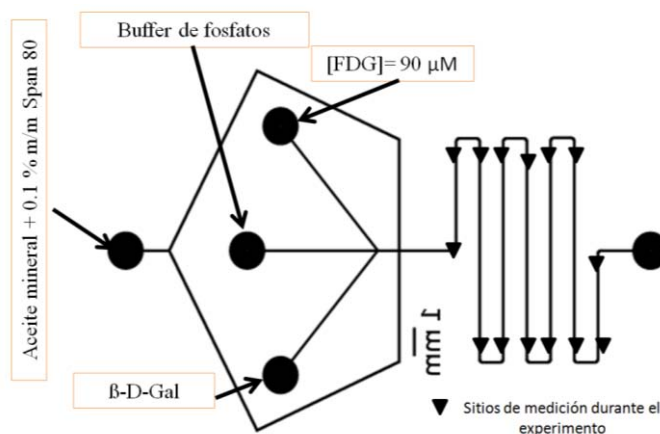


Figura 57. Sitios de medición considerados durante el experimento.

Para obtener la concentración de producto (fluoresceína) obtenida a cada concentración de sustrato (FDG), se convirtieron los valores de intensidad de fluorescencia de las imágenes de las microgotas dentro del microchip con la curva de calibración elaborada con anterioridad. En la Figura 58 se observa un incremento de fluorescencia y por ende de producto a medida que va recorriendo la microgota el microcanal.

Tabla 11. Flujos utilizados en el ensayo enzimático hecho en microchip con diseño de serpentin

	Flujos $\mu\text{L/hr}$					
	Aceite mineral + 0.1% m/m Span 80	[FDG] 90 μM	[β -Gal] 300 U/mL	Buffer de fosfatos	[Fluoresceína] máxima como producto μM	*[Fluoresceína] producto al final del microcanal μM
	50	16.7	16.7	16.7	30	16.4
	50	13.8	16.7	19.6	25	13.8
	50	11.1	16.7	22.3	20	12.5
	50	8.3	16.7	25.1	15	9.6
	50	5.5	16.7	27.9	10	7.3
	50	2.7	16.7	30.7	5	4.7
	50	1.4	16.7	32	2.5	1.5
Volumen de las jeringas usadas (mL)	3	1	1	1		

- Concentración de fluoresceína al final del microcanal

De las concentraciones de fluoresceína calculadas se obtiene cerca de 50% del producto esperado, esto es porque la reacción no se lleva a cabo por completo en el tiempo que tardan las gotas en recorrer toda la extensión del microcanal, dando valores de concentración menores a las esperadas.

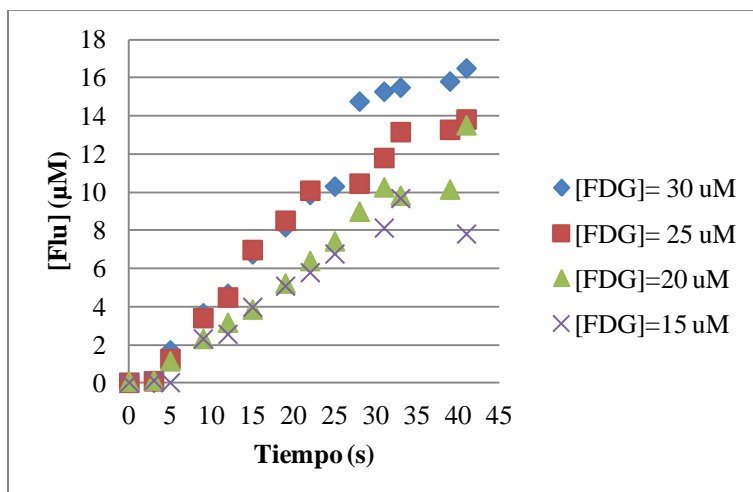


Figura 58. Monitoreo de la reacción de hidrólisis de FDG con β -D-Galactosidasa en microgotas en microchips a lo largo del microcanal. Cada dato corresponde a la concentración de fluoresceína en la microgotas a distintos tiempos (puntos señalados como triángulos en la Figura 57). Ensayo enzimático en microchip con diseño de serpentín [FDG]= 30 μ M, [β -Gal] 100 U/mL. ISO 100, S = 1/20 s, f = 3.5 Flujo total 100 μ L/h.

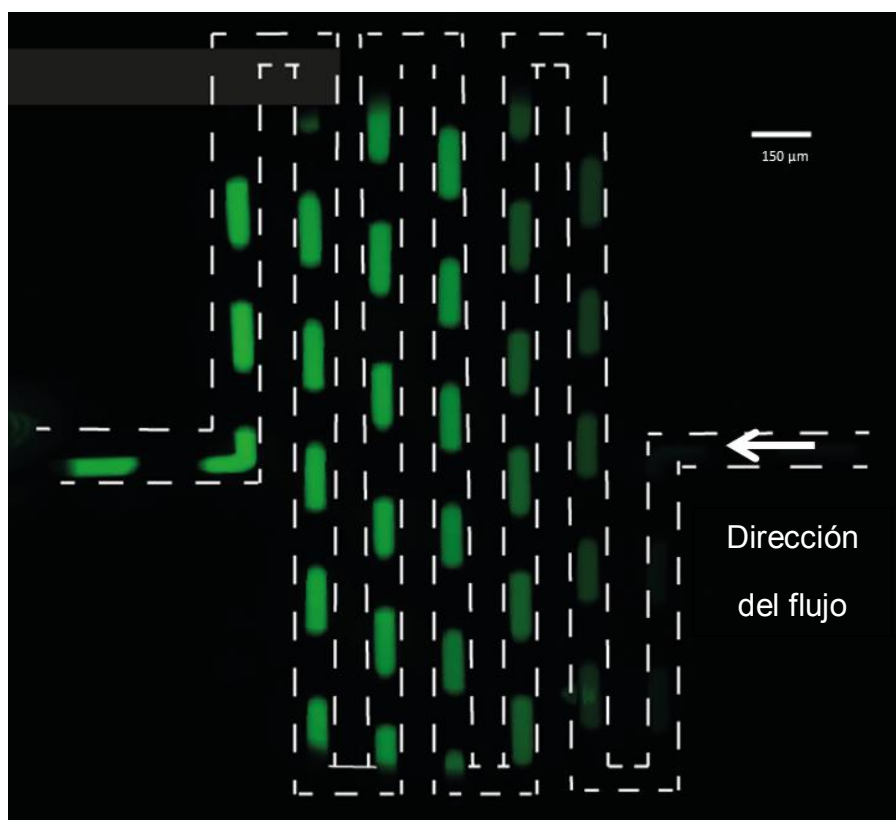


Figura 59. Imagen panorámica del ensayo enzimático en el serpentín. Se puede observar que la intensidad de las microgotas aumenta conforme van recorriendo el microcanal, lo que indica el avance de la reacción enzimática. La configuración de la cámara digital es: ISO 100, S = 1/20, f = 3.5, 100% intensidad, 6to. cuadro de enfoque. Lámpara UV: 100% transmitancia.

4.5.2 ENSAYO ENZIMÁTICO DE β -D-GALACTOSIDASA + FDG EN MICROCHIP CON DISEÑO DE FRACTALES

Se llevó a cabo el ensayo enzimático dentro del microchip con diseño de fractales de acuerdo a la Figura 26. Se varió la concentración del sustrato en las microgotas desde 15-30 μ M, variando el flujo de las jeringas con el buffer y el sustrato para mantener un flujo de fase acuosa total constante. Tanto las soluciones iniciales de sustrato (90 μ M) y enzima (75 U/mL) se preparan frescas para los experimentos. El flujo total de reactivos y fase orgánica en el experimento es de 150 μ L/hr, 75 μ L/hr para la fase orgánica y 75 μ L/hr para el total de fase acuosa. Durante el experimento se tomaron imágenes de las microgotas en distintos puntos de los microcanales (señalados en la Figura 60). La configuración de la cámara Phantom son: Intervalo de apertura 10000 μ s, Tiempo de exposición 3000.04 μ s y Disparador a 660 722. 79 μ s. Microscopio: Objetivo 10x, 100% intensidad, 4to. cuadro de enfoque. Lámpara UV: 100% transmitancia.

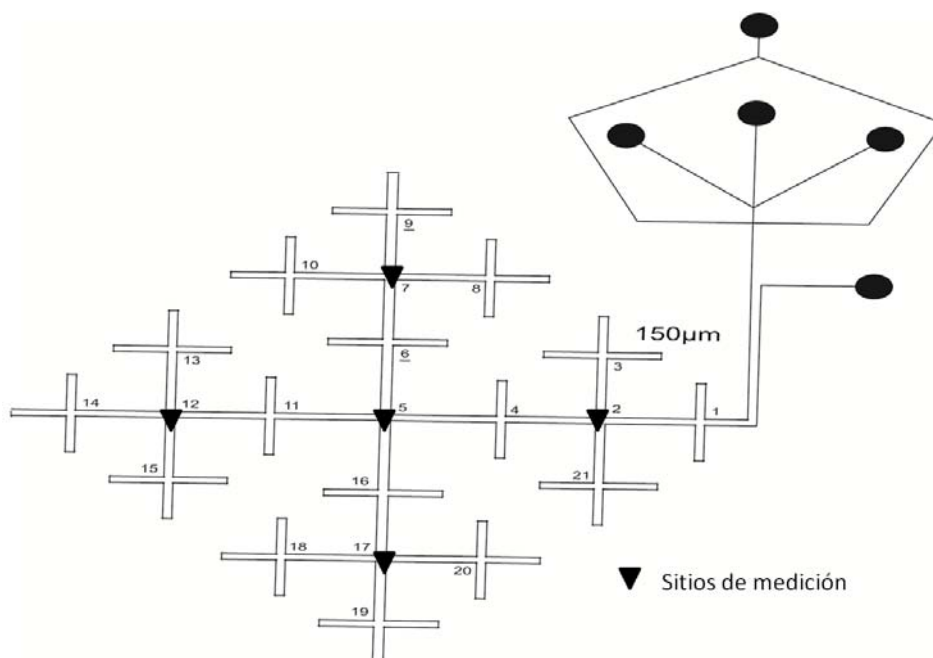


Figura 60. Sitios de medición considerados durante el experimento.

Las imágenes tomadas de las microgotas en este experimento se trataron de igual forma que en el caso anterior (chip de serpentín), y el resultado del tratamiento de los datos obtenidos se muestra en la tabla 12 y en la Figura 61.

Tabla 12. Flujos utilizados el ensayo enzimático hecho en microchip con diseño de fractales

	Flujos $\mu\text{L/hr}$					
	Aceite mineral + 0.1% m/m Span 80	[FDG] 90 μM	$[\beta\text{-Gal}] = 75 \text{ U/mL}$ (25 U/mL en microgota)	Buffer de fosfatos	[Fluoresceína] máxima como producto μM	*[Fluoresceína] Producto al final del microcanal μM
	75	25	25	25	30	32.6
	75	20.8	25	29.2	25	28.4
	75	16.6	25	33.4	20	24.6
Volumen de la jeringa usada (mL)	3	1	1	1	-	-

*Concentración de fluoresceína al final del microcanal

De las concentraciones de fluoresceína obtenidas, se obtienen concentraciones mayores al 100 % del producto esperado, esto es porque la concentración real del sustrato era mayor a la calculada o hubo variación en los flujos, haciendo que el valor de la concentración de fluoresceína esperada fuera mayor. La pérdida de fluorescencia al final del microcanal no se consideró apreciable, por lo que la medición se llevó a cabo en ese sitio. La ventaja del diseño de fractales es que permite mayor tiempo de residencia por eso se puede usar menor concentración de enzima para llevar a cabo la reacción (25 U/mL).

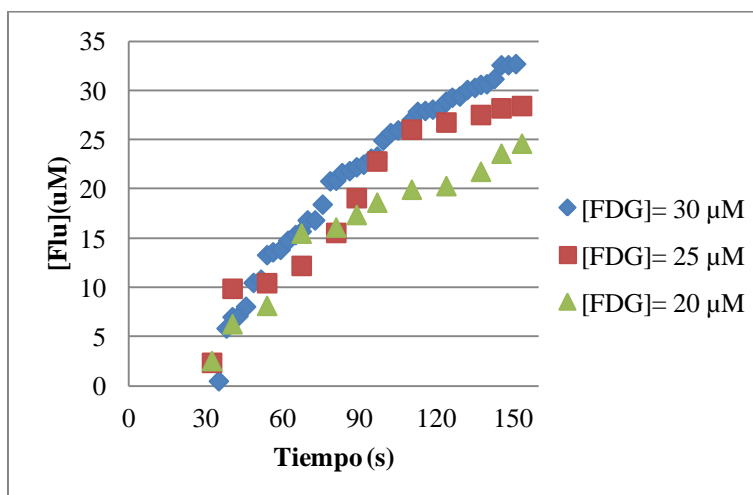


Figura 61. Monitoreo de la reacción de hidrólisis enzimática de FDG con β -D-Galactosidasa en microgotas en microchips a lo largo del microcanal de fractales. Cada dato corresponde a la concentración de fluoresceína en la microgotas a distintos tiempos. Ensayo enzimático en microchip con diseño de fractales. [FDG]= 30 μM , $[\beta\text{-Gal}]$ 25 U/mL. Configuración de la cámara Phantom: Intervalo de apertura 10000 μs , Tiempo de exposición 3000.04 μs y Disparador a 660 722. 79 μs . Flujo total 150 $\mu\text{L/h}$

4.5.3 ENSAYO ENZIMÁTICO DE β -D-GALACTOSIDASA + FDG EN MICROCHIP DE FRACTALES ACOPLADO AL INSTRUMENTO HPLC

Se corrió el programa de elución del inhibidor (PETG) en el HPLC sin inyectar el inhibidor, a la vez que se monitoreó la reacción enzimática en el microchip bajo las condiciones cambiantes de porcentaje de MeOH. Se varió la concentración final del sustrato ([FDG]=10 μ M) y de la enzima ([β -D-Gal]= 16.7 U/mL) en las microgotas. Tanto las soluciones de sustrato y enzima se preparan frescas para los experimentos.

La configuración de la cámara Phantom y del microscopio similar a la sección 4.5.2. El programa de inyección para el inhibidor (PETG) en el HPLC es el programa señalado en la Figura 29.

Los flujos utilizados en este experimento se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Flujos y concentraciones de reactivos usados en el experimento

	Concentración	Flujo
β -D-Gal	50 U/mL	60 μ L/hr
FDG	30 μ M	60 μ L/hr
Aceite	0.1% m/m Span 80	250 μ L/hr
Purga	-	5742 μ L/hr
HPLC	-	6000 μ L/hr

La figura 62 muestra una imagen de las microgotas en uno de los cruces del microchips sin inducir la fluorescencia. La figura 63 es una imagen de las microgotas en la misma posición del microchip, pero ahora con la fluorescencia inducida. Se puede observar cómo la fluorescencia crece paulatinamente en las gotas que pasan por las diferentes posiciones, siendo esto un indicador de que la reacción enzimática se está llevando satisfactoriamente.

De las imágenes de fluorescencia de las microgotas dentro del microchip tomadas durante cada minuto del programa de elución del inhibidor, se obtuvo el valor de intensidad de fluorescencia y estos, valores de intensidad de fluorescencia fueron graficados en función del tiempo (Figura 64) y así se monitoreó el ensayo enzimático.

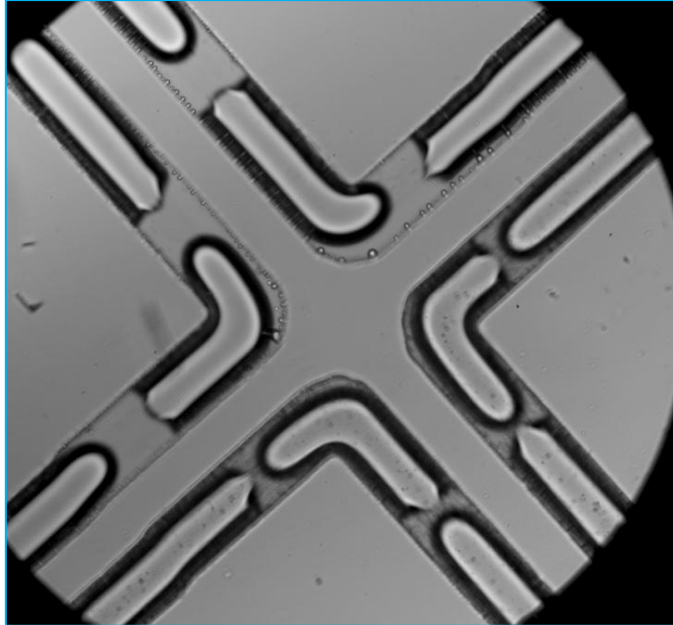


Figura 62. Microgotas de la hidrólisis enzimática de FDG con β -D-Galactosidasa dentro del microcanal del microcanal. [FDG]= 10 μ M, [β -Gal] 16.7 U/mL. Configuración de la cámara Phantom: Intervalo de apertura 10000 μ s, Tiempo de exposición 3000.04 μ s y Disparador a 660 722. 79 μ s. Flujo final 818 μ L/h.

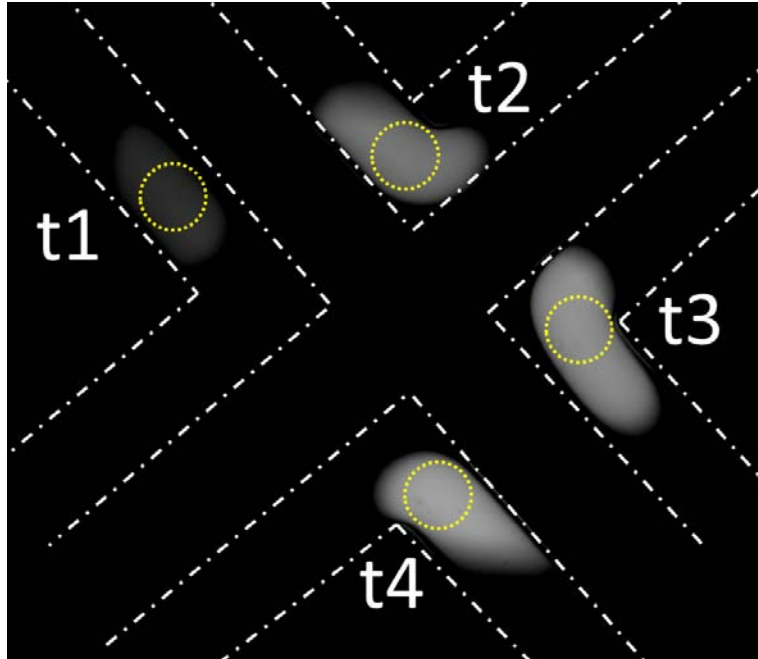


Figura 63. Microgotas de la hidrólisis enzimática de FDG con β -D-Galactosidasa dentro del microcanal del microcanal. [FDG]= 10 μ M, [β -Gal] 16.7 U/mL. Microscopio: Objetivo del microscopio 10x, 100% intensidad, 4to. cuadro de enfoque. Lámpara UV: 100% transmitancia. Configuración de la cámara Phantom: Intervalo de apertura 10000 μ s, Tiempo de exposición 3000.04 μ s y Disparador a 660 722. 79 μ s. Flujo final 818 μ L/h.

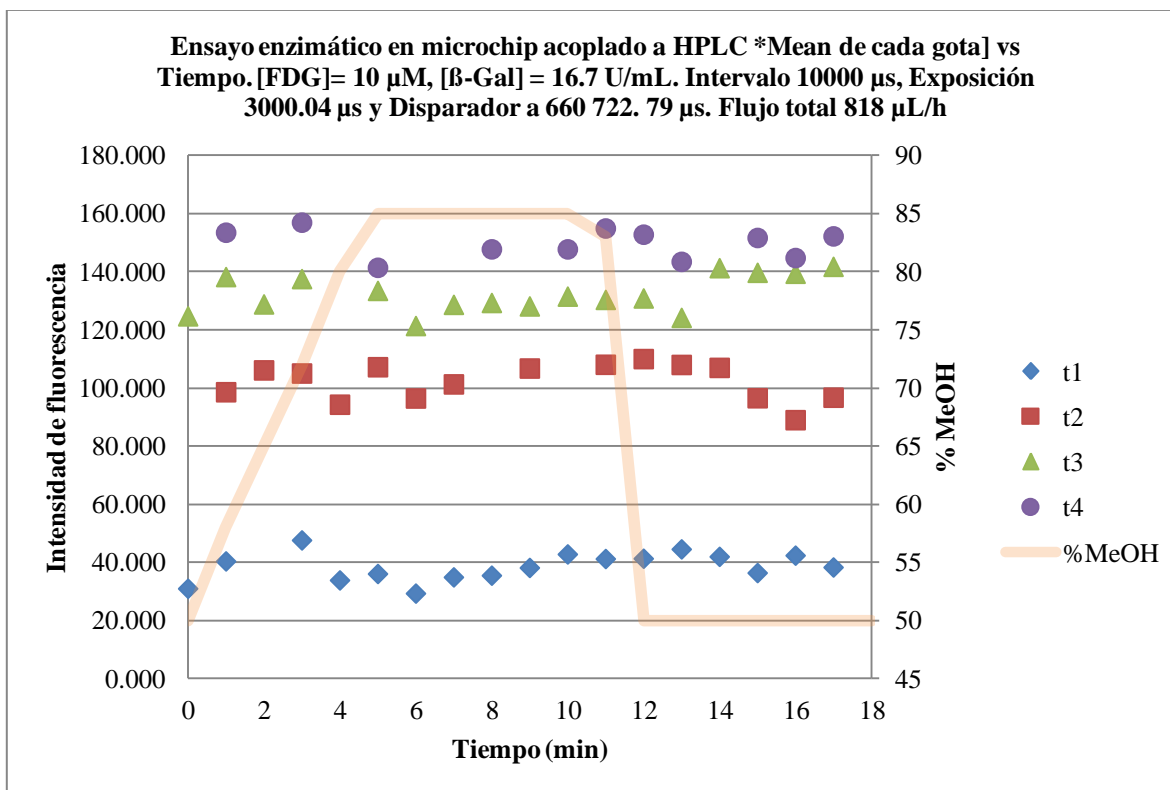


Figura 64. Monitoreo de la reacción de hidrólisis enzimática de FDG con β -D-Galactosidasa en microgotas dentro del microchips a lo largo del microcanal. La fluorescencia se evalúa durante todo el programa de elución del inhibidor. [FDG]= 10 μ M, [β -Gal] 17.6 U/mL. Configuración de la cámara Phantom Intervalo de apertura 10000 μ s, Tiempo de exposición 3000.04 μ s y Disparador a 660 722. 79 μ s. Flujo final 818 μ L/h. La actividad de la enzima no se ve afectada por incremento en la concentración de MeOH.

Con los resultados mostrados anteriormente se concluyó que es satisfactorio realizar el ensayo enzimático sin verse afectada la actividad de la enzima por la presencia de MeOH. El porcentaje de MeOH en la gráfica, es el % a la salida del HPLC, pero al mezclarse con las microgotas se ve disminuido a una tercera parte de su concentración original. Lo más alto que se tuvo el porcentaje de MeOH en las microgotas fue de 28%. Respecto al flujo de succión en la purga, en este programa de elución la estabilización fue posible sólo usando la succión de 5742 μ L/hr.

4.5.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A DISTINTOS PORCENTAJES DE METANOL EN ESPECTROFOTÓMETRO

Se realizaron ensayos enzimáticos en el espectrofotómetro, haciendo reaccionar la enzima con sustrato a distintos porcentajes de MeOH, esto con el fin de monitorear qué tanto se veía afectada la actividad con el porcentaje de MeOH.

Esto se debe a que el programa de elución del inhibidor tiene una variación del porcentaje de MeOH desde el 50% hasta el 85 %, porcentaje que en la gota se ve disminuido a 18% y 29% aproximadamente. Los porcentajes de MeOH probados fueron 0, 15 y 30 %; estos porcentajes fueron usados debido a que no se alcanzó mayor porcentaje de % MeOH.

Las concentraciones de enzima (β -D-Galactosidasa), sustrato (FDG) y los porcentajes finales de MeOH se resumen en la tabla 14.

Tabla 14. Concentraciones usadas en el experimento de actividad enzimática

Microcelda	[FDG]= 10 μ M (0,30 y 60 % MeOH)	[β -D-Gal]= 1.536 U/mL	V. total	%MeOH final
4	30 μ L (0% MeOH)	30 μ L	60 μ L	0
6	30 μ L (30% MeOH)	30 μ L	60 μ L	15
8	30 μ L (60% MeOH)	30 μ L	60 μ L	30

De los primeros 19 minutos de reacción, se hicieron las gráficas para sacar la velocidad inicial de las reacciones de hidrólisis enzimática del FDG a cada porcentaje de metanol. Los datos de concentración de fluoresceína a lo largo de tiempo se resumen en la Figura 65.

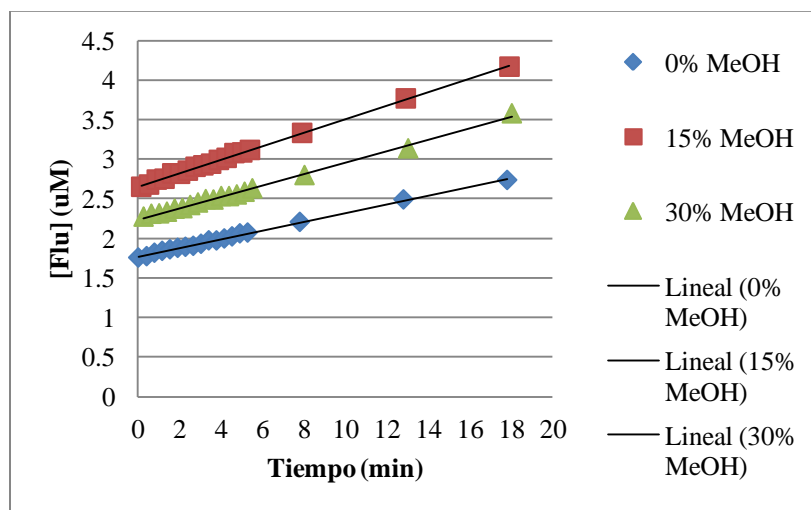


Figura 65. Monitoreo de la reacción de la hidrólisis enzimática de FDG con β -D-Galactosidasa. La concentración de fluoresceína a lo largo del tiempo se obtuvo a partir de la curva de calibración.

En la figura anterior, se aprecia que la cinética de la reacción no se ve afectada de una forma significativa a los distintos porcentajes de metanol, esto se reitera con los valores de velocidad inicial expuestos en la tabla 15.

Tabla 15. Velocidades iniciales de la reacción enzimática de hidrólisis de FDG con β -D-Galactosidasa a distintos porcentajes de MeOH

Microcelda	%MeOH final	Vo (M/min)
4	0	0.0559
6	15	0.0854
8	30	0.0719

La velocidad inicial no muestra una tendencia respecto a la concentración de metanol, en el caso de 15% de MeOH es mayor la velocidad, bajando de nuevo en la concentración de 30%. Sabiendo esto, se procedió a realizar los experimentos sin tomar en cuenta que la enzima perdiera actividad. De forma rápida se reiteró que la enzima siguiera activa y que el sustrato no estuviera hidrolizado, esto para descartar que ya no sirviera la enzima en la gráfica anterior. Se hizo un ensayo enzimático usando 100 veces más de concentración de enzima y la misma concentración de sustrato ($5\mu\text{M}$) a un 0% de MeOH, esto sólo con fines ilustrativos. El resultado se resume en la figura 66.

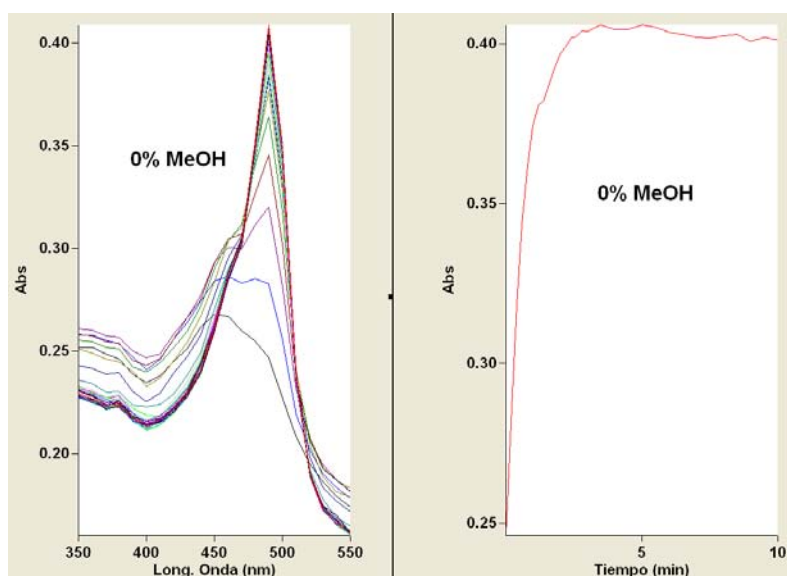


Figura 66. Monitoreo de la absorbancia de la reacción de hidrólisis enzimática a 490 nm para reiterar que los reactivos estaban en buenas condiciones. A la izquierda está la absorbancia de 550-350 nm a lo largo del experimento y a la derecha la absorbancia a 490 nm a lo largo del tiempo.

4.6 ENSAYOS ENZIMÁTICOS DE β -D-GALACTOSIDASA + FDG + CON INHIBIDOR (PETG)

4.6.1 ENSAYO ENZIMÁTICO DE β -D-GALACTOSIDASA CON INHIBIDOR (PETG) Y FDG EN ESPECTROFOTÓMETRO

Los ensayos enzimáticos con inhibidor (PETG) se hicieron con las concentraciones reportadas en [14], por lo que se utilizaron las concentraciones de 0.1, 0.25 y 0.5 mM.

El resumen de volúmenes de reactivo usados en el experimento está en la tabla 16.

Tabla 16. Concentraciones usadas en el experimento de inhibición enzimática en microceldas

Microcelda	[FDG]= 60 μ M (0, 0.2, 0.5 y 1 PETG mM)	[β -D-Gal]= 200 U/mL	V. total	[PETG] mM Final
4	30 μ L (0.2 PETG mM)	30 μ L	60 μ L	0.1
6	30 μ L (0.5 PETG mM)	30 μ L	60 μ L	0.25
8	30 μ L (1 PETG mM)	30 μ L	60 μ L	0.5
10	30 μ L (0 PETG mM)	30 μ L	60 μ L	0

Los resultados obtenidos del ensayo enzimático con inhibidor en el espectrofotómetro se muestran en la Figura 67.

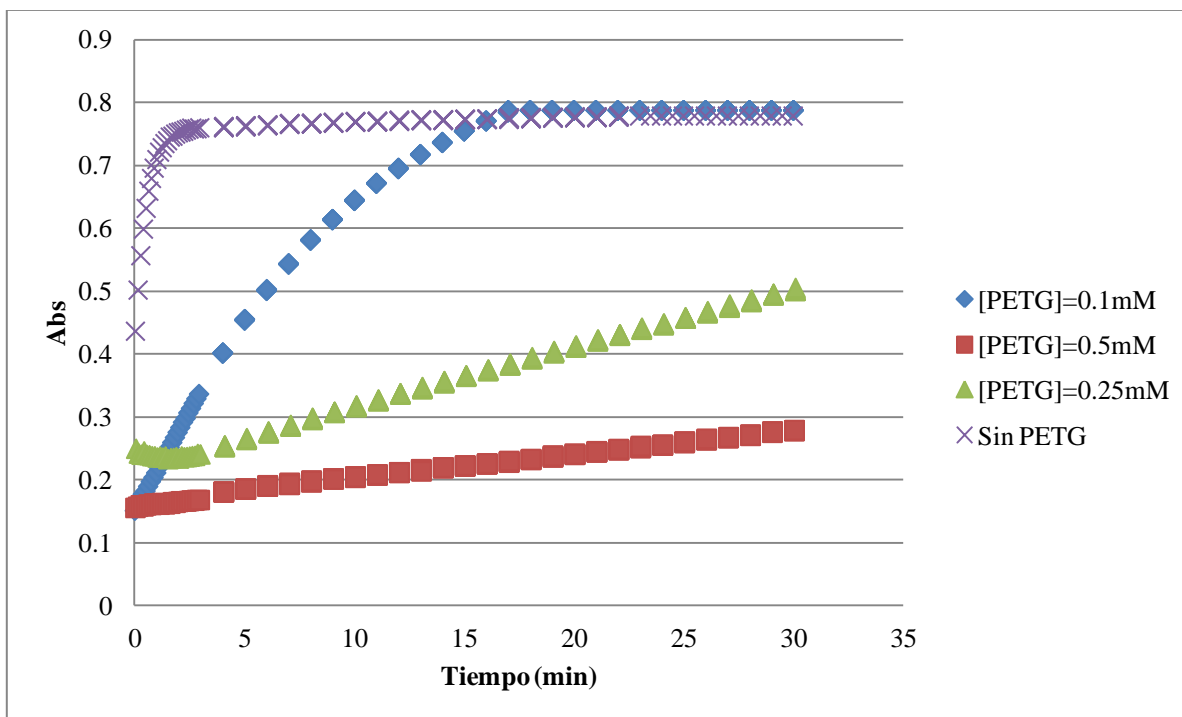


Figura 67. Monitoreo de la absorbancia en el tiempo de la hidrólisis enzimática de FDG a distintas concentraciones de inhibidor (PETG) en microceldas de cuarzo, [FDG]= 60 μ M, [β -Gal] = 100 U/mL, [PETG]= 0, 0.1, 0.25 y 0.5 mM. Se observa el comportamiento de la reacción a lo largo del tiempo, siendo evidente que la inhibición es parcial, no total.

En la Figura 67 se observa que la inhibición ocurrió en función de la concentración de inhibidor, a mayor concentración de PETG, la inhibición era mayor. Basado en esto, se calculó la concentración de PETG a inyectar en el instrumento HPLC, que pudiera ser detectada por el HPLC y a la vez inhibiera la reacción enzimática. Se observa que a una concentración de 0.5 mM de PETG para estas condiciones, la reacción es inhibida en un 90 %.

4.6.2 ENSAYO ENZIMÁTICOS DE β -D-GALACTOSIDASA CON INHIBIDOR (PETG) Y FDG EN MICROCHIP DE FRACTALES ACOPLADO A INSTRUMENTO HPLC

4.6.2.1 Primer programa de elución del inhibidor (inyectando inhibidor) (PETG)

Se llevó a cabo el ensayo enzimático con inhibidor (proveniente del HPLC) dentro del microchip con diseño de fractales acoplado al instrumento HPLC. No se varió la concentración de [FDG]= 10 μ M ni de la enzima [β -D-Gal]= 16.7 U/mL respecto a los experimentos de la sección 4.5.3. Tanto las soluciones de sustrato y enzima se preparan frescas para los experimentos. Los flujos y concentraciones usados en el experimento se resumen en la tabla 17.

La configuración de cámara Phantom y del microscopio es similar a la sección 4.5.2. El programa de inyección para el inhibidor (PETG) en el HPLC es el programa señalado en la Figura 24, se eligió este programa porque el inhibidor (PETG) eluye a un \sim % 77 de MeOH.

Por un lado se preparó el programa de elución del PETG en el HPLC y se inyectó 60 μ L de PETG a 8.25 mM. La absorción del PETG a 254 nm es de aproximadamente 400 mUA en el cromatograma y también es detectado al mismo tiempo a más de 4000 mUA a 210 nm (Figura 68). En el momento en que el sistema de formación de microgotas en el microchip estuvo estable, se abrió el "Loop" del instrumento HPLC para inyectar el PETG a través de la columna.

Cada minuto se tomaron imágenes de la fluorescencia de las gotas en el centro del canal del microchip tal como se mostró en la figura 79 y se obtuvo el valor de intensidad de fluorescencia. Estos valores fueron graficados en función del tiempo y se muestran en la Figura 69. Las gotas del lado superior izquierdo de la imagen corresponden a gotas con un tiempo de residencia de 3.95 s. Las gotas que pasan por la esquina superior derecha corresponden a gotas con un tiempo de residencia de 10.86 s. Las gotas que pasan por la esquina inferior derecha corresponden a gotas con un tiempo de residencia de 17.77 s y las gotas que pasan por la esquina inferior izquierda corresponden a gotas con un tiempo de residencia de 24.6 s. De acuerdo a la figura, al tiempo uno corresponde a la gota que tiene el menor tiempo de reacción y así sucesivamente hasta la gota al tiempo 4.

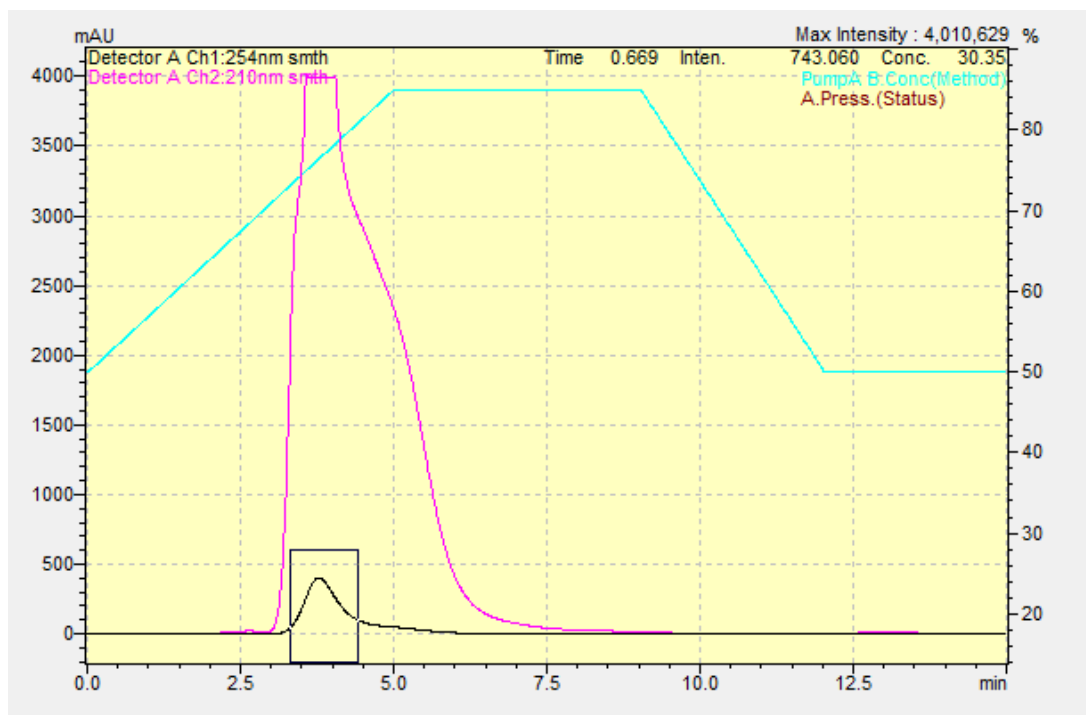


Figura 68. En el cromatograma se muestra encerrado cuando el inhibidor es detectado en el programa, aproximadamente a 400 mUA en 3 minutos 48 segundos a 254 nm y también es detectado al mismo tiempo a más de 4000 mUA a 210 nm. Flujo de 0.1 mL/min

El tiempo de retardo entre el detector del HPLC y la primera posición en el microchip en que se midió es de 1 minuto 50 segundos, como se determinó en el apéndice E de esta Tesis. De esta manera, hay que esperar este tiempo después de que el PETG sale del HPLC para que sea detectado en el microchip en forma de inhibición de la reacción.

Una vez que se estabilizó la reacción enzimática, se abrió el Loop y se monitoreó la fluorescencia como se muestra en la Figura 69.

Tabla 17. Flujos y concentraciones de reactivos usados en el experimento

Volumen de jeringa usado en el experimento		Concentración	Flujo
1 mL	β -D-Gal	50 U/mL	60 μ L/hr
1 mL	FDG	30 μ M	60 μ L/hr
3 mL	Aceite	0.1% m/m Span 80	250 μ L/hr
10 mL	Purga	-	5142 μ L/hr
-	HPLC	-	6000 μ L/hr

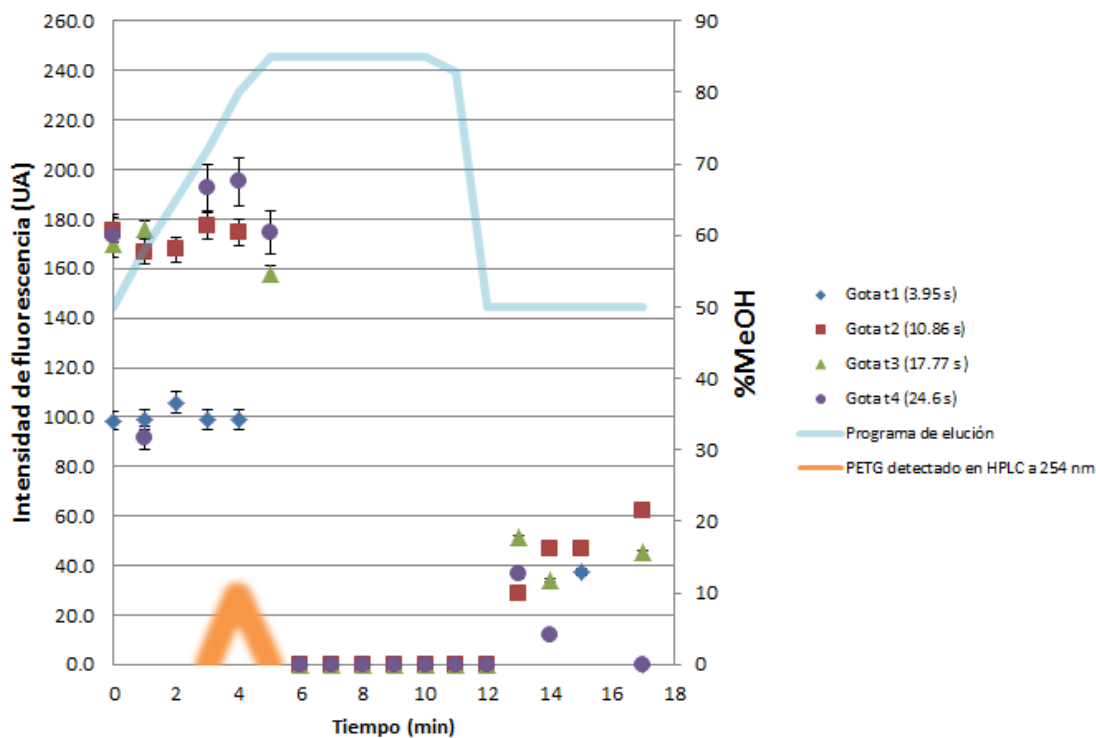


Figura 69. Monitoreo de la reacción de hidrólisis enzimática de FDG con β -D-Galactosidasa en microgotas dentro de microchips a lo largo del microcanal. La fluorescencia se registra como el promedio de 3 gotas en el mismo minuto durante todo el programa de elución del inhibidor (PETG). La fluorescencia desaparece a los 6 minutos por la inhibición de la β -Gal por el PETG dentro del microchip. La inhibición de la reacción enzimática dura de 6 a 12 minutos. [FDG]= 10 μ M, [β -Gal] 17.6 U/mL. [PETG]= 8.25 mM. Configuración de la cámara Phantom: Intervalo de apertura 10000 μ s, Tiempo de exposición 3000.04 μ s y Disparador a 660 722. 79 μ s. Flujo final 818 μ L/h.

Como se observa en la Figuras 68 y 69, el inhibidor se comenzó a detectar en el HPLC a los 3 minutos con 48 segundos. Sin embargo, como se había dicho antes, tardó 1:50 min en llegar al microchip. Y es entonces cuando la fluorescencia desaparece de los 6 minutos hasta los 12 minutos. Esta desaparición se explica debido a la pérdida de producto (fluoresceína) causado por la inhibición de la reacción enzimática por parte del PETG. Por otro lado se observó que la inhibición se extendió hasta el minuto 12, esto es debido a que el flujo proveniente del HPLC sufre el fenómeno de dispersión de Taylor que dispersa los compuestos en un volumen mayor y extiende más la inhibición dentro del microchip. Pasados los 12 minutos en el microchip, regresa la fluorescencia, pero no a niveles similares a los que había antes de la entrada del inhibidor. Esto probablemente se debe a que todavía queda PETG remanente en el fluido del HPLC y que entra al microchip inhibiendo parcialmente la reacción.

En base a esto, se decidió monitorear el experimento 5 minutos antes y 5 minutos después de haber inyectado el inhibidor a la columna del HPLC, esto con el fin de saber si el sistema se restablece completamente para una nueva inyección de PETG y se muestran en la siguiente sección.

De este experimento se concluye que es factible realizar ensayos enzimáticos y detectar la inhibición en el microchip mediante la intensidad de fluorescencia.

4.6.2.2 Segundo programa de elución del inhibidor (inyectando inhibidor) (PETG)

Se repitió el ensayo enzimático dentro del microchip en la presencia de inhibidor (proveniente del HPLC) utilizando las mismas condiciones de la sección anterior. Con las siguientes excepciones: ahora se monitoreó el experimento 5 minutos antes de inyectar el inhibidor y 5 minutos después de terminada la elución el inhibidor.

Se modificó el programa de elución del inhibidor en dos condiciones: La primera consistió en alargar el tiempo de duración del programa de elución con el fin de monitorear la fluorescencia durante más tiempo. Y en la segunda consistió en empezar una rampa de ascenso en porcentaje de MeOH desde 0% hasta 85 %, como en la Figura 70, esto con el fin de aprovechar al máximo la columna cromatográfica. Este programa permitirá eluir desde sustancias muy polares hasta sustancias no polares de un extracto.

De las imágenes de las microgotas en el centro del microchip tomadas cada minuto durante la reacción se obtuvo el valor de intensidad de fluorescencia y estos, valores de intensidad fueron graficados en función del tiempo. La Figura 63 ejemplifica la numeración asignada a las gotas en función de su tiempo de reacción. La gota al tiempo uno corresponde a la reacción en el tiempo 3.95 s, la gota al tiempo dos a 10.86 s, al tiempo tres a 17.77 s y al tiempo cuatro a 24.6 s.

La absorción del PETG a 254 nm es de aproximadamente 500 mUA en el cromatograma del segundo programa de elución (Figura 70). Se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en el primer programa, sólo se modificó la duración y la curva de porcentaje de disolventes del programa elución.

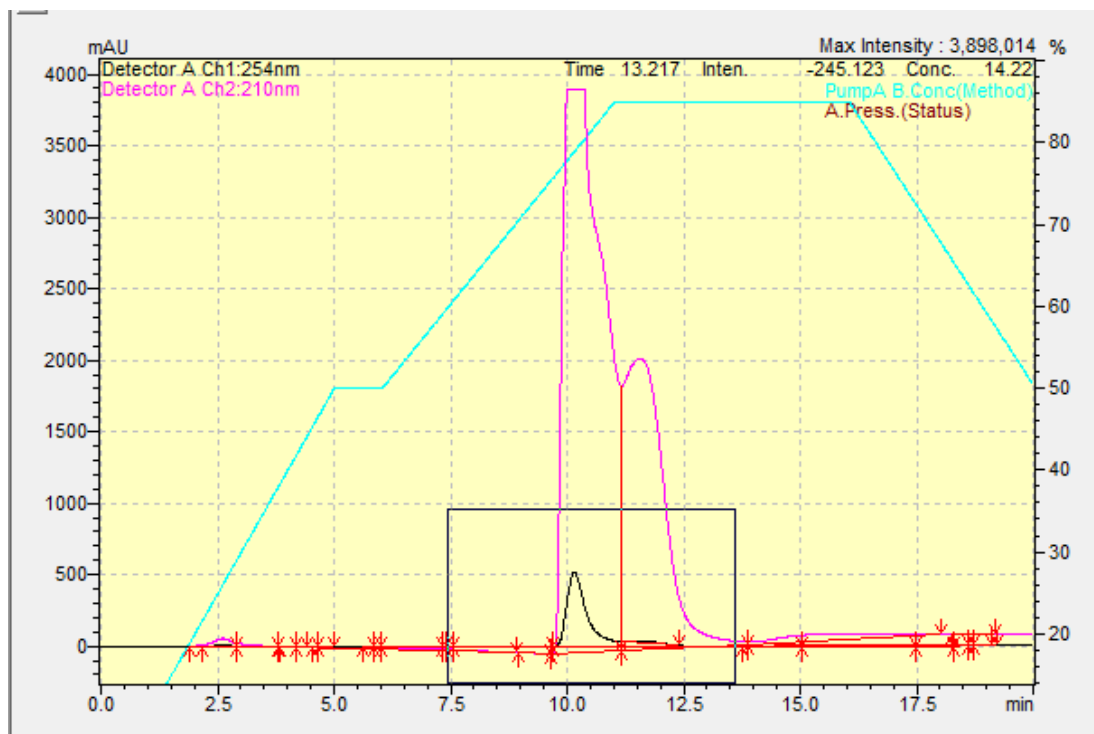


Figura 70. En el cromatograma modificado se muestra encerrado cuando el inhibidor es detectado en el programa, aproximadamente a 400 mUA en 10 minutos 12 segundos a 254 nm y también es detectado al mismo tiempo a más de 4000 mUA a 210 nm. Flujo de 0.1 mL/min.

De la detección del PETG por parte del instrumento HPLC, se espera 1 minuto 50 segundos para que el PETG llegue al microchip inhibiendo la reacción.

Los flujos y concentraciones usados en el experimento se resumen en la tabla 17. Una vez que se restableció la reacción enzimática, se abrió inyectó el inhibidor y se monitoreó el experimento como se muestra en la figura 71 y 72.

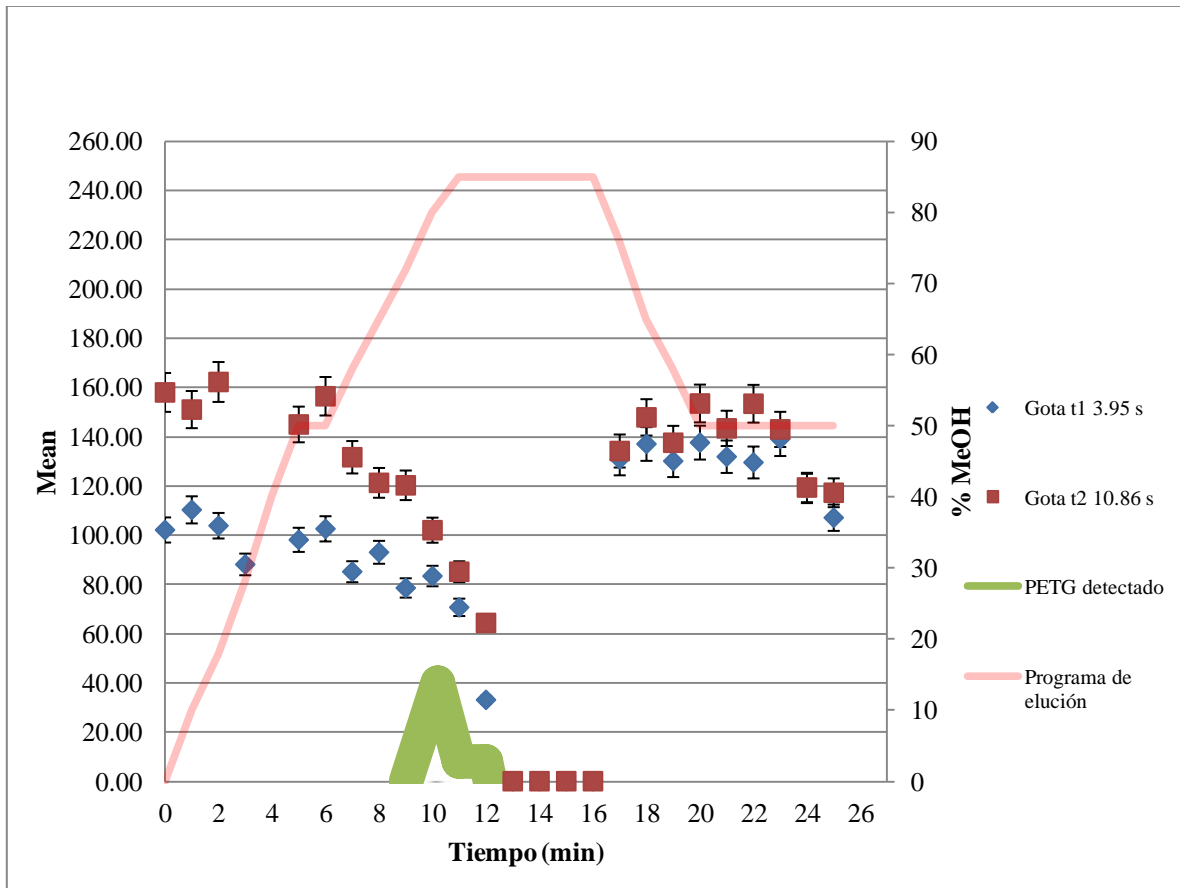


Figura 71. Monitoreo de la reacción de hidrólisis enzimática de FDG con β -D-Galactosidasa en microgotas dentro de microchips a lo largo del microcanal. La fluorescencia se evalúa durante todo el programa de elución del inhibidor (PETG). La fluorescencia comienza a desaparecer a los 10 minutos aprox. por la inhibición de la β -Gal por el PETG dentro del microchip. La inhibición total de la reacción enzimática dura de 12 a 17 min. [FDG]= 10 μ M, [β -Gal] 17.6 U/mL. [PETG]= 8.25 mM. Configuración de la cámara Phantom: Intervalo de apertura 10000 μ s, Tiempo de exposición 3000.04 μ s y Disparador a 660 722. 79 μ s. Flujo total 818 μ L/h. gráfico correspondiente al gráfico de las gotas al tiempo 1 y 2.

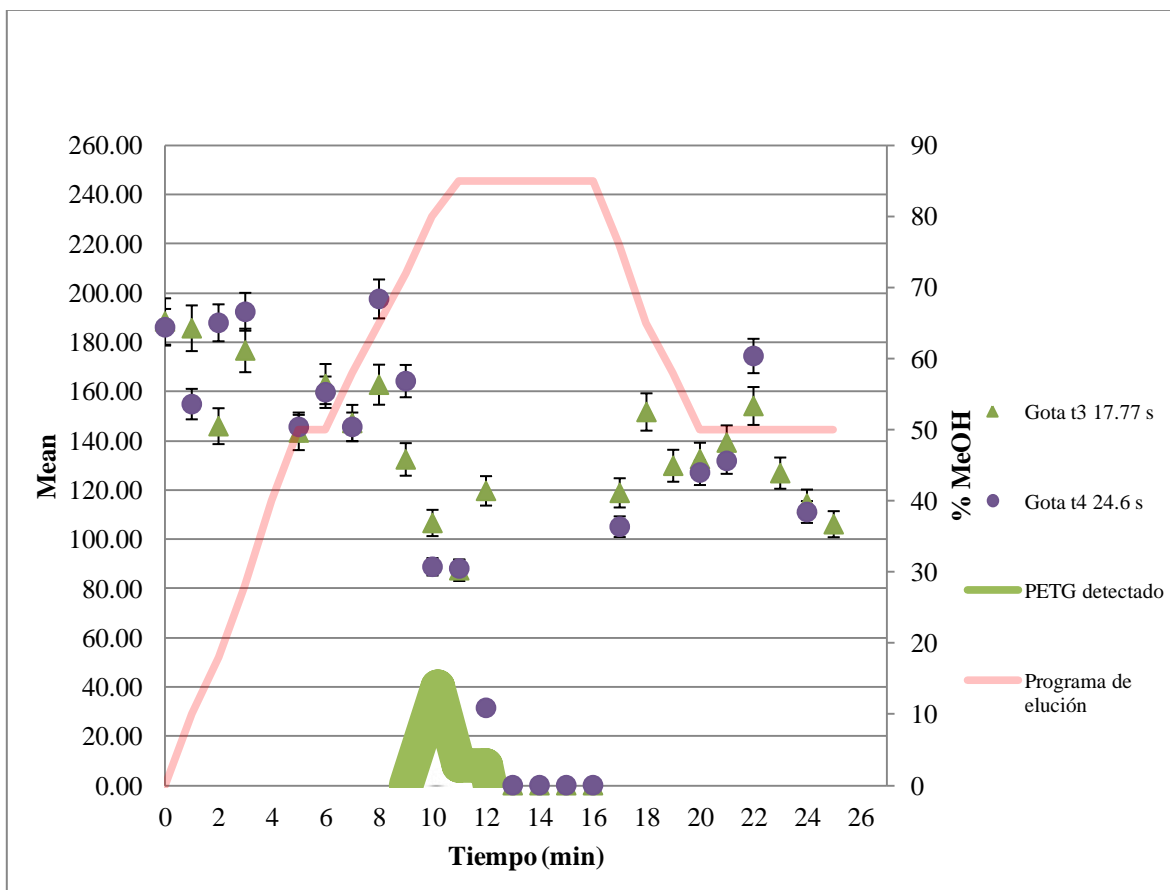


Figura 72. Monitoreo de la reacción de hidrólisis enzimática de FDG con β -D-Galactosidasa en microgotas dentro de microchips a lo largo del microcanal. La fluorescencia se evalúa durante todo el programa de elución del inhibidor (PETG). La fluorescencia comienza a desaparecer a los 10 minutos aprox. por la inhibición de la β -Gal por el PETG dentro del microchip. La inhibición de la reacción enzimática dura de 12 a 17 min. [FDG]= 10 μ M, [β -Gal] 17.6 U/mL. [PETG]= 8.25 mM. Configuración de la cámara Phantom: Intervalo de apertura 10000 μ s, Tiempo de exposición 3000.04 μ s y Disparador a 660 722. 79 μ s. Flujo total 818 μ L/h. gráfico correspondiente al gráfico de las gotas al tiempo 3 y 4.

Como se observa en la Figura 71 y 72, la fluorescencia empezó a decaer a los 10 minutos y desapareció desde los 12 minutos hasta los 17 minutos. Esto se debe a la reacción enzimática estuvo totalmente inhibida y dejó de producir fluorescencia. Por otro lado, el inhibidor fue detectado por el detector de instrumento HPLC a 10 minutos con 12 segundos aproximadamente, el tiempo de inhibición se extiende a 5 minutos, esto es debido a que el PETG inyectado sufre el fenómeno de dispersión de Taylor, lo que extiende más la inhibición dentro del microchip. Pasados los 17 minutos en el microchip, se restablece la fluorescencia, pero no a niveles similares a los que había antes de la entrada del inhibidor. Esto también se debe a que todavía queda PETG remanente en el fluido del HPLC y que entra al microchip inhibiendo parcialmente la reacción.

En base a esto, se comprueba que el programa modificado de elución ayuda factiblemente a detectar inhibidores de forma cualitativa. La inestabilidad de las señales de fluorescencia podría deberse a dos factores relacionados con las bombas de jeringas. El primero es que la jeringa de 20 mL hizo que la sensibilidad del proceso de succión disminuyera y se refleja en el flujo que pasa del HPLC.

El segundo factor es que no se cambia el flujo de purga cuando se da el cambio de viscosidad por aumento de porcentaje de MeOH. Estos dos factores propician que a los minutos 12 haya desaparición de las microgotas y se forme un flujo continuo, hecho que fue corregido aumentando la purga de 5742 a 11742 $\mu\text{L/hr}$ por 10 segundos y regresando a 5742 $\mu\text{L/hr}$ para continuar con el programa. Con las modificaciones del programa y el monitoreo de la fluorescencia por 5 minutos después de haber terminado el programa, se concluyó de este experimento que es factible realizar ensayos enzimáticos y detectar la inhibición enzimática en el microchip cualitativamente mediante la intensidad de fluorescencia.

5 CONCLUSIONES

En este trabajo se logró diseñar, fabricar y caracterizar un microchip de microfluídica para formar microgotas.

Se logró realizar y monitorear mediante microscopía de fluorescencia y análisis digital de imágenes la reacción enzimática con la β -D-Galactosidasa en microgotas dentro de un microchip de microfluídica en ausencia y en presencia de un inhibidor.

Se rediseño el microchip para acoplarse a un instrumento de HPLC y poder introducir a las microgotas los compuesto eluidos en el HPLC.

Se llevó a cabo la reacción enzimática con la β -D-Galactosidasa en microgotas en microchips acoplados al instrumento de HPLC.

Se desarrolló un programa de elución en el instrumento HPLC que permite eluir desde compuestos muy polares hasta compuestos no polares y probar su actividad inhibitoria en el acoplamiento HPLC- microchip con reacción enzimática modelo.

Se detectó cualitativamente la inhibición de la reacción enzimática modelo dentro del microchip de microfluídica acoplado al instrumento HPLC usando cantidades de reactivos del orden de los 1000 μ L para cada reactivo.

Los logros obtenidos en este proyecto permitirán en un futuro cercano la detección de inhibidores enzimáticos contenidos en extractos naturales utilizando un microchip de microfluídica acoplado a un instrumento HPLC.

6 APÉNDICES

6.1 APÉNDICE A

6.1.1 BUFFER DE FOSFATOS 100MM, PH 7.5, 1 MM $MgCl_2$ CON ALBÚMINA DE SUERO BOVINA ABS (BSA POR SUS SIGLAS EN INGLES)

El uso de albúmina de suero bovina ABS (BSA por sus siglas en ingles) en el buffer tiene la finalidad de estabilizar a otras proteínas porque ofrece un ambiente biológico más estable para ellas y evita que vayan a la interfase de agua-aceite. También se usa para que no se adhieran las proteínas a los tubos de reacción y, puntas de micropipeta [23].

Se hicieron pruebas de estabilización de microgotas con distintas concentraciones de ABS con el fin de establecer la concentración óptima para el ensayo enzimático. Las concentraciones de ABS en el buffer de fosfatos que se probaron fueron 0, 0.5, 1 y 2 mg/mL.

De las pruebas hechas con ABS en el buffer de fosfatos, la formación de microgotas fue satisfactorio por los primeros 10 minutos, posteriormente no hubo microgotas dentro del microcanal porque las dos fases (orgánica y acuosa) no viajaban por separado, dándose incluso pequeñas acumulaciones en las esquinas de las curvas del microchip (Figura 72). Estos fenómenos no se presentaron en el uso de buffer sin ABS.

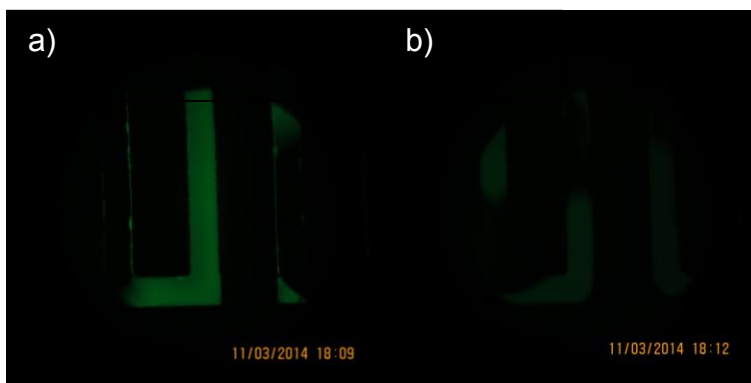


Figura 72 . Para ambas fotos [Fluoresceína] = 30 μ M, flujo total= 100 μ L/hr (suma de flujo de fase acuosa y fase orgánica). La configuración de la cámara digital: ISO 100, S =1/20 s, f=3.5.

a) Deformación de microgotas por pegado de fase acuosa a las paredes del microcanal en presencia de [ABS] = 2mg/mL. b) Microgotas sin deformación y sin pegado de fase acuosa, buffer sin ABS.

6.1.2 *BUFFER DE FOSFATOS 100MM, PH 7.5, 1 MM CLORURO DE MAGNESIO (II) CON DTT.*

El DTT (ditiotreitól) es un compuesto sulfurado que tiene la función de reducir los enlaces disulfuro de proteínas. Se utiliza frecuentemente para prevenir enlaces intramoleculares e intermoleculares no específicos provenientes de los residuos del aminoácido cisteína. El uso de β -Mercaptoetanol con la misma función del DTT se ha reportado en la hidrólisis del Fluorescein-Di- β -D-Galactopiranosido con la enzima β -galactosidasa como componente del buffer empleado en los ensayos enzimáticos [20].

Se hizo el ensayo enzimático con y sin DTT presente en el buffer de reacción con el fin de determinar si el uso de DTT es necesario o no en la enzima. Esto se ve reflejado en la actividad de la enzima, ya que al haber disminución de la actividad de la enzima, se evalúa si es perjudicial para la hidrólisis, el DTT se puso en una concentración 4.39 mg/mL.

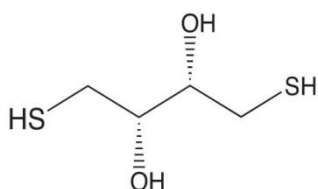


Figura 73. Estructura química del Ditiotreitól (DTT)

De los ensayos enzimáticos hechos con y sin DTT en el buffer de fosfatos, se comprobó que después de mezclar los reactivos, al minuto la reacción de hidrólisis es más rápida y cualitativa (más producto, más fluorescencia) en el buffer que no contiene a la enzima con DTT (Figura 74) que en la que sí lo contenía. Por lo que se optó por no utilizar el DTT en el buffer porque disminuyó la actividad de la enzima.

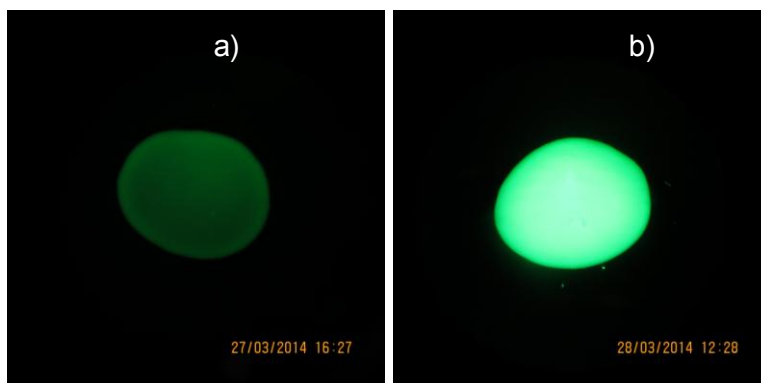


Figura 74. Reacción de hidrólisis del FDG con β -gal realizada en una gota sobre un portaobjetos. Las imágenes muestran la fluorescencia de la gota después de un minuto de reacción. a) Con [DTT] = 4.39 mg/mL b) Sin DTT. [FDG]= 90 μ M Buffer de fosfatos [β -gal] = 100 U/mL. La configuración de la cámara digital: ISO 100, S =1/20 s, f=3.5

6.2 APÉNDICE B

6.2.1 CANTIDAD DE SURFACTANTE EN LA FASE ORGÁNICA

El uso de surfactantes en la fase orgánica (aceite mineral) dentro del microcircuito tuvo como función la estabilidad de las microgotas a lo largo del microcanal, ya que evita que se mezclen entre ellas o se destruyan [7]. Para este proyecto se utilizó el surfactante Span 80 por ser un surfactante que comúnmente se utiliza para la estabilización de microgotas con buenos resultados y cuya estructura química se muestra en la Figura 75.

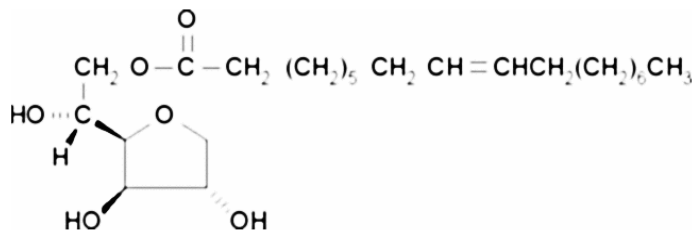


Figura 75. Estructura química de Span 80

Las pruebas llevadas a cabo para establecer la cantidad óptima de surfactante para la formación de microgotas incluyen el contenido en el aceite mineral de Span 80 en 0.1% m/m y 1% m/m.

Se hicieron pruebas de formación de microgotas usando como fase acuosa fluoresceína 60 μM en el buffer de fosfatos y en la fase orgánica se varió la concentración de Span 80, probando las concentraciones de 0.1% m/m y 1% m/m.

Los flujos utilizados en las pruebas de cantidad de surfactante y las concentraciones se resumen en la tabla 18.

Tabla 18. Flujos utilizados en los experimentos de cantidad de surfactante

Flujos	[Fluoresceína] = 60 μM en buffer de fosfatos. (concen. Final en microgotas = 30 μM)	Buffer de fosfatos 100 mM	Fase orgánica
	25 $\mu\text{L/hr}$	25 $\mu\text{L/hr}$	50 $\mu\text{L/hr}$
Volumen de la jeringa usada (mL)	1	1	1

Los resultados obtenidos acerca de la cantidad de Span 80 óptima para la estabilidad de las microgotas dentro del microcircuito corresponde a una concentración del 0.1% m/m, ya que a ésta concentración no se presentó un pegado de las microgotas a las paredes del microcanal. La fase orgánica con concentración al 1% m/m de Span 80 presentó acumulación de la fase acuosa a lo largo de los microcanales como se observa en las Figuras 76 y 77.

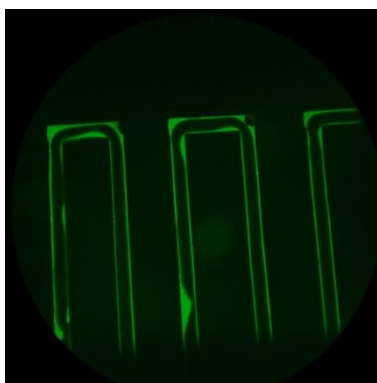


Figura 76. Span 80 al 1% m/m. Se presenta acumulación de la fase acuosa en las paredes de los microcanales. [Fluoresceína]= 30 μM , flujo total= 100 $\mu\text{L/hr}$ (Fase acuosa + fase orgánica). La configuración de la cámara digital: ISO 100, S =1/20 s, f=3.5



Figura 77. Span 80 al 0.1% m/m. Se presenta estabilización de las microgotas a través de los microcanales. [Fluoresceína] = 30 μ M, flujo total= 100 μ L/hr (Fase orgánica + fase acuosa). Configuración de la cámara digital: ISO 100, S =1/20 s, f=3.5.

6.3 APÉNDICE C

6.3.1 FORMACIÓN DE MICROGOTAS A DISTINTOS PORCENTAJES DE METANOL

La formación y estabilización de las microgotas a distintos porcentajes de metanol era importante, porque de esta manera se podría utilizar un programa de elución con el instrumento HPLC que permitiera la separación de compuestos a través de una columna cromatográfica de fase reversa (Ultra II® C18 3 μ m 30 x 2.1 mm, Restek). La frecuencia y la estabilidad de las microgotas dentro del microchip se vieron afectadas por el desempeño de la bomba de jeringa que succionaba el exceso de flujo proveniente de HPLC, ya que al cambiar la viscosidad en los distintos porcentajes de MeOH cambió la cantidad de flujo que succionaba la bomba.

Dentro del programa de elución del instrumento HPLC, se tuvieron cambios en porcentaje de polaridad de los dos líquidos acarreadores (MeOH/H₂O). Al aumentar el porcentaje de MeOH presente en el flujo proveniente del instrumento HPLC se tiene una disminución de viscosidad, lo cual afecta la estabilidad de las microgotas.

El montaje experimental es el mismo que en el experimento de formación de microgotas en un microchip con diseño de fractales con adaptación a un instrumento HPLC (Figura 18), es decir, sin ninguna otra entrada de fase acuosa, sólo la entrada del HPLC.

Se comenzó a correr el flujo de 6000 $\mu\text{L/hr}$ 100 % H_2O en el instrumento HPLC, a la vez que se comenzaba a hacer una purga de mínimo 5400 $\mu\text{L/hr}$, y un flujo de aceite de 50 $\mu\text{L/hr}$.

Una vez que se estabilizó la formación de microgotas en 100% H_2O , se varió el porcentaje de Metanol en la fase acuosa proveniente del HPLC. Se probaron los porcentajes de MeOH de 0, 50, 80 y 100 %. De acuerdo a la estabilización de las microgotas, se varió también la purga en 5400 y en 5700 $\mu\text{L/hr}$, y el flujo de aceite de 50, 100 y 150 $\mu\text{L/hr}$.

Los flujos usados en el experimento, se resumen en la tabla 19.

Tabla 19. Flujos utilizados en la formación de microgotas a distintos porcentajes de MeOH

Flujos	Flujo de HPLC	Flujo de purga	Aceite mineral con Span 80 0.1% m/m	% MeOH	Formación de microgotas	Frecuencia de microgotas (microgotas/seg)
Prueba 1	3000 $\mu\text{L/hr}$	4200 $\mu\text{L/hr}$	50 $\mu\text{L/hr}$	0	Sí	1.5
Prueba 2	6000 $\mu\text{L/hr}$	5400 $\mu\text{L/hr}$	50 $\mu\text{L/hr}$	0	Sí	1.3
Prueba 3	6000 $\mu\text{L/hr}$	5400 $\mu\text{L/hr}$	50 $\mu\text{L/hr}$	50	Sí	2.75
Prueba 4	6000 $\mu\text{L/hr}$	5400 $\mu\text{L/hr}$	100 $\mu\text{L/hr}$	80	Sí	2.95
Prueba 5	6000 $\mu\text{L/hr}$	5700 $\mu\text{L/hr}$	180 $\mu\text{L/hr}$	100	*Sí	-

* Gotas deformes y se daba el pegado de las microgotas de metanol a las paredes del microcanal.

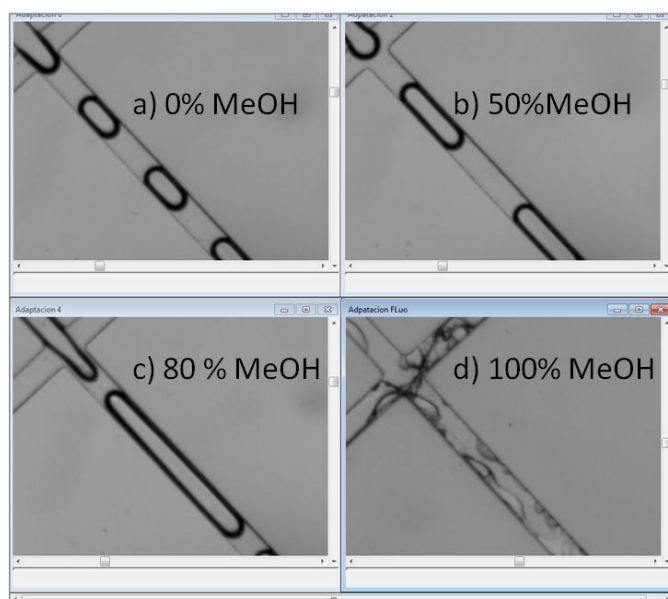


Figura 78. Formación de microgotas a distintos porcentajes de MeOH. a) 0% MeOH del HPLC. b) 50% MeOH del HPLC. c) 80% MeOH del HPLC d) 100% MeOH del HPLC.

La desestabilización de las microgotas a un alto porcentaje de MeOH se debe al cambio de viscosidad cuando hay 100% MeOH proveniente del HPLC. En este porcentaje de metanol la bomba de jeringa que está succionando en la purga presenta dificultades técnicas para succionar MeOH lo que se reflejó en la ausencia de formación de microgotas. Aunando a este fenómeno la fase orgánica se mezcla con el MeOH y no se da la formación de microgotas por no existir entre ellos casi ninguna inmiscibilidad.

6.4 APÉNDICE D

6.4.1 USO DE ACEITES FLUORADOS COMO FASE ORGÁNICA Y RECUBRIMIENTO DE MICROCANALES CON EL POLÍMERO AQUAPEL

Los aceites fluorados son líquidos a temperatura ambiente derivados de alcanos, en los que se ha sustituido los enlaces carbono-hidrogeno por carbono-flúor. Las características principales de los aceites fluorados son [24] :

-Son químicamente inertes, por lo que no participan en reacciones colaterales que puedan llevar a la formación de subproductos e impidiendo así, la migración de sustancias de las microgotas al aceite mineral [24].

-No son inflamables.

-Son inmiscibles con muchos disolventes orgánicos y con el agua.

-Tiene una viscosidad baja.

El aceite fluorado se utilizó con los mismos flujos que el aceite mineral, la función es la misma, formación de microgotas. Se usó recién preparado para los experimentos el aceite fluorado FC-40 (Aldrich) con una concentración de surfactante fluorado 1H,1H,2H,2H-Perfluoruro-1-octanol (Aldrich) al 2.5 % m/m.

La sustancia Aquapel es un polímero fluorado que tiene la función de recubrir las paredes de los microcanales, evitando así que cualquiera de las dos fases (orgánica o acuosa) se peguen en las paredes de los microcanales.

La preparación de los microchips cubiertos de Aquapel se lleva cabo mediante la inyección de éste con una jeringa por el microcanal de salida hasta que los microcanales estén llenos. Una vez que el microchip contiene al Aquapel, se deja

reposar dentro del microchip por 20 segundos. Para retirar el Aquapel del interior del microchip, se suministra aire por el microcanal de salida para expulsar el Aquapel del interior de los microcanales, una vez hecho esto, los microchips se hornean a 70°C por 20 minutos antes de su uso [24].

La primera etapa de uso de aceites fluorados consistió en hacer los experimentos de formación de microgotas de forma habitual, usando como fase acuosa el buffer de fosfatos. En este experimento, la formación de microgotas no fue posible porque el aceite fluorado se quedaba pegado a las paredes de los microcanales.

La segunda etapa consistió en el uso de un polímero que recubriera las paredes de los microcanales, de tal forma que el aceite fluorado no se pegara a las paredes y permitiera la formación satisfactoria de las microgotas. El polímero usado es el Aquapel, polímero fluorado usado para repeler agua en vidrios de automóviles.

La tercera etapa consistió en probar la formación de microgotas con el Aquapel recubriendo las paredes de los microcanales y usando el aceite fluorado como fase orgánica. Respecto a los resultados obtenidos de esta tercera etapa, se da una formación satisfactoria de las microgotas, pero como los aceites fluorados son menos viscosos que los normales, se presentó el fenómeno de un fluido de aceite fluorado en contraflujo a las fases acuosas. La acumulación paulatina de aceite fluorado en el microcanal da por consecuencia una descarga de aceite, lo que perjudica en la continuidad de flujo de la fase acuosa. Figura 81.

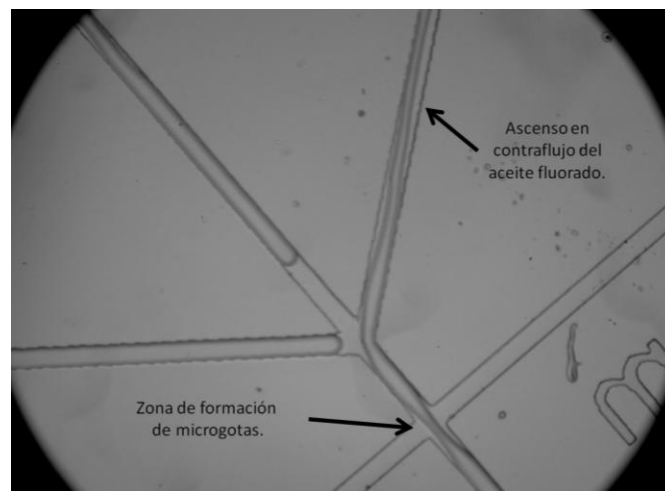


Figura 81. En la imagen se observa como el aceite fluorado llega a los canales de entrada de la fase acuosa, lo que originó irregularidad en el flujo suministrado.

Debido a estos factores en los que no hubo regularidad en el flujo de las fase acuosa consecuencia del uso de aceite fluorado, se optó por utilizar aceite mineral + Span 80 1% m/m como fase orgánica.

6.5 APÉNDICE E

6.5.1 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RETARDO ENTRE EL MICROCHIP Y EL INSTRUMENTO HPLC

Era importante conocer el retardo de tiempo entre el instrumento HPLC y el microchip, ya que de esta manera se puede hacer una relación de tiempo entre los componentes detectados de una mezcla inyectada en el instrumento HPLC y el momento en el que ingresan en el microchip a reaccionar con la enzima y el sustrato.

El flujo del instrumento HPLC se fijó a 6000 $\mu\text{L/hr}$ para todos los experimentos y se procedió a hacer un programa de elución de fluoresceína con el fin de relacionar en el cromatograma el tiempo en el que aparece la señal de la fluoresceína y el tiempo en el que es detectada la fluoresceína en el microchip. Esta diferencia de tiempos se definió como tiempo de retardo.

La forma de inyectar el compuesto es la siguiente: se cargó 80 μL de Fluoresceína a una concentración de 90 μM , se preparó el programa de elución en el instrumento HPLC y se abre el inyector del HPLC para dar paso al programa. Los detectores del instrumento se pusieron en $\lambda = 492 \text{ nm}$ y $\lambda = 371 \text{ nm}$. El programa de elución optimizado empieza desde un 0% de MeOH y se mantiene constante por todo el programa; con un flujo constante de 6000 $\mu\text{L/hr}$ y una duración de 10 min (Figura 79). En este experimento se usó el flujo de succión obtenido en la sección 4.2.1. y un flujo de la fase orgánica de 180 $\mu\text{L/hr}$. El retardo se calculó como la diferencia entre el tiempo que tarda la fluoresceína en ser detectada en la entrada del microchip y el tiempo de detección que está en el cromatograma del HPLC.

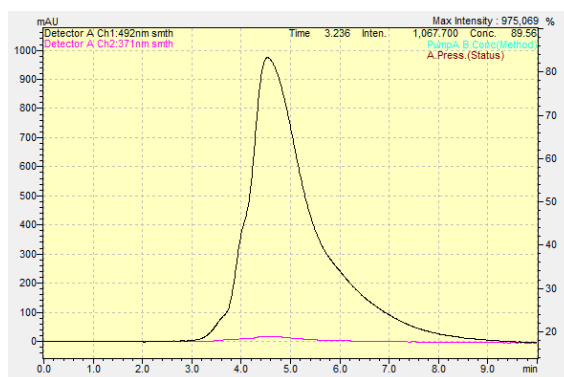


Figura 80. Programa de elución para la fluoresceína. Flujo del HPLC 0.1 mL/min. En la figura se ve el pico máximo de absorbancia aproximadamente a 4 minutos y medio, tiempo cuando la fluoresceína es detectada por el instrumento a 492 nm.

En el momento que se inyectó la fluoresceína y se inició el programa, se comenzó a tomar video en el microchip. Una vez que la fluoresceína es detectada por el detector del HPLC, se observó en video el tiempo en el que la fluoresceína es detectada en microchip. De esta manera se obtuvo el tiempo de retardo entre el HPLC y el microchip.

El experimento se hizo por triplicado, resultado en todos los casos un tiempo de retardo de 1 min con 50 segundos.

6.6 APÉNDICE F

6.6.1 USO DE CÁMARA DIGITAL HD

La cuantificación de la concentración de la fluoresceína, el producto de la reacción de hidrólisis del FDG, se llevó a cabo mediante el análisis de imágenes tomadas con una cámara digital de alta resolución (Canon Powershot SX260) montada en un microscopio de fluorescencia (DMI 3000B, Leica)

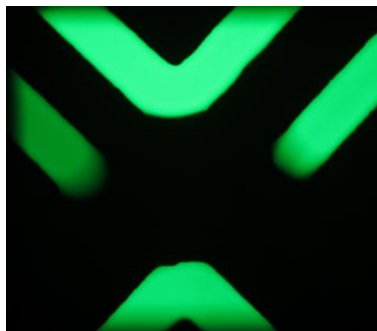


Figura 82. Imagen tomada con la configuración óptima de la cámara. ISO 100, S =1/20 s, f= 3.5, sin Zoom, medidor de luz: Ponderado central, balance de blancos: Tungsteno.

Las pruebas para establecer la configuración óptima de la cámara digital consistió en variar el ISO, el tiempo de apertura (S) y abertura del diafragma (F) mientras se tomaban fotos de microgotas en una curva de calibración de fluoresceína desde 0.5 - 30 μ M.

Se optimizó la configuración de la cámara digital, las cuales son: ISO* 100, S** =1/20 s, f***=3.5, sin zoom, medidor de luz: ponderado central, balance de blancos: Tungsteno.

* ISO = Es una medida en fotografía que marca la cantidad de luz que necesita la cámara para hacer una fotografía.

** S = Tiempo de exposición es el ajuste del lapso durante el cual el captor o la película es expuesto a la luz en cada toma.

*** f = apertura del diafragma de la lente controla la cantidad de luz que pasa a través del objetivo.

Las pruebas de la configuración de la cámara digital se modificaron a lo largo de la curva de calibración para establecer las mejores condiciones. Los resultados están resumidos en la Figura 83.

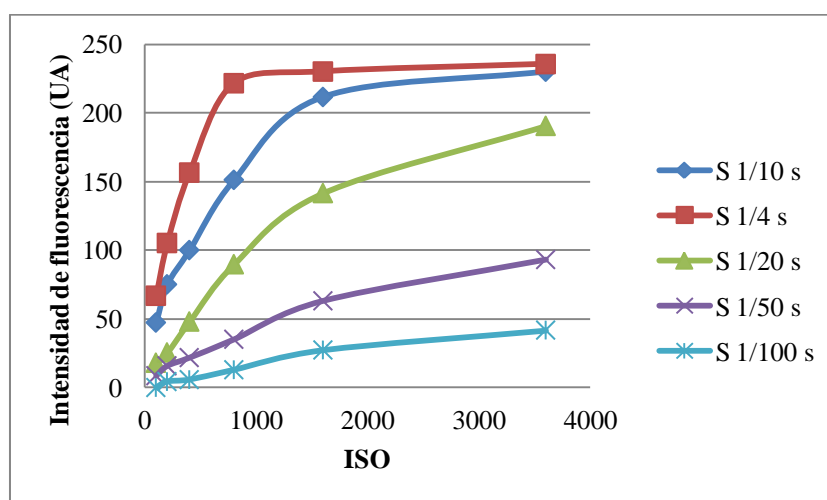


Figura 83. Intensidad a distintas condiciones de ISO y S con la cámara digital. [Flu] = 0.5 μ M, Buffer de fosfatos a una concentración 100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de $MgCl_2$. Se observa una saturación de intensidad con ISO mayor a 800 y 1,600 en los casos de S más largos como 1/4 s y 1/10 s. Del mismo modo se da el más óptimo S a un tiempo de apertura = 1/20 s. Estableciendo así las condiciones óptimas.

6.7 APÉNDICE G

6.7.1 CURVA PATRÓN DE ABSORBANCIA DE LA FLUORESCEÍNA EN ESPECTROFOTÓMETRO

Se elaboró una curva patrón para la absorbancia de la fluoresceína (Sigma aldrich) en un intervalo de concentraciones de 0-30 μ M. Las soluciones de fluoresceína para la curva de calibración son hechas en el mismo buffer de

fosfatos que se usó para el ensayo enzimático (Buffer de fosfatos 100mM pH= 7.5, 1mM MgCl₂).

La absorción de las soluciones de fluoresceína se midió en celdas de cuarzo de 60 µL (Innovative Lab Supply) en el Espectrofotómetro (Cary 50 Bio, Varian) a una λ de onda de 490 nm.

Los resultados obtenidos en el espectrofotómetro para elaborar la curva de calibración se resumen en la tabla 20 y la Figura 84.

Tabla 20. Valores de absorbancia a distintas concentraciones de Fluoresceína

[Fluoresceína]x10 ⁻⁵ M	Abs
6	2.97222
5	2.743015
4	2.302745
3	1.606279
2	1.076812
1	0.679926
0	0.0543993

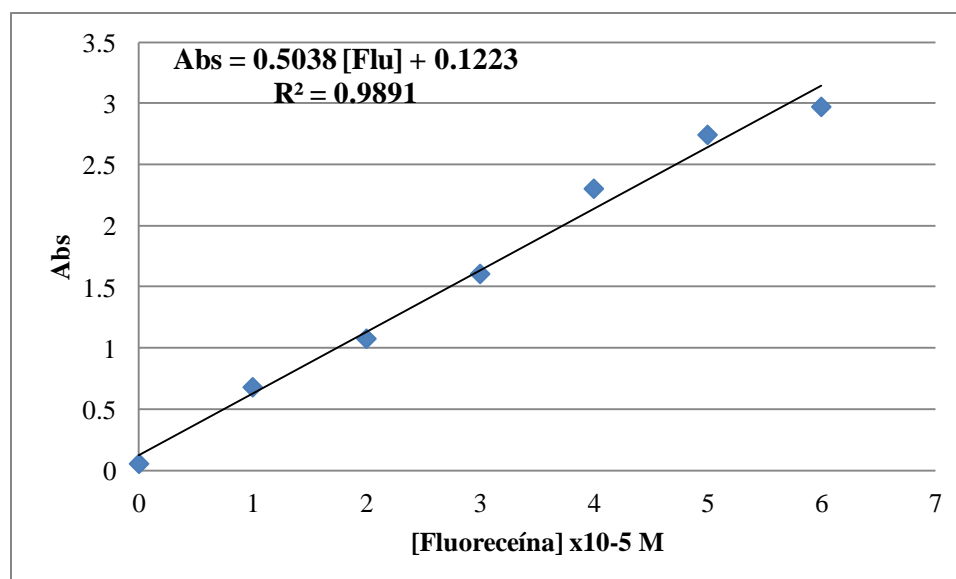


Figura 84. Curva de calibración de fluoresceína en buffer de fosfatos a una concentración 100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de MgCl₂ de 0-60 µM, λ= 490 nm.

6.8 APÉNDICE H

6.8.1 *PÉRDIDA DE FLUORESCENCIA POR EFECTOS DE EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS A LA FASE ORGÁNICA*

Algunas sustancias como reactivos o productos pueden ser extraídas de las microgotas por extracción por parte de la fase orgánica, esto se da cuando una sustancia tiene afinidad por la fase orgánica o por rompimiento de la emulsión en la microgota.

Se consideró la pérdida de fluorescencia como un factor a considerar durante todos los experimentos, ya que si la extracción de fluoresceína a la fase orgánica (aceite mineral) era muy grande, no se podría considerar como válidos los resultados a la hora de la inhibición.

La extracción de fluoresceína se da cuando la fluoresceína llega hasta la interfase microgota-aceite y migra una pequeña cantidad al aceite mineral.

Se monitoreó la pérdida de fluorescencia a lo largo del microcanal. Para el microchip de serpentín, y en puntos estratégicos del diseño de fractales. La pérdida de fluoresceína se evaluó como la diferencia de intensidad entre dos imágenes en distintos lugares del microchip.

6.8.1.1 Pérdida de fluorescencia en microchip con diseño de serpentín

Se evaluó la pérdida de fluorescencia en las gotas dentro de los microcanales haciendo la diferencia entre la fluorescencia de la gota final y la gota inicial en los puntos marcados en la Figura 85. El valor de fluorescencia se obtiene de una imagen tomada en las partes del microcanal señaladas.

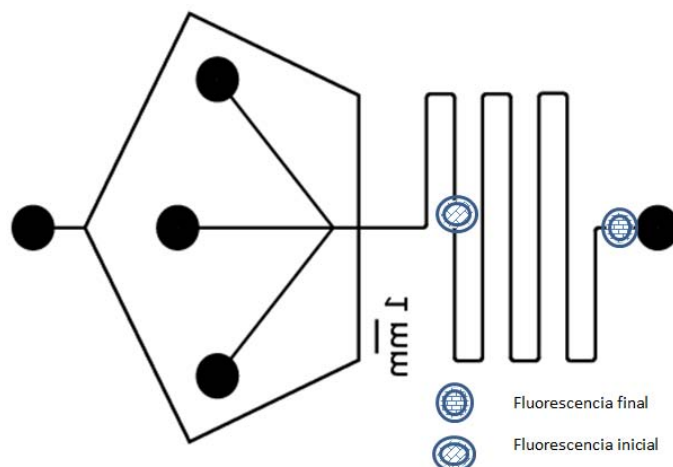


Figura 86. Forma en que se midió la pérdida de fluorescencia en microchip diseño de serpentin.

Los flujos totales probados fueron: 5, 10, 40, 80, 120 y 160 $\mu\text{L/h}$ totales.

Los resultados de pérdida de fluorescencia a distintos flujos se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 21. Pérdida de fluorescencia al final del microcanal a distintos flujos, $[\text{Flu}] = 2.5 \mu\text{M}$, Buffer de fosfatos a una concentración 100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de MgCl_2

Flujo fase acuosa ($\mu\text{L/mL}$)	Flujo fase orgánica ($\mu\text{L/mL}$)	Flujo total ($\mu\text{L/hr}$)	%Pérdida
2	3	5	11.82
5	5	10	17.24
20	20	40	22.83
30	50	80	13.69
50	50	100	9.2
60	60	120	21.87
80	80	160	14.16
-	-	% Promedio de pérdida	15.83

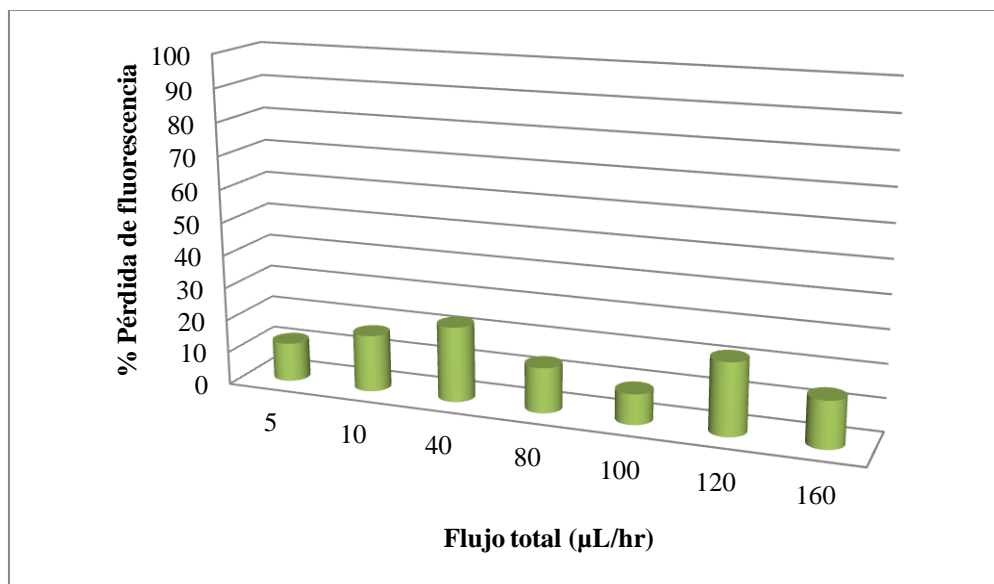


Figura 87. Pérdida de fluorescencia vs. Flujo total. Las medidas de fluorescencia se hicieron al inicio del microcanal y al final del mismo. Condiciones: Aceite mineral + Span 80 al 0.1% m/m. [Fluoresceína] = 2.5 µM, Buffer de fosfatos a una concentración 100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de MgCl₂. Configuración de la cámara digital: ISO 100, S =1/20 s, f=3.5.

De los resultados anteriores, el flujo que se decidió utilizar fue el de 100 µL/h ya que presenta menos pérdida de fluorescencia. Sin embargo, no se da una tendencia clara de pérdida de fluorescencia con respecto al flujo, ya que el promedio muestra que la pérdida es en promedio del 15%. También puede hacerse uso de los flujos de 160 y 80 µL/h, ya que no presentan alta pérdida de fluorescencia. La Figura 88 muestra la pérdida de fluorescencia al inicio y al final del canal para el flujo de 100 µL/h.



Figura 88. a) Fluorescencia al inicio del microcanal un flujo de 80 uL/h. [Fluoresceína] = 30 µM, flujo total= 80 µL/hr b) Fluorescencia al final de microcanal a un flujo de 80 µL/h. [Fluoresceína] = 30 µM, flujo total= 80 µL/hr. Configuración de la cámara digital: ISO 100, S =1/20 s, f=3.5.

6.8.1.2 Pérdida de fluorescencia en microchip con diseño de fractales con adaptación a instrumento HPLC

Para el diseño de fractales se trabajó con un flujo total constante de 150 $\mu\text{L/hr}$. Las imágenes para evaluar la pérdida de fluorescencia tomaron en el centro del microchip (Figura 27). Para esta prueba se utilizó la cámara Phantom con la configuración: velocidad de captura de 24 pps y un tiempo de exposición de 39583.33 μs .

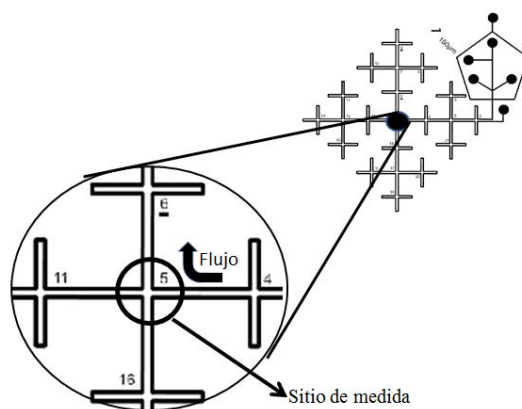


Figura 27. Forma en que se midió la pérdida de fluorescencia en microchip diseño de fractales con adaptación a instrumento HPLC.

Los resultados de pérdida de fluorescencia a distintas concentraciones de fluoresceína dentro del microchip se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 22. Pérdida de fluorescencia al final del microcanal a flujo constante de 150 $\mu\text{L/hr}$, $[\text{Flu}] = 5 - 30 \mu\text{M}$, Buffer de fosfatos a una concentración 100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de MgCl_2

$[\text{Flu}] (\mu\text{M})$	% Pérdida
5	21.4
10	14.3
15	14.9
20	13.4
25	10.4
30	10.9
% Promedio	14.2

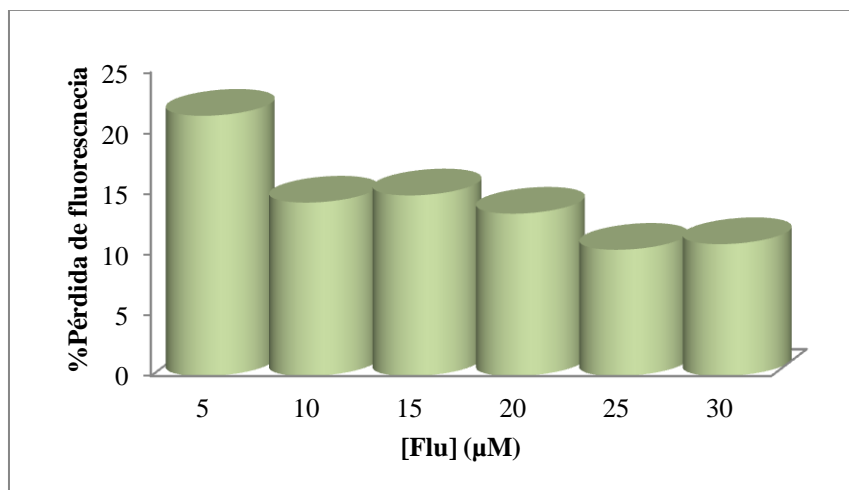


Figura 89. Pérdida de fluorescencia respecto a la concentración de fluoresceína.
Condiciones: Span 80 al 0.1% m/m. [Fluoresceína] = 2.5 μM, Buffer de fosfatos a una concentración 100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de MgCl₂. Configuración de la cámara Phantom velocidad de captura de 24 pps y un tiempo de exposición de 39583.33 μs.

De los resultados anteriores, se observó que la pérdida más significativa se daba cuando la concentración de fluoresceína es de 5 μM. Se da una tendencia de pérdida de fluorescencia a concentraciones de fluorescencia más bajas, siendo las concentraciones más altas las que menos pierden. El promedio de pérdida es de aproximadamente 15%. La Figura 90 muestra el comportamiento de la fluorescencia lo largo del tiempo en el microcanal.

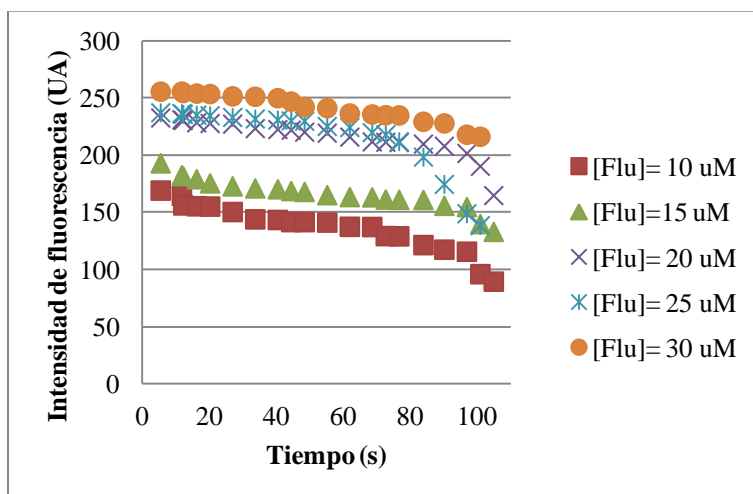


Figura 90. Comportamiento de la intensidad de la fluoresceína en buffer de fosfatos a una concentración 100 mM, pH 7.5 y una concentración de 1 mM de MgCl₂, a lo largo del microcanal.

De los resultados anteriores se concluyó que la pérdida de fluoresceína que se debe de considerar en los ensayos enzimáticos no es muy grande para impedir detectar inhibición en la reacción enzimática. De modo que no pudo ser confundida la pérdida de fluorescencia con la inhibición de la reacción.

7 REFERENCIAS

1. WHO, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*. 2014: p. 238.
2. Abgrall, P. and A. Gue, *Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2007. **17**(5): p. R15.
3. Tabeling, P., *Introduction to Microfluidics*. 2005, Paris: OXFORD University Press. 301.
4. Nge, P.N., C.I. Rogers, and A.T. Woolley, *Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications*. Chemical Reviews, 2013. **113**(4): p. 2550-2583.
5. Squires, T.M. and S.R. Quake, *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*. Reviews of modern physics, 2005. **77**(3): p. 977.
6. München, T.U. *Lab on Chip PCR*. 2015 [cited 2015 24-10-15]; Available from: <http://lab-on-chip.gene-quantification.info/>.
7. Theberge, A.B., et al., *Microdroplets in microfluidics: an evolving platform for discoveries in chemistry and biology*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(34): p. 5846-5868.
8. Muñoz, M.Á. *Principios básicos*. 2015 [cited 2015 Febrero]; Available from: <http://www.manualvuelo.com/PBV/PBV18.html>.
9. Seong, G.H., J. Heo, and R.M. Crooks, *Measurement of enzyme kinetics using a continuous-flow microfluidic system*. Analytical chemistry, 2003. **75**(13): p. 3161-3167.
10. Demello, A.J., *Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 394-402.
11. i Solvas, X., *Droplet microfluidics: recent developments and future applications*. Chemical Communications, 2011. **47**(7): p. 1936-1942.
12. science, P.a.o. *Alterations in swirls within the microdroplets*. 2012; Available from: <http://www.azonano.com/news.aspx?newsID=24602>.
13. Panesar, P.S., et al., *Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006. **81**(4): p. 530-543.
14. Held, P., *Kinetic Analysis of β -Galactosidase Activity using the PowerWave™ HT and Gen5™ Data Analysis Software*, in *Application note*, B.I. Applications Dept., Inc., Editor. 2007.
15. Valeur, B., *Molecular fluorescence: Principles and applications*. 2001, Germany.
16. contributors, W. *Fluorescence microscope*. 2015 [cited 2015 2015]; Available from: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Fluorescence_microscope&oldid=642832662.
17. García, A.R., *Viabilidad de células de E.Coli BL21 dentro de microgotas en microchips por medio de fluorescencia inducida por láser*, in *Fisicoquímica*. 2015, UNAM: Mexico D.F. p. 91.
18. Xiang, N., et al., *Investigation of the maskless lithography technique for the rapid and cost-effective prototyping of microfluidic devices in laboratories*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2013. **23**(2): p. 025016.
19. 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.
20. Rondelez, Y., et al., *Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology*. Nature biotechnology, 2005. **23**(3): p. 361-365.
21. Inc., V.R. *Phantom Miro M110*. 2015 [cited 2015]; Available from: <http://www.visionresearch.com/Products/High-Speed-Cameras/Phantom-Miro-M110/>.
22. 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.

23. Vilker, V.L., C.K. Colton, and K.A. Smith, *The osmotic pressure of concentrated protein solutions: Effect of concentration and ph in saline solutions of bovine serum albumin*. Journal of Colloid and Interface Science, 1981. **79**(2): p. 548-566.
24. Brouzes, E., et al., *Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(34): p. 14195-14200.