



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE MICROFLUÍDICA BASADA EN
MICROGOTAS PARA ENSAYOS CON *E. COLI* UTILIZANDO EL PAR REDOX
RESAZURINA-RESORUFINA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. OCHOA GUERRERO ABRAHAM

TUTOR

DR. LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE MICROFLUÍDICA BASADA
EN MICROGOTAS PARA ENSAYOS CON *E. COLI* UTILIZANDO EL PAR
REDOX RESAZURINA-RESORUFINA**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q. OCHOA GUERRERO ABRAHAM

TUTOR

**DR. LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS
FACULTAD DE QUÍMICA**



Ciudad de México, Noviembre 2018

Jurado Asignado

Presidente:	Dra. Josefina de Gyves Marciniak	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dra. María del Pilar Cañizares Macías	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dra. Rosa María Gómez Espinosa	UAEMéxico
Secretario:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar	Facultad de Química, UNAM

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 326, Bio-Fisicoquímica, Facultad de Química, UNAM.

Tutor:

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

Sustentante:

Q. Abraham Ochoa Guerrero

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría con número de becario 771095 y número de CVU 604111. Así como, por el proyecto de investigación titulado “Búsqueda Masiva de Compuestos Antibacterianos Producidos por Microorganismos no Cultivables Utilizando una Plataforma de Microfluídica” (Clave: 284240).

Al programa de apoyo a la investigación y el posgrado (PAIP 5000-9023) de la Facultad de Química.

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares y al técnico académico Carlos Mujica Jiménez por la oportunidad para el uso de equipo de laboratorio.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras, quien me ha apoyado desde que lo conocí, agradezco sus consejos y su tiempo, así como toda la confianza y oportunidades que me ha brindado.

Agradezco a los integrantes del jurado, cuyos comentarios y correcciones ayudaron a mejorar este trabajo.

A todos los integrantes del ex 309 y a todos mis amigos que ayudaron no enloqueciera mucho en el camino.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos, por todo lo que me han brindado, por estar siempre a un lado y apoyarme en este camino.

Resumen

En el año de 2014 la organización mundial de la salud (OMS) emitió un comunicado alertando a la comunidad sobre la problemática de la resistencia microbiana hacia los antibióticos comunes y de última generación. Según los datos recabados por la OMS si no se toman medidas en este asunto, para el año 2050 el número de muertes debidas a casos de resistencia bacteriana será un problema de salud aún más grave que el cáncer hoy en día. Dicho reporte sugiere direccionar las actividades científicas hacia la búsqueda de antibióticos con nuevos andamiajes moleculares. Sin embargo, las técnicas convencionales para esta labor han resultado ineficientes debido a sus largos tiempos de experimentación, sus elevados costos de automatización y su alto consumo de reactivos. Ante este panorama se presenta la microfluídica, la cual es una técnica que permite la manipulación de líquidos confinados en canales de algunas cuantas décimas de micras. La capacidad de la microfluídica para utilizar flujos de fases inmiscibles en un mismo microchip, ha permitido desarrollar la microfluídica basada en microgotas de algunos cuantos picolitros hasta decimas de nanolitros. En estas microgotas es posible encapsular poblaciones pequeñas de bacterias y obtener información sobre las células encapsuladas mediante diferentes técnicas de detección.

En este trabajo se propone una plataforma de microfluídica basada en microgotas útil para la evaluación de los cambios en el metabolismo bacteriano en ausencia o en presencia de alguna sustancia con posible actividad antibiótica. Los ensayos se llevan a cabo mediante fluorescencia, haciendo uso de resazurina, un marcador fluorogénico que indica la capacidad metabólica de las células vivas. Mediante microscopia de fluorescencia y análisis de imágenes, fue posible evaluar la actividad metabólica de células de *Escherichia coli* en microgotas de 380 pL y en un tiempo de análisis de alrededor de tres horas. Así, con este sistema se estableció la actividad antibacteriana de la kanamicina como control positivo y se probó el extracto natural de la raíz de *Pelargonium sidoides*.

Contenido

1	Planteamiento del problema	1
2	Antecedentes	7
2.1	Viabilidad bacteriana	8
2.2	Resazurina – Resorufina propiedades químicas y fotoquímicas	11
2.2.1	Absorción.....	12
2.2.2	Emisión.....	13
2.3	Microscopía de fluorescencia	14
2.4	Microfluídica	15
2.5	Microfluídica basada en microgotas.....	17
2.5.1	Aplicaciones en microbiología.....	20
2.5.2	Ensayos bacterianos en microgotas	24
3	Objetivo	30
4	Hipótesis	30
5	Metodología	31
5.1	Fabricación de dispositivos de microfluídica (microchips)	32
5.2	Plataforma de Microfluídica	35
5.2.1	Formación de microgotas.....	36
5.2.2	Manipulación de microgotas.....	37
5.2.3	Análisis de microgotas.....	39
5.2.4	Arreglo óptico para la interrogación de microgotas	40

5.2.5	Determinación de la intensidad de fluorescencia en microgotas.....	41
5.3	Ensayos celulares en microgotas.....	44
5.3.1	Preparación de disoluciones.....	44
5.3.2	Ensayos celulares en placas de 96 pozos	45
6	Resultados y discusión	47
6.1	Caracterización física de microchips.....	48
6.2	Formación de microgotas	49
6.3	Incubación de microgotas.....	51
6.4	Ensayos celulares utilizando la plataforma de microfluídica.....	54
6.4.1	Ensayos sin antibióticos.....	54
6.4.2	Ensayos sin bacterias.....	61
6.4.3	Ensayos en presencia de antibiótico (kanamicina)	63
6.4.4	Pruebas con un extracto natural (raíz de <i>Pelargonium sidoides</i>).....	67
6.5	Comparación de resultados en microfluídica	69
6.6	Resultados adicionales.....	71
7	Resumen de resultados	77
8	Conclusión	79
9	Perspectivas.....	80
10	Anexo 1.	81
10.1	Código de matlab para la determinación de intensidad de luz en microgotas mediante análisis de video.	81
11	Referencias.....	82

Lista de abreviaturas

2YT	Medio de cultivo <i>Two yeast tryptone</i>
4-MU	4-metilumbeliferona
4-MUNANA	Ácido-2-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico
c/s	Cuadros sobre segundo
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
FDA	Food and drug administration
<i>FDA</i>	Diaceteto de fluoresceína
KryJeff	Surfactante. Unión química de Krytox y Jeffamina
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LIF	Fluorescencia inducida por láser
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDMS	Polidimetilsiloxano
Px	Píxeles
Rf	Resorufina
RM	Resistencia microbiana
RPM	Revoluciones por minuto
Rz	Resazurina
TB	Medio de cultivo <i>Terrific broth</i>

1 Planteamiento del problema

Uno de los temas más recurrentes en las novelas de ciencia ficción es la extinción de la humanidad. Por ejemplo, H.G. Wells en su novela *War of the worlds*, describe una invasión extraterrestre que comienza un exterminio de la humanidad. Sin embargo, tras días de asedio los extraterrestres comienzan a morir sin razón aparente, pues ellos, no habían tomado en cuenta la existencia de microorganismos patógenos como, bacterias, virus y hongos. Una de las conclusiones de la novela es que los humanos nos hemos ganado nuestro lugar en la tierra mediante la inmunidad a los organismos patógenos que la habitan. A través de nuestra existencia hemos aprendido a controlar y curar las enfermedades que diversos microorganismos nos provocan. A pesar de ello, en la actualidad existen ciertos comportamientos irresponsables sobre el uso de los antibióticos. Por ejemplo, una encuesta realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2015 preguntó: ¿Cuándo fue la última vez que consumió algún antibiótico? ^{1,2}. En la figura 1-1 se muestra que el 65 % de las personas encuestadas han consumido algún antibiótico en los últimos 6 meses, en muchos casos debido a una prescripción médica para la atención o prevención de infecciones e incluso por automedicación.

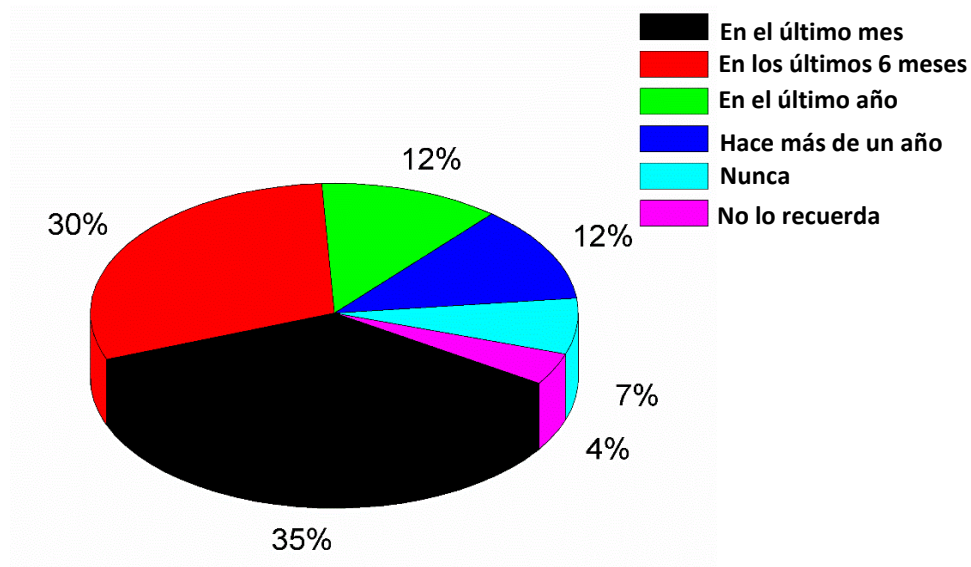


Figura 1-1. Resultados de una encuesta realizada por la OMS en el año 2014, se responde a la pregunta, ¿Cuándo fue la última vez que consumió algún antibiótico?

Cuando una bacteria está en contacto continuo con algún antibiótico, se pueden producir mutantes que proliferan y generan colonias enteras de bacterias resistentes al antibiótico. Un caso interesante de resistencia antimicrobiana se ha documentado en algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, la cual es una bacteria que se puede alojar en la sangre y tejidos como la piel o pulmones, causando neumonía una enfermedad con alto índice de mortalidad^{3,4}. Esta bacteria ha presentado resistencia antibiótica con mucha facilidad, tal es el caso de la cepa resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) que apareció dos años después de la introducción de este medicamento en el mercado, en 1969⁵. En la actualidad MRSA está presente en muchos hospitales y es causante de una gran número de muertes⁶.

En el 2014 la OMS emitió un comunicado sobre el número de muertes por año debido a diferentes enfermedades. Como se indica en las regiones azules de la figura 1-2, alrededor de 8.2 millones de personas murieron debido al cáncer en 2014, seguido por la diabetes y la diarrea en número de muertes. En ese año, al menos 700 mil personas fallecieron debido a algún caso de resistencia microbiana (RM), cifra aún menor que la cantidad de personas que perecieron debido a accidentes automovilísticos. Sin embargo, lo alarmante de este reporte es que según la OMS y sus datos recaudados, si no se toman las consideraciones adecuadas, el número de muertes debido a la RM puede alcanzar los 10 millones de personas para el 2050, una cifra mucho mayor que la de muertes debidas al cáncer hoy en día⁷.

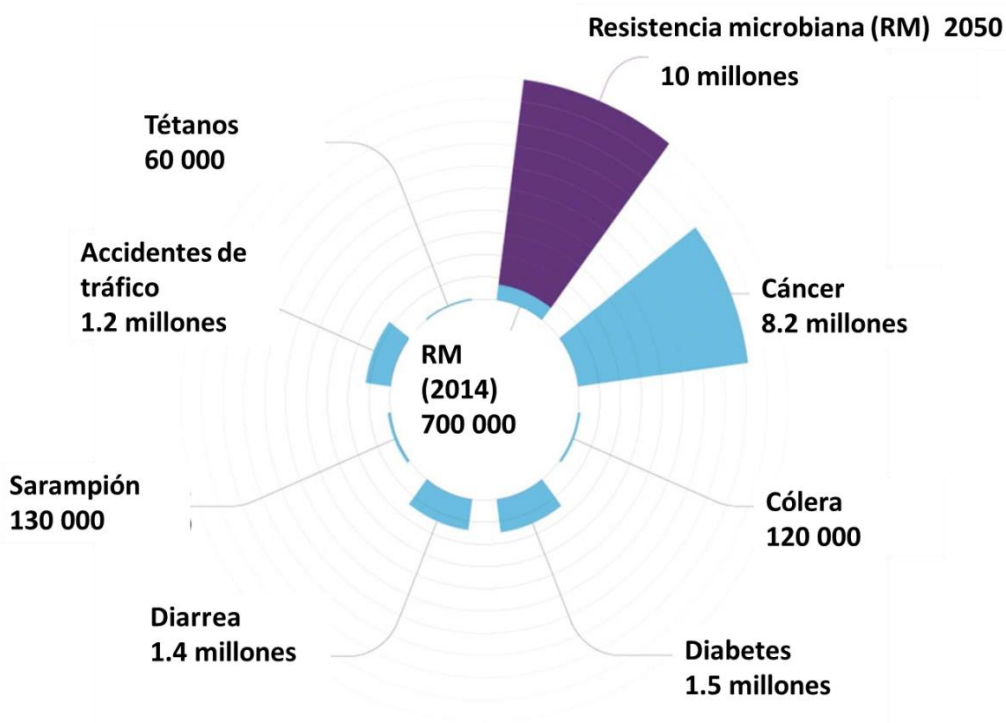


Figura 1-2. En las regiones azules se ilustra el número de muertes debido a diferentes enfermedades en el año 2014 y en morado un estimado según la OMS del número de muertes que podrían provocar casos de resistencia microbiana (RM) para el 2050 si no comenzamos a tomar cartas en el asunto. Tomado y modificado de la referencia 7

No solo la velocidad con la que se observa la aparición de resistencia microbiana es alta. Pareciera que la velocidad a la que se desarrollan medicamentos es también ineficiente. Por ejemplo, tras la introducción de la penicilina en 1928, solo se han desarrollado algunas familias de antibióticos muy similares estructuralmente, como lo son las cefalosporinas y carbapenemas. Es hasta 1980, con la introducción de las fluoroquinolonas, que se observa un cambio considerable en las estructuras de los antibióticos. Sin embargo, a partir de los 80's el descubrimiento de antibióticos con nuevos andamiajes ha sido escaso (Figura 1-3)^{6,8}, debido en parte a la complejidad que implica el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos.

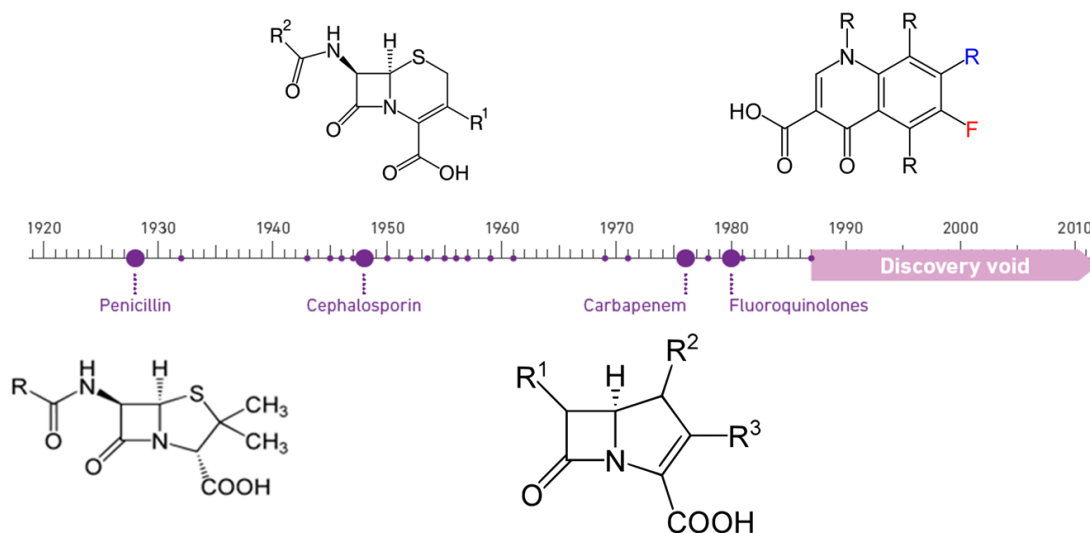


Figura 1-3. Línea del tiempo para la introducción de nuevos antibióticos. Tomado y modificado de la referencia 6

Una de las fuentes más fructíferas para el descubrimiento de nuevos antibióticos son los productos naturales. De 1981 al 2014, alrededor del 40 % de las moléculas que han sido aprobadas por la FDA se originaron a partir de algún producto natural⁹, ya sea de plantas o de microorganismos.

Una de las técnicas más comunes para la identificación de metabolitos con actividad bactericida utiliza cajas Petri, en donde se pueden consumir varios litros de reactivos y disolventes para ensayos masivos que prueban bibliotecas de miles de compuestos. Una segunda técnica común es la de microdilución en platos multipozos que han logrado miniaturizar hasta unos cuantos microlitros mediante el uso de placas de 1536 pozos. Sin embargo, para la automatización de estos ensayos se requiere de sistemas robotizados muy sofisticados que manipulen las placas y permitan el muestreo de bibliotecas grandes de compuestos, aumentando dramáticamente los costos del ensayo. Aunado a esto, un muestreo de alrededor de 10^6 miembros de una biblioteca de compuestos puede llevar varios días y consumir un gran volumen de reactivos.

Ante este panorama, la microfluídica se ha presentado como una alternativa para la miniaturización y automatización de ensayos químicos y biológicos. Durante los últimos 20 años se ha observado un desarrollo acelerado de esta técnica¹⁰. La microfluídica permite

la manipulación de líquidos confinados en canales que van desde décimas a algunos cuantos cientos de micras, ésta tecnología ha demostrado una miniaturización hasta el orden de los picolitros con una elevada automatización y velocidad en el manejo de los ensayos a costos y volúmenes muy reducidos (figura 1-4) ^{11,12}

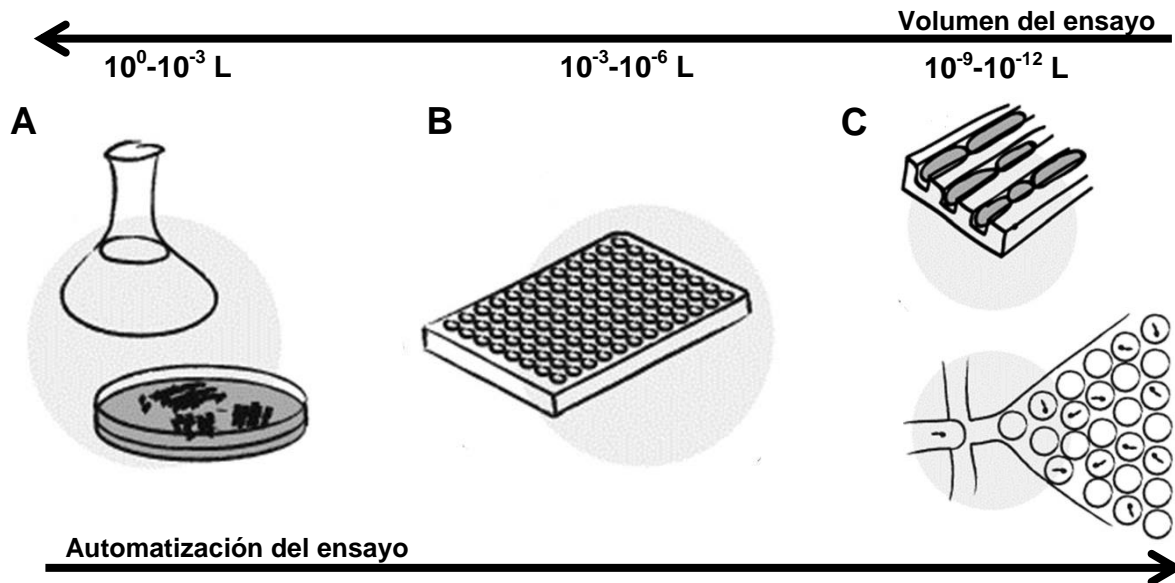


Figura 1-4. (A) Diferentes técnicas para el cultivo y análisis de microorganismos. (A) Técnicas a macro escala que pueden consumir litros de reactivo tal como ensayos en disolución o cajas petri. (B) Ensayos en placas de pozos que permiten una disminución de volumen no menor a los 10 μ L y una mayor automatización a costa de precios muy elevados. (C) Técnicas basadas en microfluídica que permiten la manipulación de líquidos confinados en canales del orden de micras y la formación de microgotas de fase acuosa dispersas en aceite que contienen los microorganismos. Esta técnica permite reducir el volumen de reactivos desde decimas de nL hasta el orden de los pL. Imagen tomada y modificada de la referencia 12.

Así, el presente trabajo propone una plataforma de microfluídica basada en microgotas útil para la evaluación de diferencias en el metabolismo bacteriano en ausencia o en presencia de alguna sustancia, y que permita dilucidar capacidad como agente antibiótico. Los ensayos se miden mediante fluorescencia, haciendo uso de un marcador fluorogénico que indica la capacidad metabólica de las células vivas. Mediante microscopia de fluorescencia y análisis de videos fue posible evaluar la actividad metabólica de células de *E. coli* en microgotas, haciendo uso de una cantidad minúscula de reactivos (menos de 0.5 mL por cada reactivo) y en un tiempo de análisis de alrededor de tres horas.

2 Antecedentes

2.1 Viabilidad bacteriana

La viabilidad bacteriana se puede definir como la capacidad de las células bacterianas para crecer en colonias visibles sobre un medio con los suplementos necesarios para que se lleve a cabo su ciclo celular. Dicho concepto resulta muy controvertido, pues implica que la bacteria sea cultivable en medios comunes de laboratorio que contengan los nutrientes adecuados (LB, 2YT, TB, etc.). Sin embargo, se sabe que una gran cantidad de microorganismos no se han logrado cultivar bajo estas condiciones a pesar de contar con un metabolismo adecuado ¹³. Así mismo, por métodos tradicionales como el conteo en cajas Petri o placas de pozos, el tiempo necesario para poder observar una colonia bacteriana va desde 6 hasta 24 horas, dependiendo de la cepa en estudio ¹⁴. De tal forma, resulta obvia la necesidad de otros parámetros, más allá del mencionado inicialmente, que permitan deducir si una célula es o no viable y que además consuman menos tiempo para lograr su detección.

Existen ciertos indicadores a nivel unicelular que proporcionan información para evaluar la viabilidad bacteriana, Por ejemplo: (i) que la membrana celular se encuentre intacta; (ii) la capacidad de transcripción del ADN y traducción del ARN; (iii) la generación de la energía necesaria para mantener el metabolismo celular, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos; (iv) y el crecimiento y multiplicación ¹⁴. Con base en estos criterios se han desarrollado diferentes métodos para la evaluación de la viabilidad celular.

Las técnicas de fluorescencia para la evaluación de ésta capacidad son de las más utilizadas debido a su alta sensibilidad, velocidad y eficiencia. Durante las últimas décadas, en la literatura se han reportado una gran variedad de compuestos fluorescentes o sustratos fluorogénicos que permiten evaluar la capacidad metabólica de bacterias, ya sea mediante el seguimiento de alguna actividad enzimática, cambios en el pH o permeabilidad de la membrana ¹⁵.

Por ejemplo, la tinción individual de células viables y no viables se ha logrado con una amplia variedad de agentes fluorescentes. El kit *LIVE/DEAD* de *Invitrogen*TM, es uno de los productos más comercializados con estos fines¹⁶. Este kit se compone de dos compuestos que se logran intercalar en el ADN o ARN dando lugar a un complejo altamente fluorescente. El compuesto patentado SYTO®9 es el primero de éstos, y se sabe que se trata de una molécula sin cargas que puede atravesar la membrana celular sin dificultad en células vivas y muertas. Una vez dentro de la célula, la molécula se intercala en el ADN o ARN formando el complejo fluorescente que permite identificar tanto células viables como no viables mediante tinción celular. El Yoduro de propidio es el segundo compuesto del kit y solo tiñe células no viables. Debido a que la molécula de yoduro de propidio presenta cargas formales en su estructura no puede atravesar la membrana celular, al menos que ésta se encuentre comprometida (Figura 2-1). Cuando una célula no es capaz de sintetizar los compuestos necesarios para mantener la estabilidad de su membrana se puede considerar no viable¹⁶.

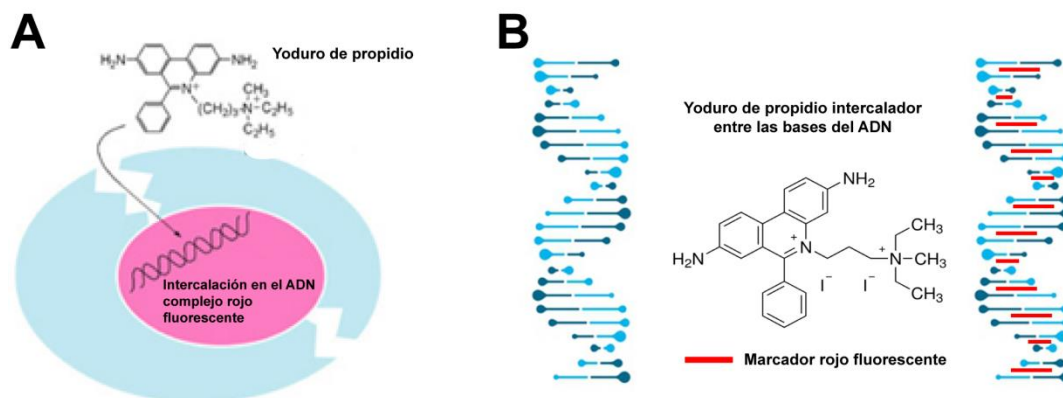


Figura 2-1. (A) Esquema del mecanismo para la tinción de células no viables con yoduro de propidio. Al ser una molécula cargada solo puede atravesar la membrana cuando esta se encuentra comprometida. (B) El yoduro de propidio, así como otros compuestos utilizados con los mismos fines, se intercala entre las bases del ADN formado complejos altamente fluorescentes.

Otros compuestos utilizados con estos fines han sido reportados, algunos son: el bromuro de etidio, el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), el naranja de acridina, entre otros. Todos estos han sido ampliamente utilizados en citometría de flujo y microscopía de fluorescencia¹⁷. Alternativamente se han modificado genéticamente algunas bacterias para que sean capaces de expresar alguna proteína fluorescente y monitorear el crecimiento celular mediante el seguimiento de la expresión de esta proteína^{17,18}.

Por otra parte, se han desarrollado diferentes sustratos para la evaluación de la viabilidad celular mediante alguna actividad enzimática. Éstos, al inicio, pueden no presentar fluorescencia o una intensidad muy baja de la misma y tras la reacción enzimática se produce una molécula altamente fluorescente. Los ejemplos más comunes son el di-acetato de fluoresceína (FDA, por sus siglas en inglés) o calceína-AM. Ambos compuestos constan de una molécula de fluoresceína con distintos sustituyentes que impiden su fluorescencia y neutralizan las cargas de la molécula. En ambos casos, se trata de un sustrato sin cargas formales que atraviesa la membrana celular y al ser hidrolizado por la actividad de esterasas dentro de células viables, la molécula de fluoresceína queda libre para su detección excitando la molécula con luz de alrededor de 488 nm. Cabe mencionar que la salida de fluoresceína de la célula se ve impedida por la polaridad de la molécula (figura 2-2) ^{15,17}.

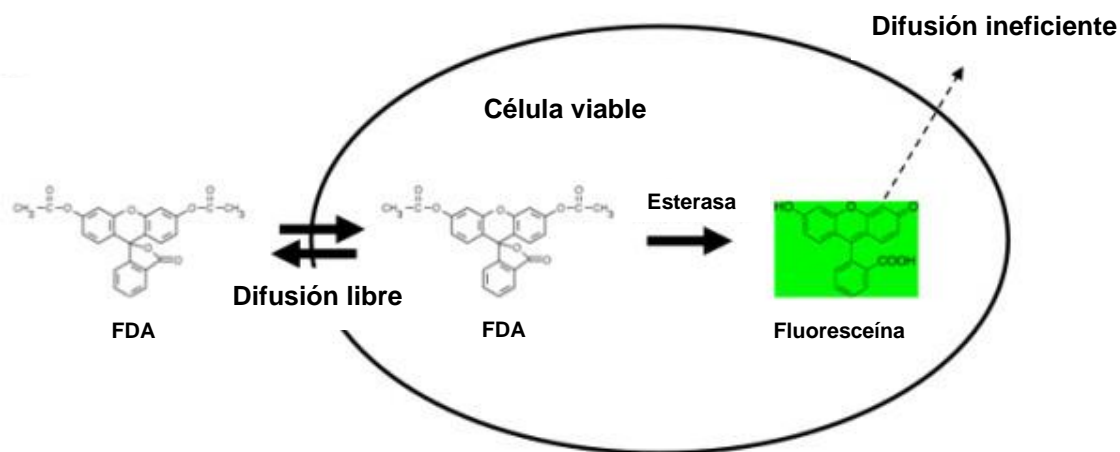


Figura 2-2 Esquema de tinción de células viables con diacetato de fluoresceína (FDA). El sustrato FDA entra en la célula y se hidroliza por la actividad de la esterasas dentro de la misma produciendo fluoresceína como un marcador fluorescente de células viables.

Sin embargo, la tinción de células individuales no siempre es la propiedad más utilizada para la evaluación de la viabilidad bacteriana. Algunos compuestos, como las tintas de tetrazolio ¹⁹ o el N-óxido de resazurina (Rz) ²⁰, pueden ser reducidos intracelularmente por enzimas que participan en el sistema de transporte de electrones, en la membrana citosólica de las bacterias durante la respiración celular. A diferencia de los casos

anteriores, estos indicadores fluorescentes no se quedan retenidos dentro de la célula, y pueden cruzar la membrana de un lado a otro quedando disueltos en el medio. Por lo tanto, también se puede evaluar la viabilidad bacteriana mediante la medición de fluorescencia en el bulto del reactor. Así, un aumento en la intensidad de fluorescencia a través del tiempo indica que hay un metabolismo activo y que las células son viables. Debido a que en este trabajo se utiliza Rz como marcador de viabilidad celular, a continuación se hace un análisis más a fondo de este compuesto.

2.2 Resazurina – Resorufina propiedades químicas y fotoquímicas

La resazurina (Rz), también conocida como Alamar Blue, es un colorante heterocíclico con un grupo funcional N-óxido ampliamente utilizado en ensayos biológicos²⁰. Éste compuesto es de baja fluorescencia y puede ser reducido intracelularmente por enzimas que participan en la respiración celular, dando como producto la especie reducida resorufina (Rf), la cual presenta mayor intensidad de fluorescencia que la Rz²¹. Esta propiedad del par redox permite diferenciar a las células viables, capaces de metabolizar el sustrato Rz (figura 2-3) y observándose un aumento en la intensidad de fluorescencia a través del tiempo, de las células no viables incapaces de metabolizar Rz y cuya intensidad de fluorescencia sería estacionaria (figura 2-3)^{20,22}.

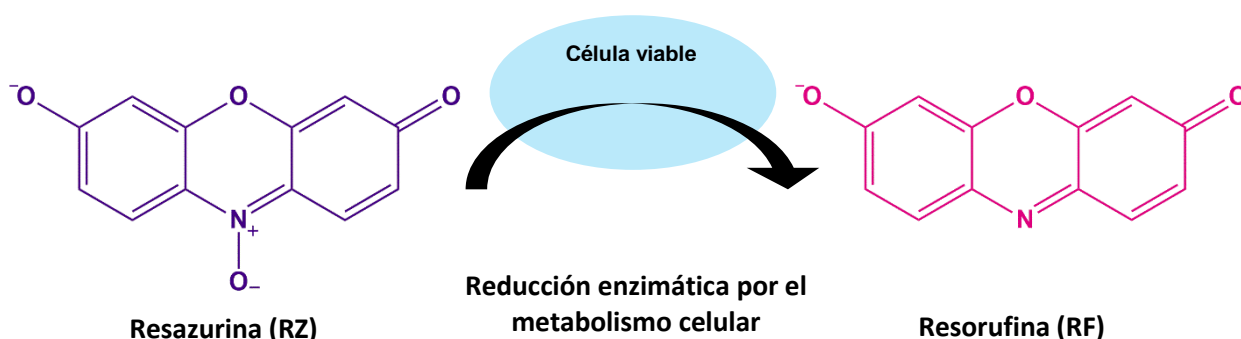


Figura 2-3. Esquema de transformación de resazurina (Rz) en resorufina (Rf) debido a la actividad de enzimas que participan en la respiración celular. Solo las células viables pueden llevar a cabo esta reacción, por lo tanto, Rz se puede utilizar como un indicador de la actividad metabólica de células viables.

Cabe mencionar que la intensidad de absorción y emisión de estos compuestos es dependiente del pH, y sus máximos de absorción y emisión se pueden desplazar algunos nanómetros cuando se modifica la cantidad de tensoactivos en el medio^{23,24}.

2.2.1 Absorción

El espectro de absorción en el UV-vis de soluciones básicas acuosas de Rz en un rango de concentraciones de 0.5 a 30 μM , presenta un máximo a 602 nm y un máximo relativo de menor intensidad a 380 nm correspondientes a las transiciones $\pi\pi^*$ y $n\pi^*$ del grupo N-óxido, respectivamente. La intensidad de la banda de absorción a 602 nm es dependiente del pH, como se observa en la figura 2-4 A, y disminuye de pH básico hacia valores de pH neutro; de pH 7 a pH 3 la intensidad de la banda disminuye muy rápidamente. En éste mismo intervalo de pH aparece una banda de absorción entre los 400 y los 600 nm, debida a la protonación del oxígeno cargado (pK_a 5.5, Rz) ²³. Por otra parte, la Rf presenta un espectro de absorción con una banda centrada en 572 nm y un hombro a 535 nm. De igual forma que la Rz, en Rf la intensidad de la banda a 572 nm disminuye el pH cambia de 12 a 7.5. A valores de pH menores, la intensidad de la banda a 572 nm de la Rf disminuye drásticamente y aparece una nueva banda centrada en 485 nm (figura 2-4 B). Nuevamente, el cambio se atribuye a la protonación del oxígeno cargado (pK_a 5.8, Rf) ^{23,25}

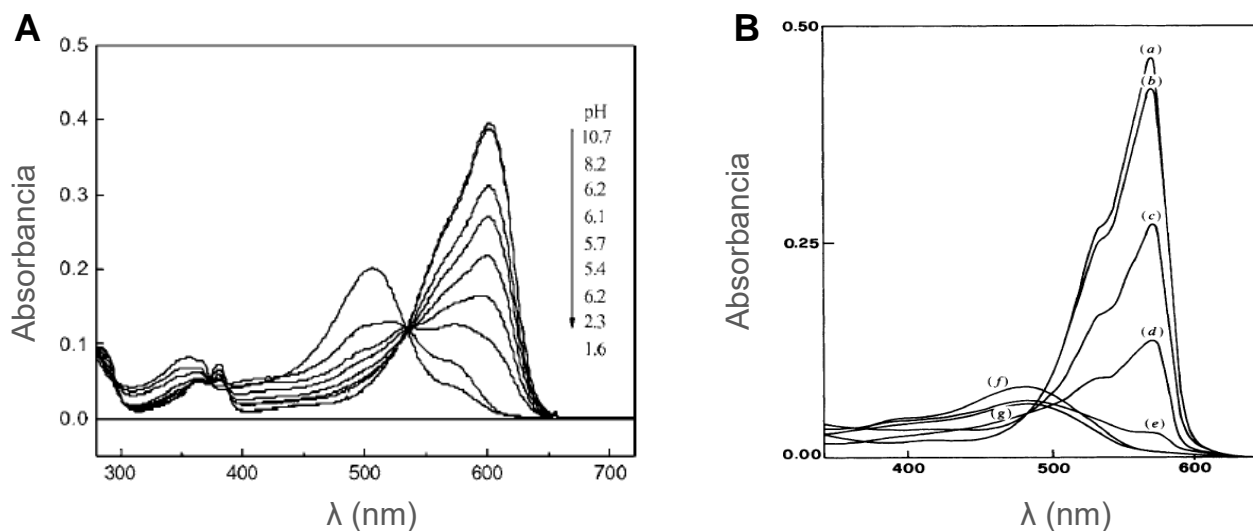


Figura 2-4. (A) Espectro de absorción de Rz a diferentes valores de pH (tomado de 23). (B) Espectro de absorción de Rf a diferentes valores de pH (tomado de 25). En ambos casos se observa una clara dependencia de la absorción con el pH. A pH muy bajos la molécula deja de absorber debido a la protonación. En B (a) pH 12, (b) pH 8, (c) pH 7, (d) pH 6, (e) pH 5, (f) pH 3, (g) pH 1.

2.2.2 Emisión

En la Figura 2-5 se puede observar que cuando Rz se excita a 602 nm, su máximo de absorción, presenta un espectro de fluorescencia con una banda ancha centrada a 654 nm (línea azul), y la intensidad de fluorescencia es dependiente del pH en el intervalo de 12-7.5 sin modificar la longitud de onda. En el caso de Rf (línea roja), al excitarse a 570 nm se emite un espectro con una banda centrada en 585 nm, y la intensidad de fluorescencia de este compuesto es mucho mayor que el caso de la Rz. Esta observación es consistente con los tiempos de vida de la fluorescencia (τ_f) reportados por *Bueno et. Al.*, de 0.7 ns para la Rz y 2.9 ns para la Rf^{23,26}.

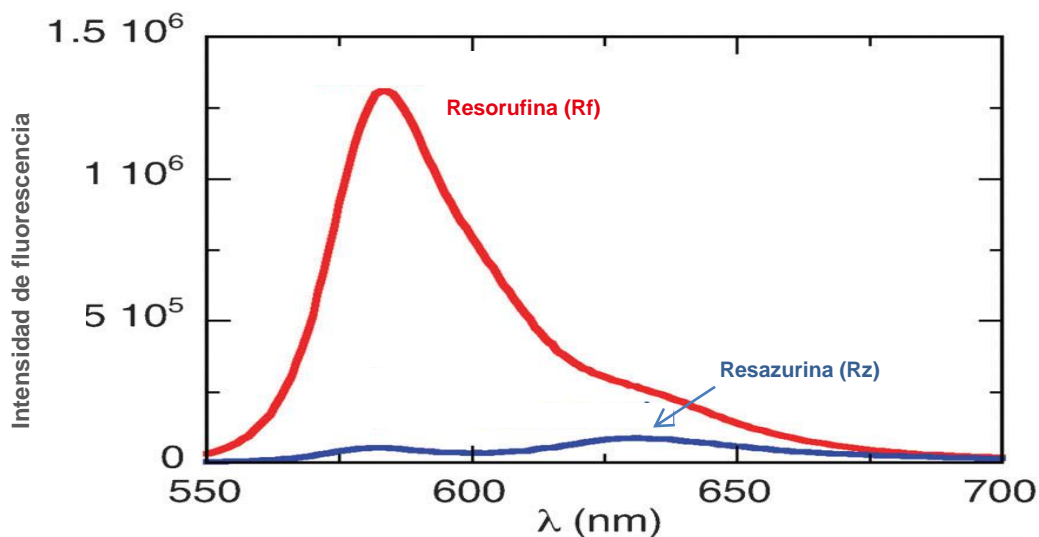


Figura 2-5. Espectro de fluorescencia de Rz (azul) y Rf (rojo) a 0.1 de absorbancia excitando a 532 nm. Se observa que la intensidad de fluorescencia es mucho mayor para Rf que para Rz. Tomado de la referencia 26

2.3 Microscopía de fluorescencia

El desarrollo de fluoróforos, como los que se presentaron en la sección anterior, ha estimulado fuertemente el progreso de métodos para la detección de especies marcadas con alguno de estos. Hoy en día la técnica de microscopía de fluorescencia es una herramienta esencial en el área de la biología, medicina y bioquímica, y ha permitido identificar células independientes, organelos e incluso macromoléculas retenidas dentro de una célula ²⁷.

La función básica de la microscopía de fluorescencia es irradiar una muestra fluorescente, con una banda apropiada de longitudes de onda, a través del objetivo del microscopio y recolectar la luz de emisión a través del mismo objetivo. En la figura 2-6 se muestra un esquema para un arreglo común de análisis de fluorescencia por ésta técnica. La luz de excitación se provee por una lámpara de mercurio o xenón y las longitudes de onda requeridas se seleccionan mediante filtros de paso de banda (filtro de excitación). La luz de emisión se separa de la luz de excitación a través de un espejo dicroico y un segundo filtro de paso de banda (filtro de emisión). Un arreglo adecuado permite que solo la luz de emisión llegue al ojo o el detector. Sin embargo, no siempre se logra un funcionamiento ideal, debido en parte a que la luz de excitación es de mucho mayor intensidad que la luz de emisión (de cientos de miles a millones de veces) ^{27,28}

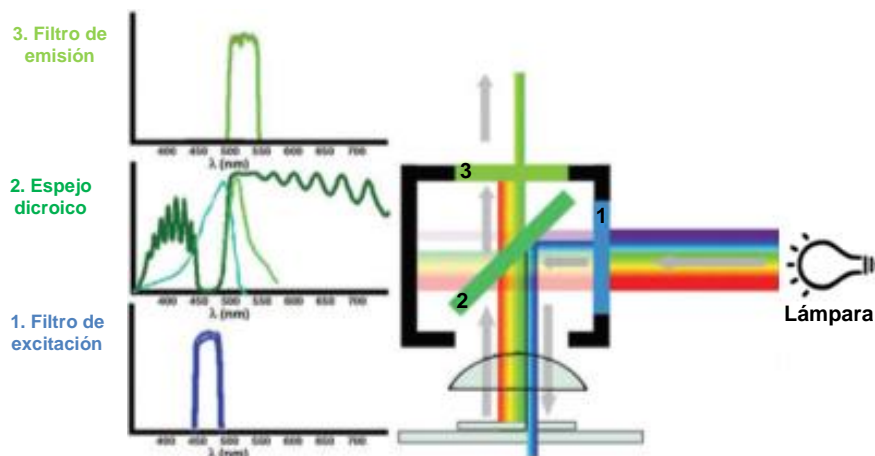


Figura 2-6. Esquema de la trayectoria de la luz que sigue un microscopio de epi-fluorescencia. La fuente de luz es una lámpara de luz blanca que incide primero en el filtro de excitación (1), este permite solo el paso de una banda delgada de longitudes de onda adecuada para excitar a la muestra. La luz filtrada se refleja sobre un espejo dicroico (2) y se direcciona hacia la muestra a través del objetivo del microscopio. Parte de la luz que emite la muestra se captura por el objetivo del microscopio y se manda hacia el espejo dicroico, en este caso la luz no se refleja, al contrario pasa a través del dicroico y se encuentra finalmente con el filtro de emisión (3). El filtro de emisión también es un filtro de paso de banda que solo permite el paso de las longitudes de onda que emite la muestra.

2.4 Microfluídica

La microfluídica es una tecnología que desarrolla sistemas que permiten manipular volúmenes muy pequeños de fluidos (10^{-9} a 10^{-18} litros), confinados en canales que van desde decenas a cientos de micrómetros dependiendo de su aplicación (dimensiones comparables con el grosor de un cabello). La microfluídica cuenta con ciertas características que le han permitido ser aplicada en una gran cantidad de ensayos químicos y biológicos, como: (i) el uso de una cantidad muy pequeña de muestras y reactivos, menor a un mililitro por un día de experimentos; (ii) la facilidad de automatización y control de las condiciones del medio, lo que le permite realizar una gran cantidad de ensayos en un tiempo corto; (iii) es una técnica compatible con sistemas de detección de alta sensibilidad (fluorescencia, electroquímicos, absorbancia y difracción de la luz); (iv) y los costos son bajos en comparación con técnicas comunes como ensayos masivos en placas o cajas de Petri ¹⁰.

Desde los inicios del desarrollo de la técnica, los dispositivos de microfluídica, conocidos también como microchips, se han fabricado en diversos materiales. Algunos de ellos son materiales rígidos como vidrio y silicón, y se requiere el uso de técnicas de grabado para la disposición de los canales en el material. Los canales obtenidos en estos materiales suelen ser de muy buena calidad y de costo elevado. Por otro lado, el uso de polímeros suaves para la fabricación de microchips ha sido más ampliamente reportado ¹⁰. La gran mayoría de los dispositivos de microfluídica se fabrican a base del polímero suave polidimetilsiloxano (PDMS), el cual es un polímero biocompatible, de bajo costo y ópticamente transparente en longitudes de onda entre 235 y 1100 nm ^{29,30} (figura 2-7 B). La fabricación de los microchips de PDMS se realiza mediante litografía suave. Esta técnica permite transferir un patrón al PDMS mediante un molde maestro, y el molde se construye a base de la resina fotosensible SU-8 soportada sobre una oblea de silicio haciendo uso de fotolitografía ³¹. La réplica obtenida de PDMS se puede pegar a vidrio u otra superficie de PDMS, sin necesidad de adhesivos, mediante una descarga de plasma sobre la superficie de ambas piezas (réplica de PDMS y superficie de vidrio o PDMS). Tras la descarga, las superficies expuestas se ponen en contacto y se dejan curar una noche a

70 °C. Entonces, se obtiene un microchip con el diseño de canales deseado ²⁹ (figura 2-7). Una descripción más amplia de esta técnica se presenta en la sección de metodología.

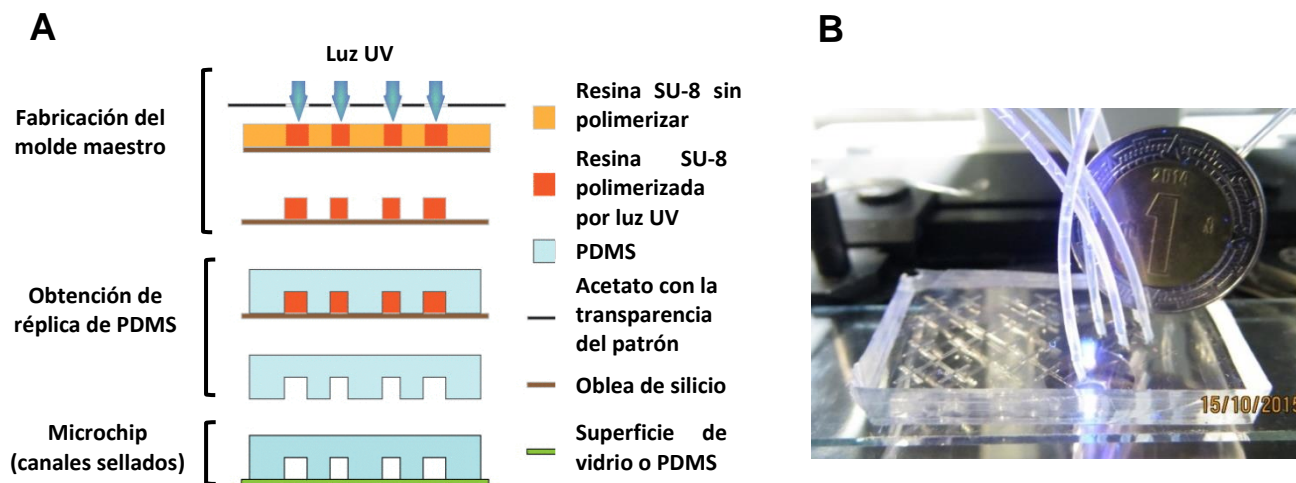


Figura 2-7. (A) Esquema de fabricación de microchips de microfluídica mediante la técnica de fotolitografía suave. (B) Dispositivo de microfluídica fabricado en el laboratorio de trabajo, se observa que sus dimensiones son comparables con una moneda de un peso mexicano. En el centro del microchip se observa una luz que atraviesa el dispositivo y comprueba la transparencia del PDMS.

La microfluídica explota su característica más obvia que es su diminuto tamaño. Sin embargo, también explota su característica menos obvia, el régimen de flujo laminar dentro de los microcanales descrita por la ley de Taylor ³². Dicha propiedad le permite controlar las condiciones del medio fácilmente generando gradientes de concentración con perfiles Gaussianos ³³.

El alcance de la microfluídica se ha observado en un gran número de aplicaciones reportadas en la literatura: síntesis orgánica de compuestos marcados con ¹⁸F con fines médicos ³⁴, cinéticas enzimáticas para la búsqueda de inhibidores ^{35,36}, ensayos celulares ³⁷, cristalización de proteínas ³⁸, entre muchos otros. Algunos resultados de estos trabajos se muestran en la figura 2-8.

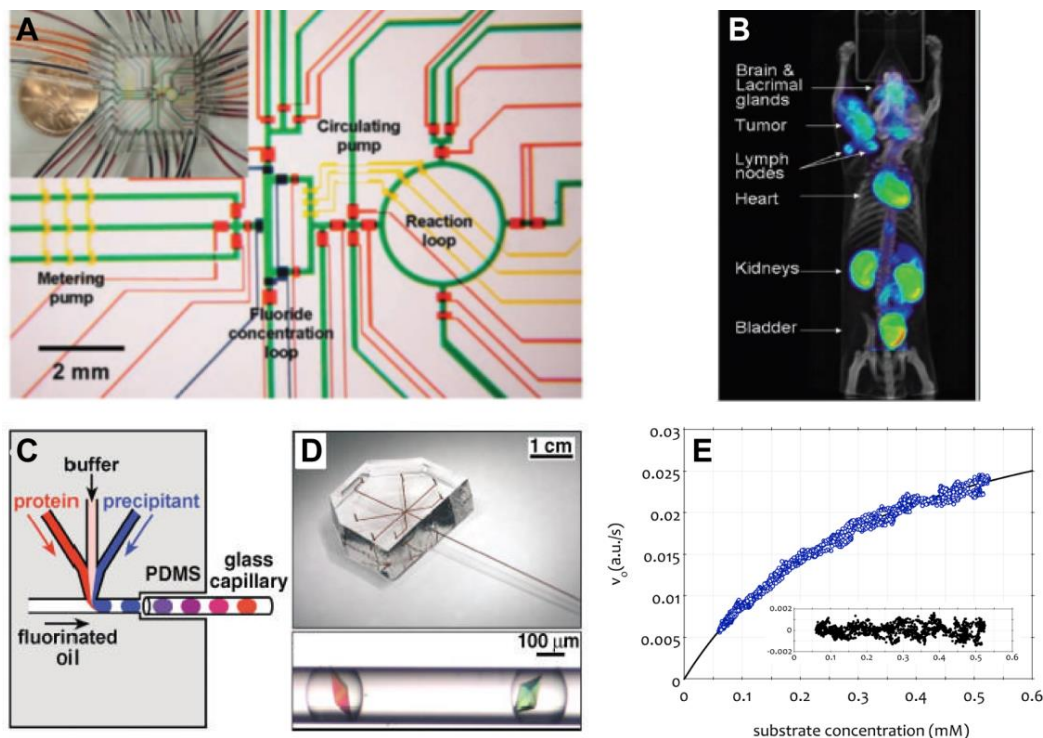


Figura 2-8. (A) Fotografía de los canales que conforman el microchip para la síntesis de compuestos orgánicos marcados con ^{18}F (^{18}F -FDG) como orientadores para la identificación de tumores por radioquímica. (B) Fotografía de un ratón tratado con ^{18}F -FDG, se puede observar un tumor en la pata superior izquierda marcado por el compuesto sintetizado en el microchip (tomado de 34). (C y D) Diseño de microchip para la cristalización de proteínas en gotas de fase acuosa rodeadas por una fase inmiscible. En la parte inferior de D se observan los cristales obtenidos (tomado de 38). (E) Cinética de una reacción enzimática obtenida mediante el análisis de la reacción seguida por fluorescencia en un dispositivo de microfluídica (tomado de 35).

2.5 Microfluídica basada en microgotas

La capacidad de la microfluídica para manipular flujos de fases inmiscibles en un mismo microchip, ha permitido desarrollar la microfluídica basada en microgotas. Esta consiste en la generación y manipulación de gotas monodispersas de fase acuosa (< 3 % de variación en su volumen) en una fase continua de aceite ³⁹. Incluso se pueden generar burbujas de gas dispersas en un líquido inmiscible ⁴⁰ o dobles emulsiones agua-aceite-agua ⁴¹. En todos los casos se hace uso de tensoactivos disueltos en alguna o ambas fases para favorecer la estabilización de las emulsiones formadas. En este trabajo solo se abordarán microgotas de fase acuosa dispersas en aceite.

Con respecto a la fase oleosa, es común el uso de aceites fluorados con tensoactivos poliméricos biocompatibles con aplicaciones bioquímicas. Estos aceites tienen ventajas sobre el aceite mineral, ya que favorecen la estabilización de las emulsiones durante periodos prolongados, y disminuyen la migración de compuestos no halogenados de las microgotas de fase acuosa hacia el aceite, lo cual permite que los compuestos de interés permanezcan dentro de las microgotas durante todo el ensayo. Los tensactivos de mayor uso con estos aceites son el Krytox 157 FSH soluble en el aceite fluorado y la Jeffamina ED 900 soluble en la fase acuosa, y aun es más común el uso de la unión química de ambos en una larga cadena anfifílica (figura 2-9)^{42,43}.

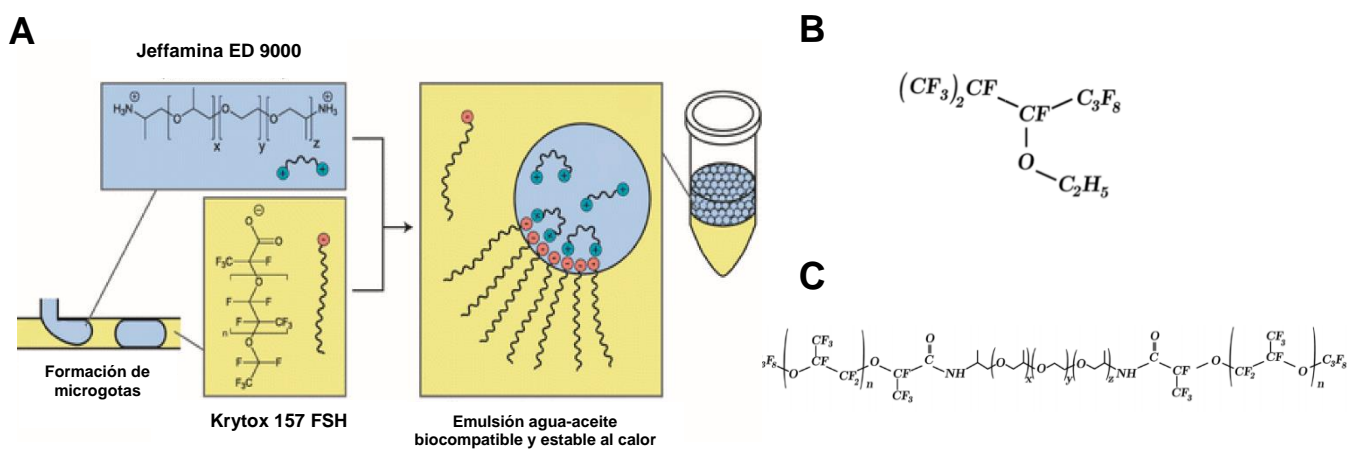


Figura 2-9. (A) Esquema de formación de microgotas de fase acuosa dispersas en una fase continua de aceite fluorados. Tensoactivos de diferentes propiedades se adicionan en cada fase para favorecer la estabilización de la emulsión. (B) Estructura química de HFE 7500 aceite fluorado de más amplio uso. (C) Jeffamina y Krytox se pueden unir químicamente mediante la formación de amidas obteniéndose una cadena larga con propiedades anfifílicas, ampliamente utilizado en microfluídica basada en microgotas. Imagen tomada y modificada de la referencia 43.

Existen tres geometrías principales de los microcanales que permiten la intersección de las fases acuosa y oleosa para la formación de las microgotas: la intersección en T, el enfoque de flujo y el co-flujo (figura 2-10). Todas ellas se basan en la intersección de las fases para generar una interface agua-aceite. Debido a fuerzas interfaciales y energía de superficie, la fase acuosa segrega en microgotas rodeadas por la fase continua de aceite⁴⁴.

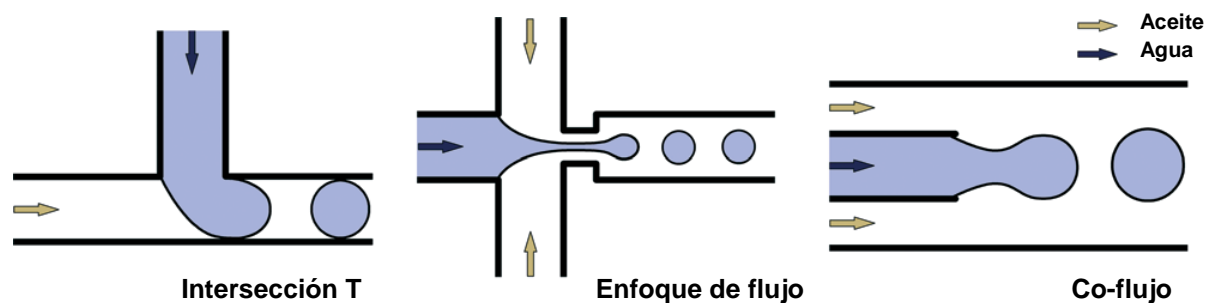


Figura 2-10. Geometrías más comunes de los canales en microchips para la formación de microgotas de fase acuosa dispersas en una fase continua de aceite. En todos los casos se pueden generar mono emulsiones con una dispersión de tamaño menor al 3 %. Las microgotas se estabilizan con el uso de tensoactivos disueltos en alguna o ambas fases. Tras su formación las microgotas se pueden manipular y analizar mediante diferentes técnicas para obtener información de las reacciones que se pueden llevar a cabo dentro de ellas. Imagen tomada y modificada de la referencia 44.

Por otra parte, la fase acuosa puede estar conformada por diferentes componentes, tantos como sea necesario para llevar a cabo algún ensayo. De tal forma, las microgotas funcionan como microreactores cuya composición puede ser sutilmente modificada mediante cambios en las proporciones del flujo al cual se forman. Por ejemplo, en la figura 2-11 se muestran las fotografías tomadas al microscopio (objetivo 10x) de un dispositivo de microfluídica con una geometría de enfoque de flujo para la formación de microgotas. La fase acuosa se compone por una disolución de colorante azul, una disolución incolora y una disolución de colorante rojo. Estos componentes se juntan en un mismo canal antes de su intersección con el aceite. La proporción del flujo de cada uno de los componentes de la fase acuosa se puede cambiar con facilidad, generando un cambio en la composición de las microgotas. En la figura 2-11 B predomina el flujo del colorante azul obteniéndose gotas visiblemente azules, mientras que en la figura 2-11 C predomina el rojo y se obtienen gotas rojas. El mezclado de los componentes en las microgotas se favorece por corrientes de convección dentro de las mismas y que se intensifican en las curvas del microchip^{45,46}.

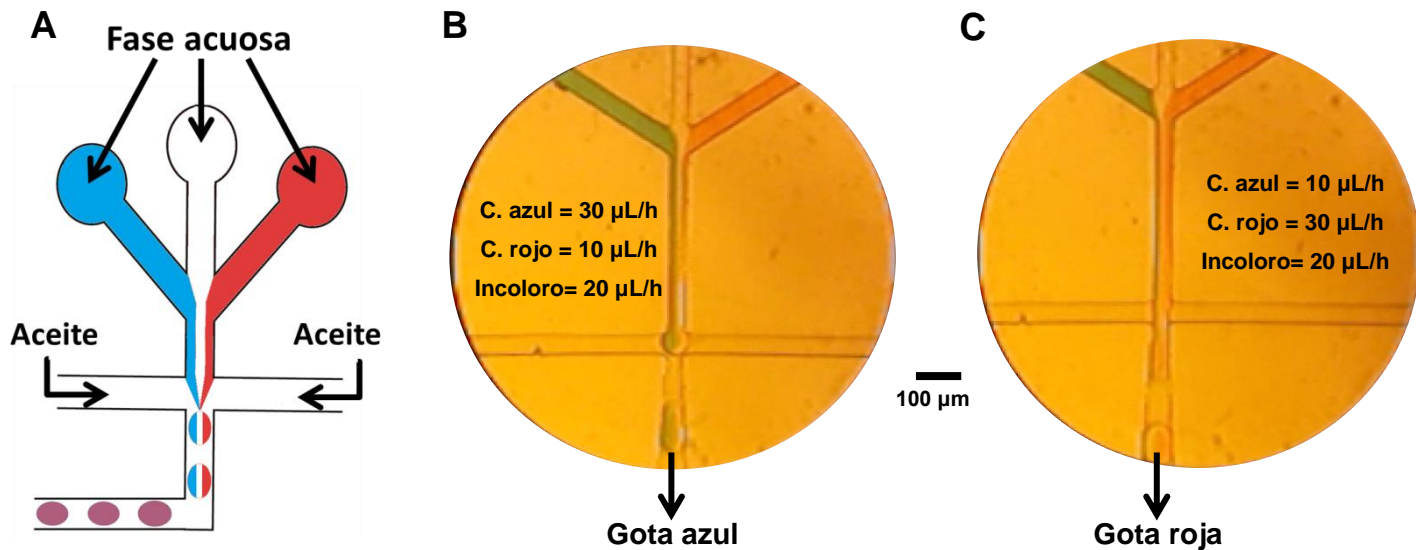


Figura 2-11 (A) Esquema de un arreglo de enfoque de flujo para formación de microgotas. La fase acuosa se puede componer por el flujo de varias disoluciones acuosas que se juntan e intersectan con la fase inmisible de aceite. Propiedades interfaciales provocan la formación de microgotas de fase acuosa dispersas en la fase continua de aceite. Cada microgota funciona como un microreactor cuyo mezclado se favorece por corrientes de rotación dentro de la microgota, las corrientes incrementan en las curvas del microchip. La composición de las microgotas puede ser modificada mediante el cambio en la proporción de los flujos que componen la fase acuosa. Por ejemplo, en (B) y (C) se muestra la formación de microgotas con disoluciones acuosas de colorante azul, rojo y una disolución incolora. En (B) donde predomina la proporción del colorante azul en el flujo se forman gotas azules, en cambio en (C) donde predomina el rojo se forman gotas rojas.

2.5.1 Aplicaciones en microbiología

El estudio de microorganismos (bacterias y hongos) es una de las más extensas aplicaciones de la microfluídica basada en microgotas. Las características de esta tecnología permiten nuevas posibilidades en la identificación de patógenos, ensayos de susceptibilidad antibiótica, fisiología microbiana y aplicaciones biotecnológicas ¹¹.

El uso de microgotas en el estudio de microorganismos trae consigo un gran número de ventajas sobre los métodos tradicionales en cajas de Petri o placas de pozos. En primer lugar se encuentra la miniaturización de los ensayos hasta el orden de los picolitros, 100 000 veces menor que los ensayos más pequeños en pozos. Esta característica permite reducir drásticamente el consumo de reactivos en los ensayos. Así mismo, debido a que las microgotas se encuentran rodeadas de una fase continua de aceite, se evita la evaporación de la muestra que comúnmente se presenta en ensayos en placas.

En segundo lugar, y de mayor importancia, la microfluídica tiene la capacidad de encapsular una célula o una pequeña población de ellas en una microgota. La encapsulación genera un microambiente alrededor de las células, y todos los metabolitos que excretan las células permanecen dentro de la microgota, retenidos cerca de la célula por la interface agua-aceite. De esta forma, se evita la dilución a través de todo el medio y se obtienen microgotas con información discreta de los metabolitos excretados. Así, cuando se hace el análisis de las microgotas, se obtiene una señal discreta e intensa correspondiente a cada microgota y los metabolitos que se hayan producido dentro. En el caso de una fase continua, donde las células se encuentran dispersas en toda la fase, los metabolitos excretados por las células difunden a través de todo el espacio disponible y su análisis generará valores relativos a nivel poblacional (figura 2-12) ^{47,48}.

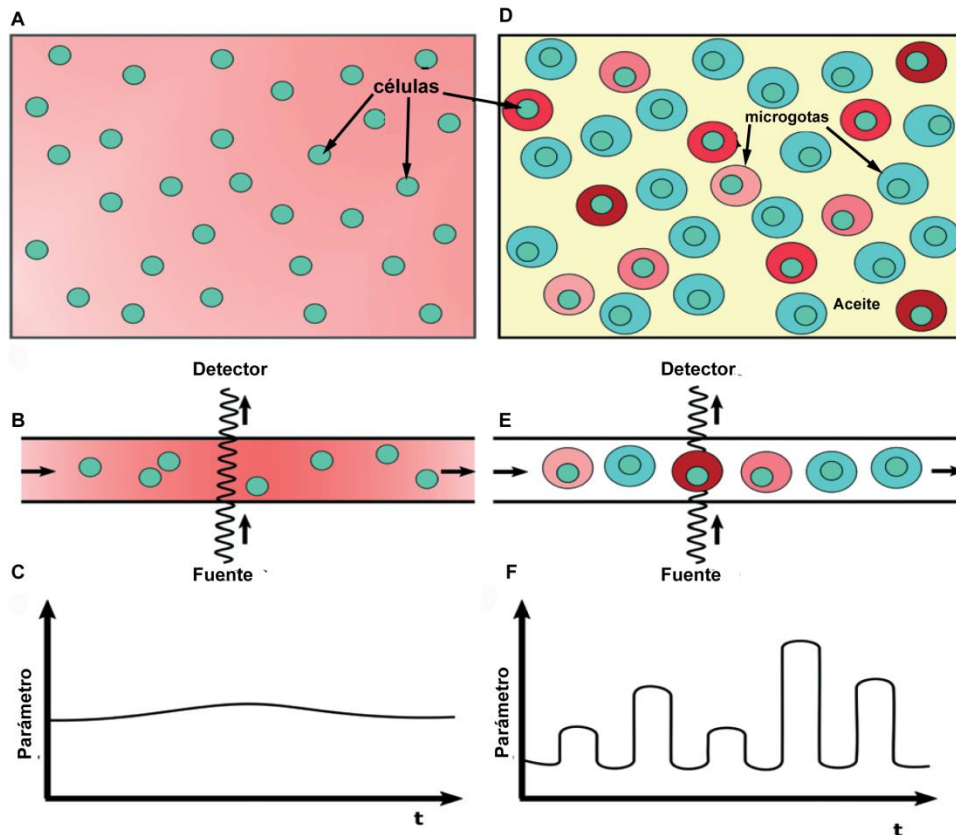


Figura 2-12. Comparación entre métodos continuos para ensayos celulares (A-C) y ensayos en microgotas (D-F). En (A) se observan células dispersas en una fase continua sin ninguna barrera que las separe una de la otra, por lo tanto los metabolitos excretados difunden a través de todo el medio, de tal forma que tras su interrogación (B) se obtiene el promedio poblacional (C). En el caso de células encapsuladas en microgotas (D) los metabolitos permanecen contenidos dentro de la microgota en cercanía de las células que los excretan, la técnica permite interrogar a gotas individuales (E) y obtener información de cada una de ellas (F). Imagen tomada y modificada de la referencia 48

La tercera característica de la microfluídica basada en microgotas que le ha permitido ser ampliamente utilizada en microbiología, es su alta capacidad de manipular las microgotas y ejecutar diferentes operaciones sobre las mismas de manera iterativa. Por ejemplo, se pueden desarrollar sistemas que permitan la formación de microgotas, fusión, incubación y detección. *Brouzes* y colaboradores en 2009 reportaron un sistema con estas cuatro operaciones de microfluídica para la evaluación de la toxicidad de células de mamífero ⁴⁹. Como se observa en la figura 2-13, en una primera operación generaron una biblioteca de microgotas con un solo tipo de compuesto por cada gota. En las microgotas se encontraba también disuelto un fluoróforo a distinta concentración para la codificación e identificación del compuesto encapsulado. El segundo paso, fue la fusión de cada miembro de la biblioteca con gotas que contenían células de mamífero. La tercera operación consistió en incubar las microgotas durante el tiempo adecuado para la interacción entre las células y los miembros de la biblioteca. Finalmente, las microgotas incubadas se reintrodujeron en otro microchip en donde se fusionaron con gotas que traían los colorantes para el ensayo de viabilidad celular (calcein-AM para células vivas y Sytox orange para células muertas). Tras la última fusión, las nuevas gotas pasaron a una línea de retardo dentro del microchip en donde se incubaron por 15 minutos antes de su análisis y codificación por fluorescencia inducida por láser (LIF por sus siglas en inglés) ⁴⁹.

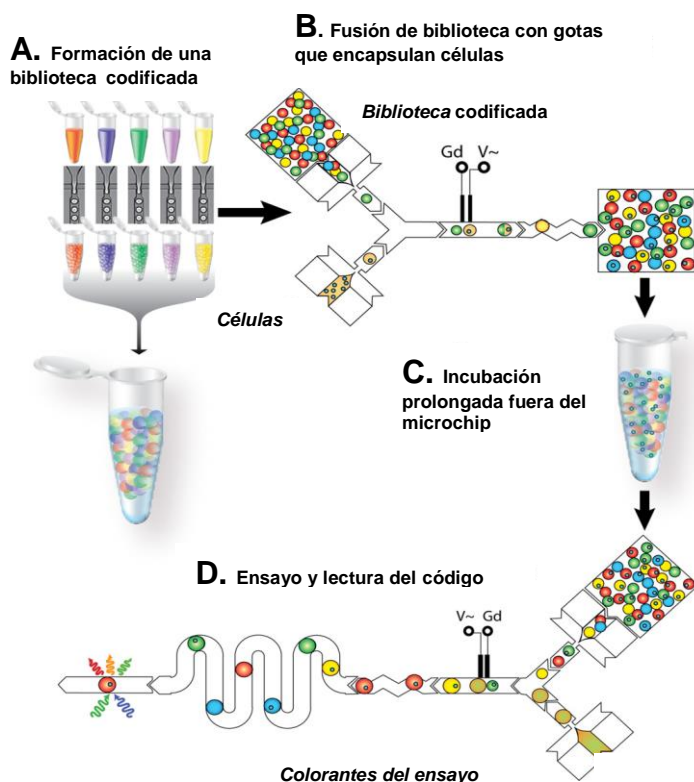


Figura 2-13. Esquema de un sistema de microfluídica basada en microgotas para ensayos de viabilidad celular. El sistema tiene cuatro pasos. (A) Se genera una biblioteca de compuestos en microgotas cada uno marcado con un fluoróforo a distinta concentración para su codificación. (B) Cada miembro de la biblioteca se fusiona con gotas que contienen células dentro de un microchip. (C) Incubación prolongada fuera del microchip. (D) Las gotas incubadas se reinyectan en un chip para el ensayo. Se fusionan con colorantes del ensayo, incuban durante 15 min dentro del microchip, interrogan mediante LIF y se identifica el compuesto por su código. Imagen tomada y modificada de la referencia 49.

Otra operación de microfluídica muy socorrida en microbiología es la selección de microgotas dentro de un microchip. En 2009, el grupo de *A. D. Griffiths* describió el funcionamiento de un dispositivo de microfluídica para la selección de microgotas con base en su intensidad de fluorescencia ⁵⁰. El sistema consiste en la formación de microgotas con algún indicador fluorescente, y se permitió un tiempo de incubación antes de la detección con láser para inducir la fluorescencia. Durante la detección se estableció un umbral de intensidad de fluorescencia, y si la fluorescencia en la microgota estaba por arriba del umbral se activaban unos electrodos dentro del microchip que generaban un campo eléctrico y polarizaban la microgota haciendo que cambiara su dirección de flujo de un canal de menor a hacia un canal de mayor resistencia hidráulica (figura 2-14) ⁵⁰. De tal forma, se pueden seleccionar gotas dentro de una mezcla dependiendo de sus características.

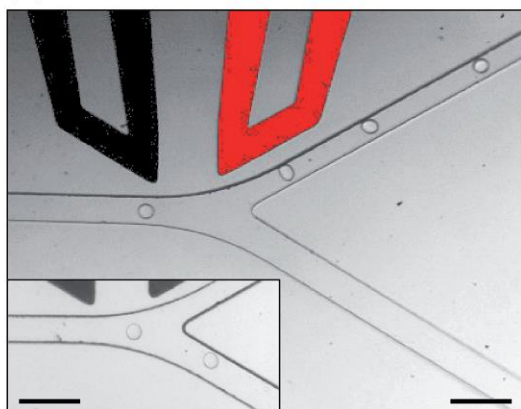


Figura 2-14. Arreglo de electrodos y canales para la selección de microgotas dentro de un microchip. En la imagen principal, los electrodos se encuentran prendidos generando un campo eléctrico que polariza las gotas y las manda por el canal de mayor resistencia. En el inserto, los electrodos se encuentran apagados y las gotas siguen el flujo de menor resistencia. Las barras de escala corresponden a 100 μm . Imagen tomada de la referencia 50

En 2016 el mismo grupo publicó un trabajo de selección de gotas para la identificación de hongos con una actividad enzimática específica a una eficiencia de 90 gotas por segundo ⁵¹. En dicho trabajo se ejecutaron 5 pasos principales: (i) la generación de un biblioteca de esporas del hongo *Aspergillus niger*; (ii) la encapsulación de esporas junto con el sustrato fluorogénico en microgotas de 18 nL. El sustrato fue almidón marcado con el fluoróforo BIODIPY®FL en múltiples sitios, y cuando los fluoróforos se encontraban cercanos entre sí, debido a la unión de la cadena de almidón, no florecían, en cambio cuando se cortó la cadena de almidón por la actividad de la enzima α -amilasa los fluoróforos quedaron lejanos uno del otro y florecieron libremente; (iii) la incubación de las microgotas; (iv) la selección dentro del microchip de gotas que contienen hongos con

actividad α -amilasa; (v) finalmente los hongos seleccionados se reintrodujeron al ciclo para enriquecer las cepas productoras de α -amilasa (figura 2-15) ⁵¹.

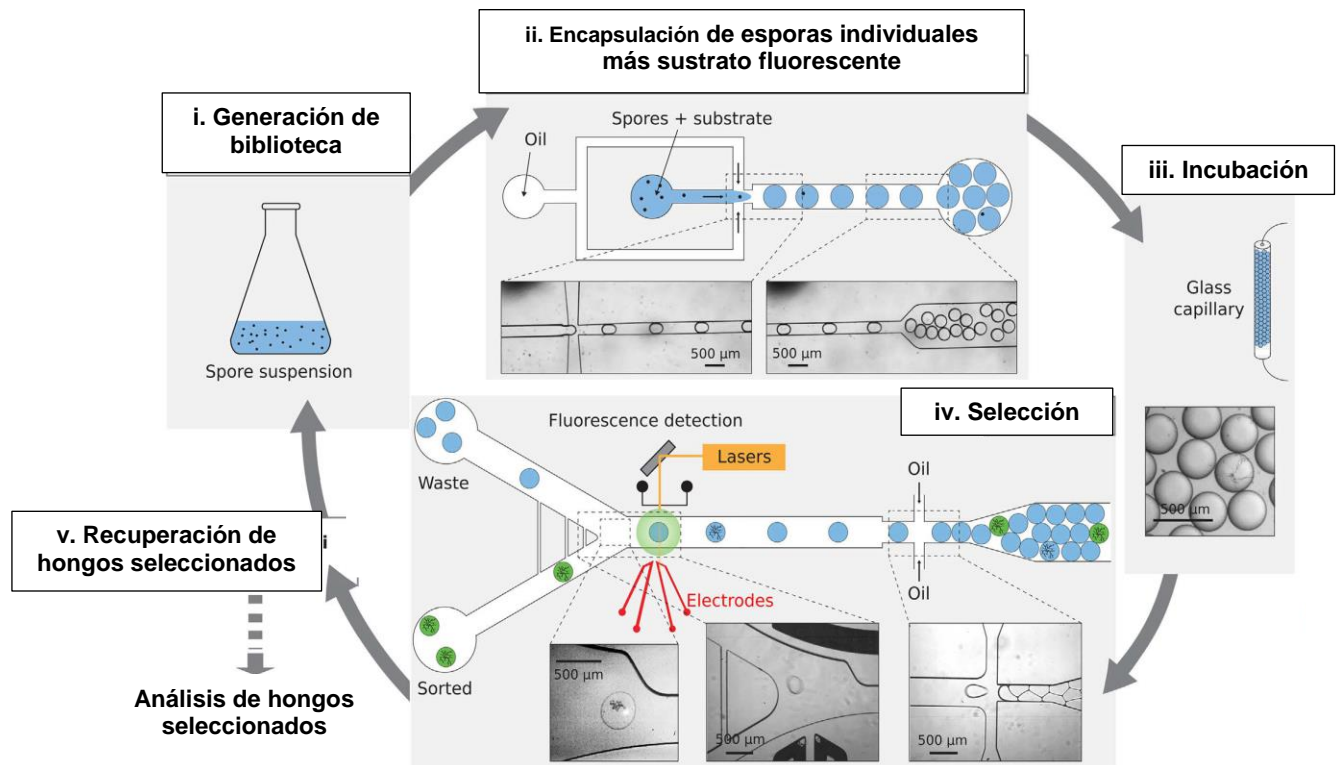


Figura 2-15. Plataforma de microfluídica para la identificación y enriquecimiento de hongos productores de la enzima α -amilasa. (i) Generación de una suspensión de esporas del hongo *Aspergillus niger*. (ii) Encapsulación de esporas junto con sustrato fluorogénico en gotas de 18 nL. (iii) Incubación por 24 h. (iv) Selección de microgotas que contienen hongos productores de α -amilasa. (v) Recuperación de hongos seleccionados para reintroducción en el sistema y enriquecimiento. Imagen tomada y modificada de la referencia 51.

2.5.2 Ensayos bacterianos en microgotas

Debido a que la microfluídica cuenta con muchas herramientas para llevar a cabo una gran variedad de ensayos celulares, existen en la literatura muchos estudios reportados con bacterias. Ciertos ejemplos recientes incluyen la identificación de diferentes propiedades bacterianas tal como la evaluación de la actividad metabólica y el crecimiento celular ^{52,53}, la susceptibilidad antibiótica ⁵⁴⁻⁵⁶ y la identificación de mutantes resistentes a antibióticos conocidos ⁵⁷, todo esto con una gran variedad de diseños experimentales en microchips.

Un ejemplo interesante de susceptibilidad antibiótica se presentó en 2012 por el grupo de *T. S Kaminski* ⁵⁵. En este trabajo se describe un dispositivo de microfluídica con cuatro reservorios diferentes, uno para un cultivo bacteriano y los otros tres para distintos

antibióticos. Cada uno de los reservorios se intersectó con un flujo de aceite en una geometría de T para la formación de microgotas. De acuerdo al protocolo establecido, se generaron gotas de diferentes volúmenes para cada reservorio obteniéndose gotas de diferente volumen para cada muestra. Las gotas se interceptaron en un punto del microchip y se fusionaron con ayuda de un campo eléctrico, obteniéndose una sola gota de composición conocida y volumen de alrededor de 18 nL. Cada una de estas grandes gotas pasó por una región que favorecía el mezclado de los componentes, salieron del microchip y se incubaron en tubería de polietileno durante 3 h conservando el orden de formación. Tras la incubación, se obtuvieron curvas de viabilidad celular al reintroducir las gotas en otro microchip para su análisis de fluorescencia inducida por láser (figura 2-16 A).

El grupo de *T.S. Kaminski* utilizó este diseño para determinar la susceptibilidad de bacterias de *E. coli* frente a tres diferentes antibióticos conocidos (ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina). Se utilizó Rz, como marcador de viabilidad celular por fluorescencia disuelto en todos los reservorios que no contienen bacterias. De tal forma, lograron determinar valores de concentración mínima inhibidora (CMI) para cada uno de estos antibióticos sobre *E. coli* (figura 2-16 B) ⁵⁵.

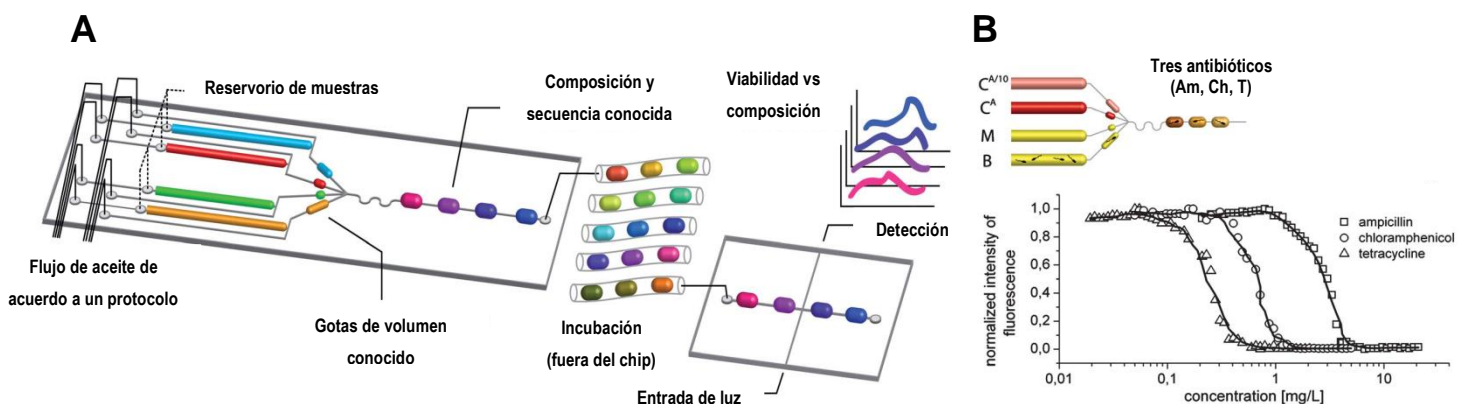


Figura 2-16. (A) Esquema del funcionamiento de un dispositivo de microfluídica para la determinación de susceptibilidad antibiótica de células de *E. coli*. Se generan microgotas de volumen conocido de cuatro disoluciones diferentes: dos antibióticos, medio de cultivo y un cultivo bacteriana. Estas gotas se mezclan generando una microgota de mayor volumen con una composición definida. La secuencia de microgotas generadas en el dispositivo se incuban durante tres horas en tubería de polietileno. Después de la incubación, las gotas se reintroducen en otro microchip para su interrogación donde se detecta la concentración de un marcador de viabilidad celular. (B) Arriba se observa un diagrama que representa la distribución de las muestras en los reservorios del microchip ($C^{A/10}$ -antibiótico diluido 10 veces, C^A -antibiótico en concentración inicial, M-medio de cultivo celular sin bacterias, B-medio con bacterias). Se utiliza resazurina como marcador de viabilidad celular por fluorescencia la cual se disolvió en todas las disoluciones excepto en el cultivo de bacterias. Abajo se observan las curvas de susceptibilidad antibiótica de *E. coli* contra tres antibióticos (Ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina). Imagen tomada y modificada de la referencia 55.

Una de las tendencias en ensayos celulares en microgotas es la encapsulación de una sola bacteria por microgota. Esto se logra diluyendo lo suficiente la suspensión de bacterias que se introduce en el microchip obteniendo un gran número de gotas vacías y una fracción ($\approx 10\%$) que contienen a lo más una bacteria; dicho comportamiento está descrito por la distribución de Poisson y es ampliamente mencionado en trabajos de microfluídica basada en microgotas ⁴⁸.

El trabajo de *A.M. Kaushik* reportado en 2017 describe una plataforma rápida y eficiente para la detección de la actividad metabólica de *E. coli* y la evaluación de susceptibilidad antibiótica en microgotas de 20 pL ⁵⁴. La plataforma hace una completa integración: de generación, incubación y detección de microgotas en un mismo microchip sin la interrupción del flujo. También hace uso de Rz como indicador del metabolismo celular por fluorescencia. Se encapsuló a lo más una bacteria por microgota junto con 200 μM de Rz. Las gotas formadas recorrieron una sección larga dentro del microchip lo que permitió ser incubadas por una hora, dando lugar a dos o tres replicaciones de la bacteria. Debido al diminuto volumen de la microgota la Rf, producida tras el metabolismo de Rz por la bacteria, se concentró rápidamente y se detectó mediante LIF en la salida del microchip 1 hora después de la formación de la microgota (figura 2-17) ⁵⁴.

Dicha plataforma permitió evaluar el efecto de un solo antibiótico a la vez, disuelto junto con el marcador de viabilidad celular antes de la formación de microgotas. Los autores lograron evaluar el efecto de la gentamicina sobre una cepa resistente de *E. coli* y otra cepa susceptible al antibiótico. A pesar de la eficiencia y velocidad de esta plataforma se requieren optimizaciones que le permitan muestrear múltiples combinaciones de bacterias y antibióticos en un mismo microchip, así como la estabilización y uniformidad de las microgotas ⁵⁴.

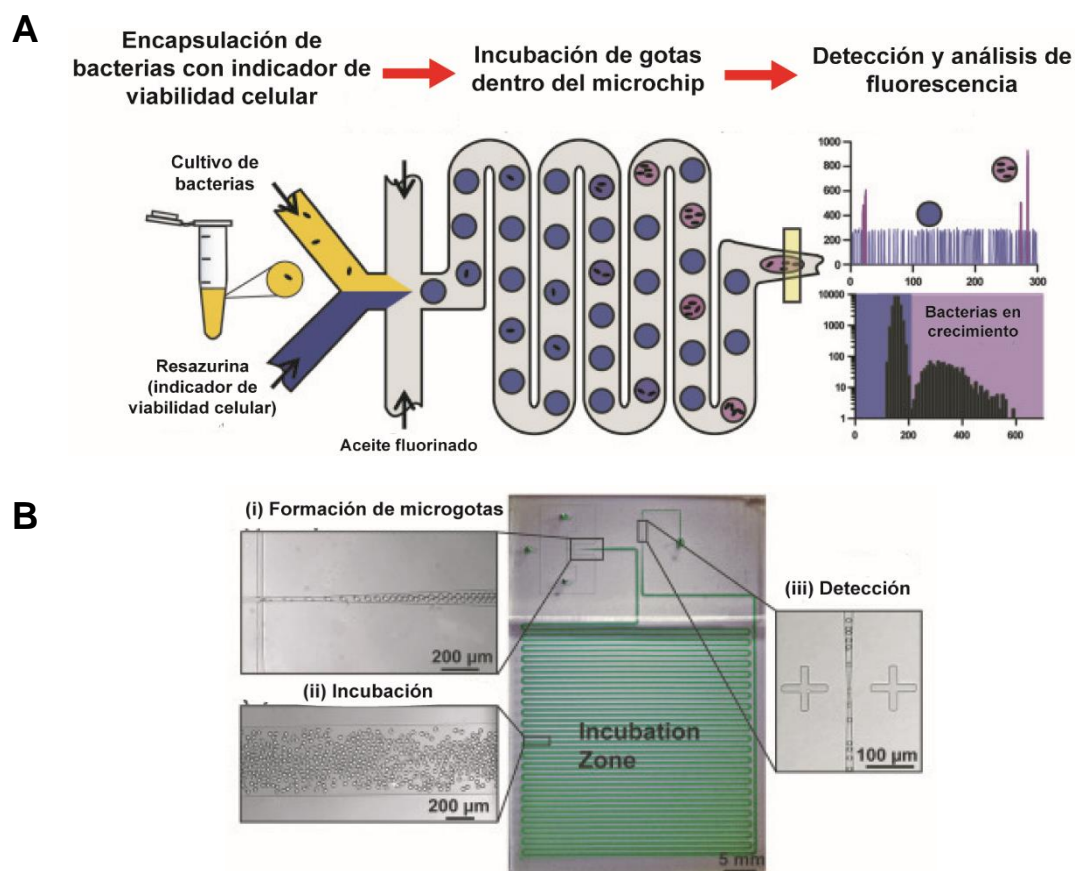


Figura 2-17. (A) Esquema de una plataforma de microfluídica para detección de la actividad metabólica bacteriana y evaluación de susceptibilidad antibiótica. La plataforma permite la encapsulación de una sola bacteria junto con rasazurina como marcador de viabilidad celular y un antibiótico en microgotas de 20 μL . Las microgotas se incuban durante una hora dentro del microchip lo que permite una o dos replicaciones de la bacteria que se detectan a la salida del microchip mediante LIF. Las microgotas vacías se diferencian fácilmente de aquellas que contienen bacterias debido a su intensidad de fluorescencia y se pueden representar mediante su distribución en histogramas. (B). Fotografías del microchip al microscopio para la formación de microgotas, recorrido de las mismas en el canal de incubación y detección. Imagen tomada y modificada de la referencia 54.

Los trabajos mencionados anteriormente resultan sistemas muy eficientes para la evaluación de susceptibilidad antibiótica. Sin embargo, la identificación de algún compuesto con actividad biológica en una mezcla compleja es aún un desafío en estos sistemas. Por ejemplo, para el estudio de algún extracto natural surge la necesidad de separar primero la mezcla e inyectar en el sistema de microfluídica cada uno de los compuestos anteriormente separados.

En 2017, nuestro grupo de trabajo demostró la eficiencia de un sistema de microfluídica acoplado a un instrumento de HPLC para la identificación de inhibidores enzimáticos en un extracto natural haciendo uso de microgotas ³⁶. Este arreglo, permite llevar a cabo la compartimentación de cada pico cromatográfico en las microgotas junto con los

componentes del ensayo enzimático (enzima y sustrato fluorogénico). También permite conservar el orden de la separación cromatográfica y el gradiente de concentración que se genera en la columna. Mediante análisis de imágenes se logró determinar la cinética de la reacción enzimática e identificar dentro del extracto de la raíz de *Pelargonium sidoides* un pico cromatográfico con actividad inhibidora de la reacción en estudio (figura 2-18).

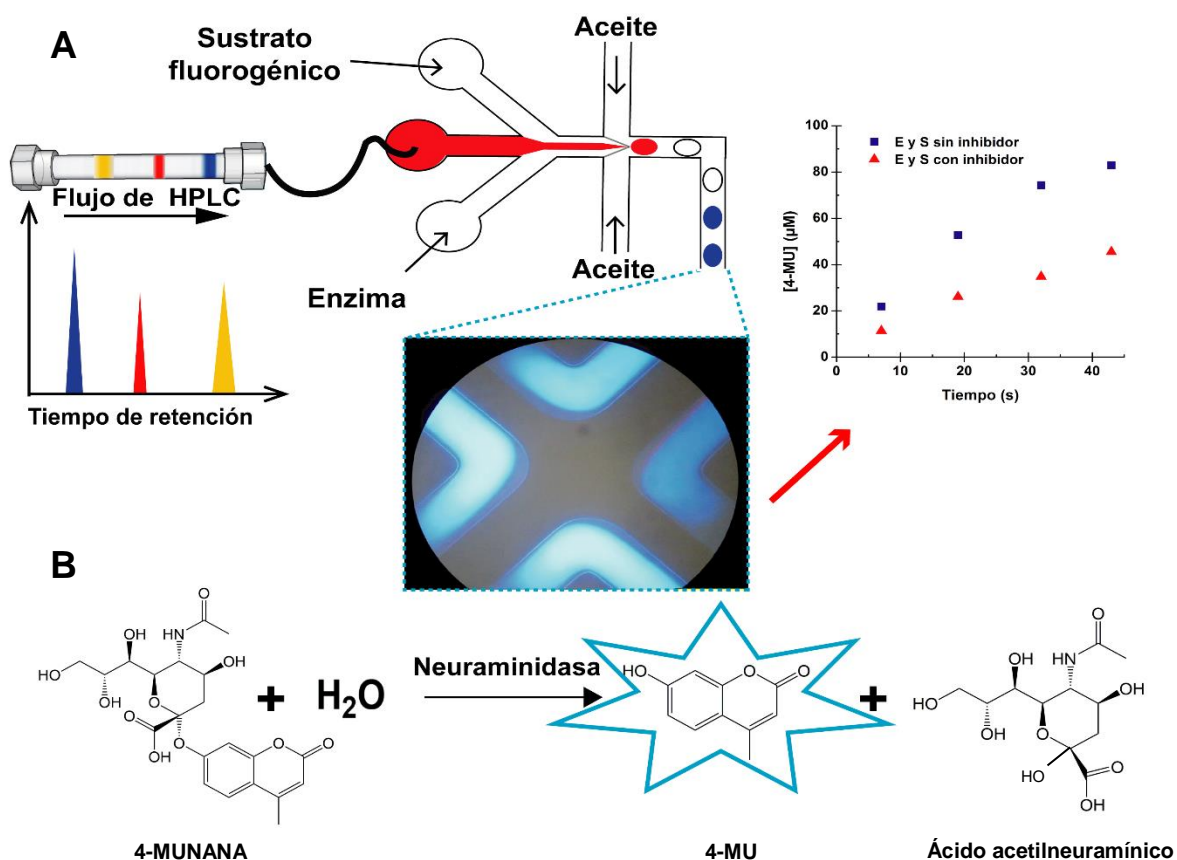


Figura 2-18. Esquema de plataforma de microfluídica basado en microgotas acoplada a HPLC para la identificación de picos cromatográficos inhibidores de una reacción enzimática. Mediante el análisis de imágenes se determina el cambio en la velocidad inicial de la reacción debido a la presencia de los componentes de cada pico en las microgotas con los componentes del ensayo. (B) La reacción de estudio es un sustrato fluorogénico modelo (4-MUNANA) para el estudio de neuraminidasas. La enzima corta en enlace que mantienen unido a 4-MU con el ácido acetilneuramínico y deja libre a 4-MU para el seguimiento de la reacción por fluorescencia.

En resumen, la microfluídica es una técnica que permite realizar ensayos con bacterias de manera rápida, eficiente y reduciendo el consumo de reactivos. Sin embargo, a la fecha no hay reportes de dispositivos de microfluídica que permitan identificar algún compuesto con actividad bactericida dentro de una mezcla compleja. Como se mencionó anteriormente, se ha establecido la susceptibilidad de algunas bacterias frente a

antibióticos conocidos. Por lo tanto, en este trabajo se propone el desarrollo de una plataforma de microfluídica basada en microgotas para la identificación de disoluciones con actividad bactericida. Como perspectivas de este trabajo, la plataforma desarrollada se podrá acoplar a una columna cromatográfica para la identificación de compuestos bactericidas dentro de una mezcla compleja.

3 Objetivo

Desarrollar una plataforma de microfluídica basada en microgotas que permita evaluar diferencias en el metabolismo bacteriano entre un medio con y sin antibiótico utilizando el par redox fluorescente Rz-Rf en no más de 3 horas de experimentación, y utilizar la plataforma desarrollada para la identificación de extractos naturales con propiedades bactericidas.

4 Hipótesis

Mediante la encapsulación de bacterias en microgotas junto con Rz y un medio de cultivo, será posible evaluar la disminución en la actividad metabólica de las bacterias en la presencia de una sustancia con actividad bactericida respecto a un medio sin el antibiótico. Esto se logrará haciendo uso de la microfluídica, la microscopia de fluorescencia y el análisis automatizado de imágenes, en un máximo de 3 horas de experimentación.

5 Metodología

5.1 Fabricación de dispositivos de microfluídica (microchips)

Los dispositivos de microfluídica utilizados en este trabajo se construyeron en PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) haciendo uso de la técnica de litografía suave. Dicha técnica permite transferir al PDMS el diseño deseado a través de un molde maestro. Éste último se construyó depositando la resina fotosensible SU-3035 (Microchem) sobre una oblea de silicio ($r = 3.81$ cm, Silicon Valley Microelectronics) mediante fotolitografía. El procedimiento para la fabricación del molde maestro por fotolitografía se ilustra en la tabla 5-1.

El diseño de los microcanales se trazó en Adobe Illustrator (figura 5-1 A) y se empleó una geometría de enfoque de flujo para llevar a cabo la formación de las microgotas. Este arreglo de microcanales se imprimió en negativo sobre un acetato (figura 5-1 B) y se utilizó como una foto máscara (figura 5-1 C) para la fabricación del molde maestro.

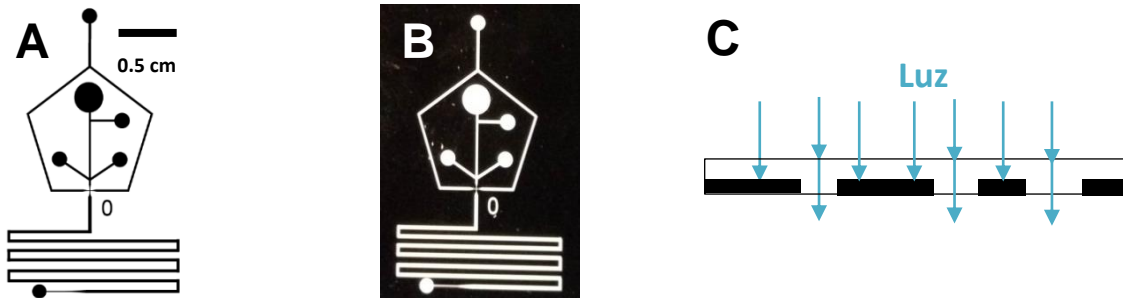
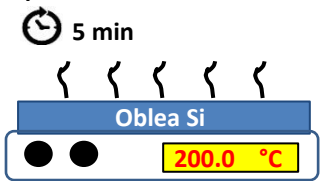
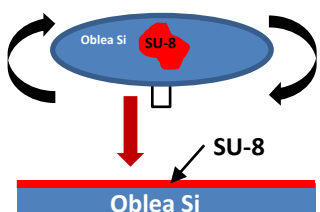
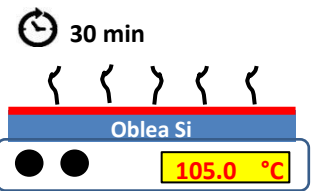
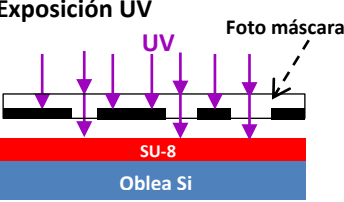
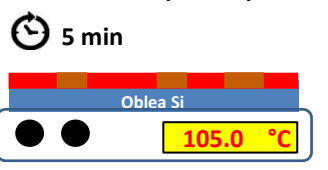
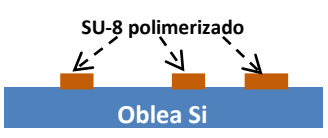


Figura 5-1. (A) Diseño del microchip trazado en Adobe Illustrator. (B). Foto máscara, impresión del diseño en negativo sobre un acetato. (C). Esquema del paso de luz a través de la máscara.

Tabla 5-1. Proceso de fabricación del molde maestro mediante fotolitografía

Paso del proceso	Descripción del proceso	Parámetros utilizados
Preparación del sustrato 	<p>El sustrato, una oblea de Silicio, debe de estar limpio y seco para la obtención de un molde fiable y resistente. Esto favorece una mejor adherencia de la resina SU-8 sobre el sustrato.</p>	<p>La oblea de Si se limpió con isopropanol, se secó con aire comprimido y se colocó en una parrilla a 200 °C durante 5 min para favorecer el secado.</p>
Recubrimiento con SU-8 	<p>Se utiliza un <i>spin coater</i> para distribuir la resina SU-8 3035 uniformemente sobre la oblea de Si. El grosor de la capa que se deposita define la altura de los canales. Depende de la viscosidad de la resina y se controla con el tiempo, velocidad y aceleración del giro.</p>	<p>Programa de giro en dos tiempos para obtener canales de 60 μm de altura.</p> <p>Paso 1 $t = 10\text{ s}$ $\bar{v} = 500\text{ rpm}$ $\bar{a} = 100\text{ rpm/s}$</p> <p>Paso 2 $t = 30\text{ s}$ $\bar{v} = 1750\text{ rpm}$ $\bar{a} = 300\text{ rpm/s}$</p>
Calentamiento suave 	<p>Evapora los disolventes en la resina, de tal forma que tras el calentamiento la resina SU-8 no debe de ser fluida a temperatura ambiente. El tiempo de calentamiento depende del grosor de la capa de SU-8.</p>	<p>Se calentó la oblea durante 20 min sobre una parrilla a 105 °C dando una sensación térmica de 95 °C sobre la oblea (temperatura recomendada por el fabricante de la resina)</p>
Exposición UV 	<p>La exposición de la resina a una fuente de luz UV cataliza la apertura de los epóxidos en la estructura química de SU-8. Esto favorece la reacción de polimerización solo en las regiones donde la resina tiene contacto con la luz.</p>	<p>Se alineó la impresión del acetato que contiene impreso el diseño del microchip con la oblea obtenida en el paso anterior. Se expuso durante 45 s bajo una lámpara de UV (UVP, Blak-Ray B-100AP)</p>
Calentamiento post exposición 	<p>La reacción de polimerización que se inicia durante la exposición se favorece con el calentamiento. La reacción se finaliza tras el tiempo adecuado de calentamiento post exposición. Este depende del grosor de la capa de SU-8</p>	<p>Se utilizó un calentamiento en dos pasos.</p> <p>Paso 1 $t = 1\text{ min}$ $T = 65\text{ °C}$ (75 °C en parrilla)</p> <p>Paso 2 $t = 5\text{ min}$ $T = 95\text{ °C}$ (105 °C en parrilla)</p>
Revelado 	<p>La SU-8 sin polimerizar se retira de la oblea sumergiéndola en algún agente capaz de disolver la SU-8 que no tuvo contacto con la luz. Dejando solamente la estructura deseada de SU-8 polimerizada sobre la oblea de Si.</p>	<p>La oblea se sumergió en el revelador (1-metoxi-2-propanol acetato) durante 10 min, se sacó, enjuagó con isopropanol y se secó con aire comprimido. Se colocó en una caja Petri para poder usar el molde.</p>

Una vez fabricado el molde maestro se obtuvieron réplicas de los canales en PDMS mediante litografía suave. Se preparó y desgasificó una mezcla homogénea del prepolímero de PDMS con 8.5 % en masa del agente entrecruzante (agente B del kit compuesto principalmente por metil-hidrógeno siloxano el cual contiene grupos Si-H que facilitan el entrecruzamiento de las cadenas de PDMS en presencia de un catalizador de platino). La mezcla se vertió sobre el molde y se dejó curar durante una noche en un horno a 70 °C. El PDMS polimerizado, sólido y suave, se desprendió del molde con ayuda de un bisturí y una espátula, y se realizaron las perforaciones pertinentes para la entrada y salida de las disoluciones con un punzón de 0.75 mm (EMS, Rapid Core).

Las réplicas de PDMS obtenidas solo contenían tres de las cuatro paredes necesarias para completar los canales del microcanal. Para generar la cuarta pared, la pieza de PDMS se selló sobre un portaobjetos de vidrio. El sellado se llevó a cabo exponiendo las superficies de vidrio y PDMS a una descarga de plasma de oxígeno durante 60 y 15 s, respectivamente (Corona Treater, BD-20AC, Electro-technic Products) ⁵⁸. Las superficies expuestas se pusieron en contacto y se dejaron reposar durante una noche a 70 °C para la regeneración de la superficie (figura 5-2).

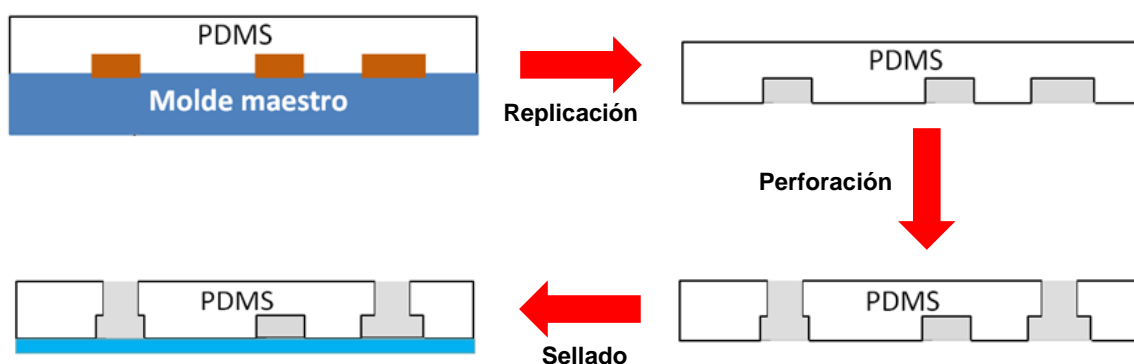


Figura 5-2. Esquema de fabricación de microchips en PDMS mediante litografía suave.

5.2 Plataforma de Microfluídica

En este trabajo se desarrolló una plataforma de microfluídica para la realización de ensayos celulares y la identificación de agentes con actividad bactericida. Como se observa en la figura 5-3, la plataforma se puede describir en dos secciones: En la primera se lleva a cabo la formación de microgotas en un dispositivo de PDMS con los componentes necesarios para el ensayo celular; en la segunda sección se realiza la manipulación de las microgotas, su incubación en capilares y análisis en un microchip de PDMS mediante un microscopio de fluorescencia invertido. Los datos obtenidos tras el análisis permitieron obtener información sobre la actividad metabólica de las bacterias en presencia o en ausencia de algún agente antibiótico.

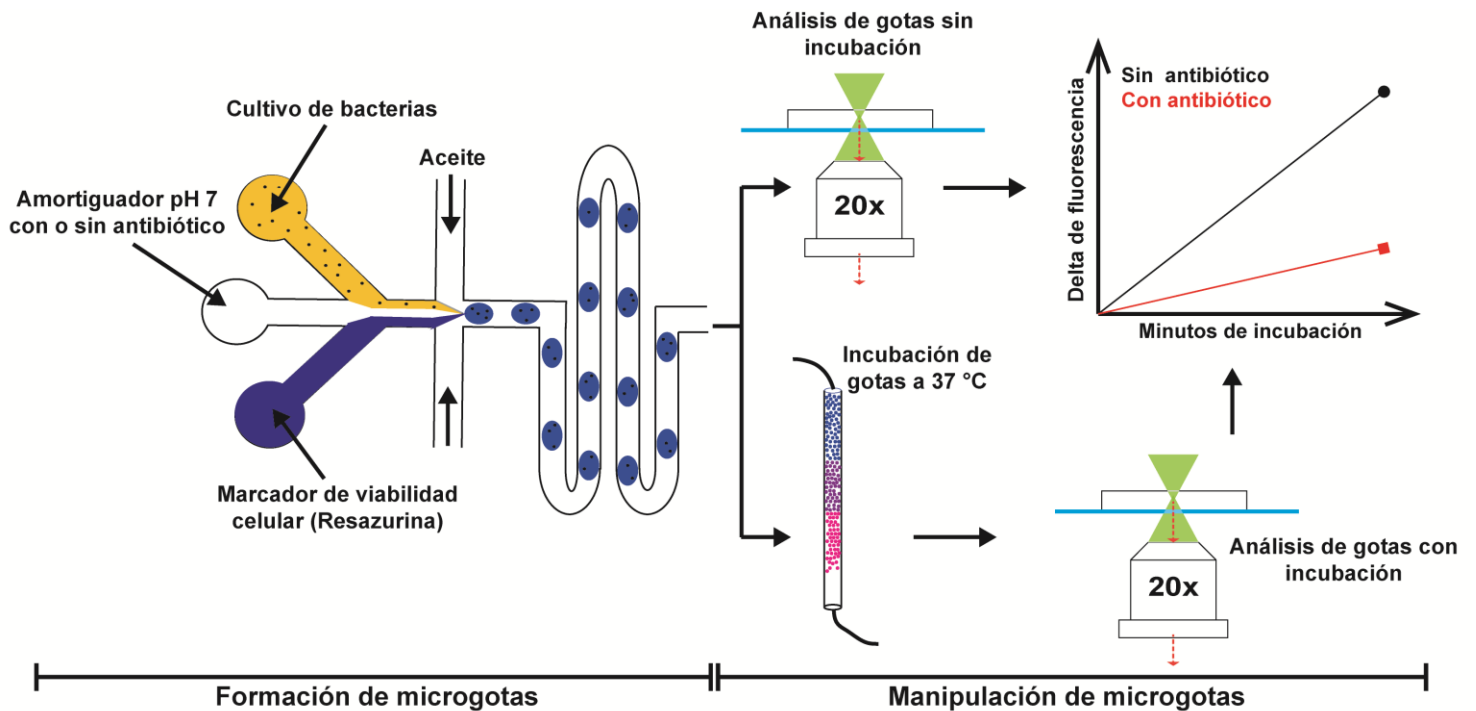


Figura 5-3. Esquema de la plataforma de microfluídica desarrollada en este trabajo para la realización de ensayos celulares en microgotas. La plataforma se puede dividir en una sección de formación de microgotas con los componentes necesarios para el ensayo celular, seguido de una sección de incubación de microgotas para finalmente llegar a la zona de análisis donde se evalúa la actividad metabólica bacteriana mediante microscopía de fluorescencia.

5.2.1 Formación de microgotas

Se utilizó un diseño con una geometría de enfoque de flujo para la formación de las microgotas de fase acuosa dispersas en una fase continua de aceite (figura 5-3 a la izquierda y figura 5-4). La fase oleosa se introdujo en la parte superior del pentágono y viajó a través de las líneas que lo dibujan. Por su parte, la fase acuosa se introdujo en la parte interna del pentágono y ambas fases se intersecaron en la base del pentágono generando una segmentación de la fase acuosa en microgotas.

Todas las disoluciones se introdujeron en el microchip mediante bombas de jeringas (NE-1000, New Era), que permitieron suministrar flujos en el orden de microlitros por hora. Las disoluciones se cargaron en jeringas de 1 ó 3 mL (BD) y se utilizó tubería de PTFE para conectar las agujas de las jeringas con las perforaciones correspondientes del microchip, según se indica en la figura 5-4.

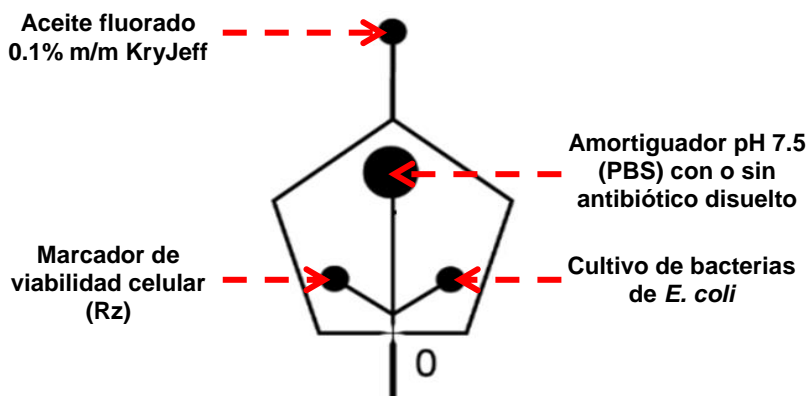


Figura 5-4. Esquema del arreglo para la introducción de disoluciones en el microchip de formación de microgotas.

La fase oleosa se inyectó a 100 $\mu\text{L}/\text{h}$, se conformó por aceite fluorado HFE 7500 (2-trifluorometil-3-etoxidodecafluorohexano, Synquest Laboratories) al 0.1% m/m del surfactante sintetizado en el laboratorio (KryJeff). Dicho tensoactivo corresponde a la unión química del Krytos 157 FSH (DuPont) soluble en el aceite fluorado y la Jeffamina ED 900 (Sigma) soluble en la fase acuosa. Como se mencionó en la sección 2.4 de antecedentes el KryJeff provee una gran estabilidad a las emulsiones de agua en aceite fluorado, e incluso permite conservar las microgotas durante días^{42,43}.

La fase acuosa se conformó por tres componentes: la suspensión de bacterias; la Rz, como marcador de viabilidad celular por fluorescencia y una disolución amortiguadora de fosfatos con o sin antibiótico disuelto, esta última permite contrarrestar los cambios en el pH debido al metabolismo bacteriano. Cada uno de estos componentes acuosos se inyectó a 20 $\mu\text{L}/\text{h}$ mediante bombas de jeringa.

5.2.2 Manipulación de microgotas

Para poder evaluar la actividad metabólica de las bacterias en las microgotas, se llevó a cabo una manipulación de las mismas. En la figura 5-3, se ilustra el primer caso en donde las microgotas recién formadas se analizan de manera casi inmediata a su formación, es decir sin incubación ($t=0$). En un segundo caso las microgotas se transfirieron de manera continua a un capilar de incubación a 37 °C antes de su análisis.

Tiempo cero de incubación de microgotas

Para obtener la intensidad de fluorescencia de las microgotas con el tiempo cero de incubación, se colocó el extremo de una tubería PTFE ($l=3$ cm, $DI=0.31$ mm, Cole Parmer) en la salida del microchip para la formación de las microgotas. El otro extremo de la tubería se introdujo en un segundo microchip para el análisis. Con este arreglo y a los flujos utilizados, una microgota recién formada tardó alrededor de dos minutos, en salir del microchip de formación, viajar por la sección de tubería y llegar a la zona de irradiación para su análisis en el segundo microchip. Sin calentamiento, el metabolismo celular es despreciable en este intervalo de tiempo, por lo tanto, se puede considerar que las microgotas que siguen este camino tienen un tiempo cero de incubación, no se ha metabolizado a la Rz en cantidades detectables (figura 5-5 A y B).

Incubación de las microgotas durante 130 min a 37 °C

En el segundo caso, las microgotas se hicieron pasar a través de una tubería larga de PTFE y de mayor diámetro interno ($l=25$ cm, $DI=1.1$ mm. Cole Parmer) que el utilizado para el tiempo cero generando así un tiempo de incubación previo al análisis. La tubería se encontraba soportada sobre una superficie de cobre a 37 °C. Así mismo, antes de ser

conectada con los microchips, la tubería se llenó con el aceite fluorado con 0.1 % m/m de KryJeff, favoreciendo un avance ordenado de las microgotas a través de la tubería colocada en posición vertical. La densidad del aceite fluorado mayor que la del agua, permite que las microgotas en fase acuosa que entran en la parte superior de la tubería desplacen el aceite que está dentro y bajen por el conducto de PTFE conservando el orden de formación. Las microgotas que se forman primero serán las microgotas que se analizarán primero ⁵⁹ (figura 5-5 C y D).

La placa de calentamiento se construyó colocando dos placas de cobre (2.5 cm de ancho, 10.0 cm de largo y 0.2 cm de grosor) sobre dos cerámicas con resistencias. Estas últimas se obtuvieron de dos dispositivos para calentar laminas repelentes de mosquitos (Baygon®). Primero, se retiró la cubierta de plástico de cada dispositivo y se pegó la placa de cobre con pasta térmica. La temperatura se controló con la ayuda de un termostato comercial que interrumpía o permitía el paso de corriente cuando la temperatura de las placas era diferente a los 37 ± 0.2 °C.

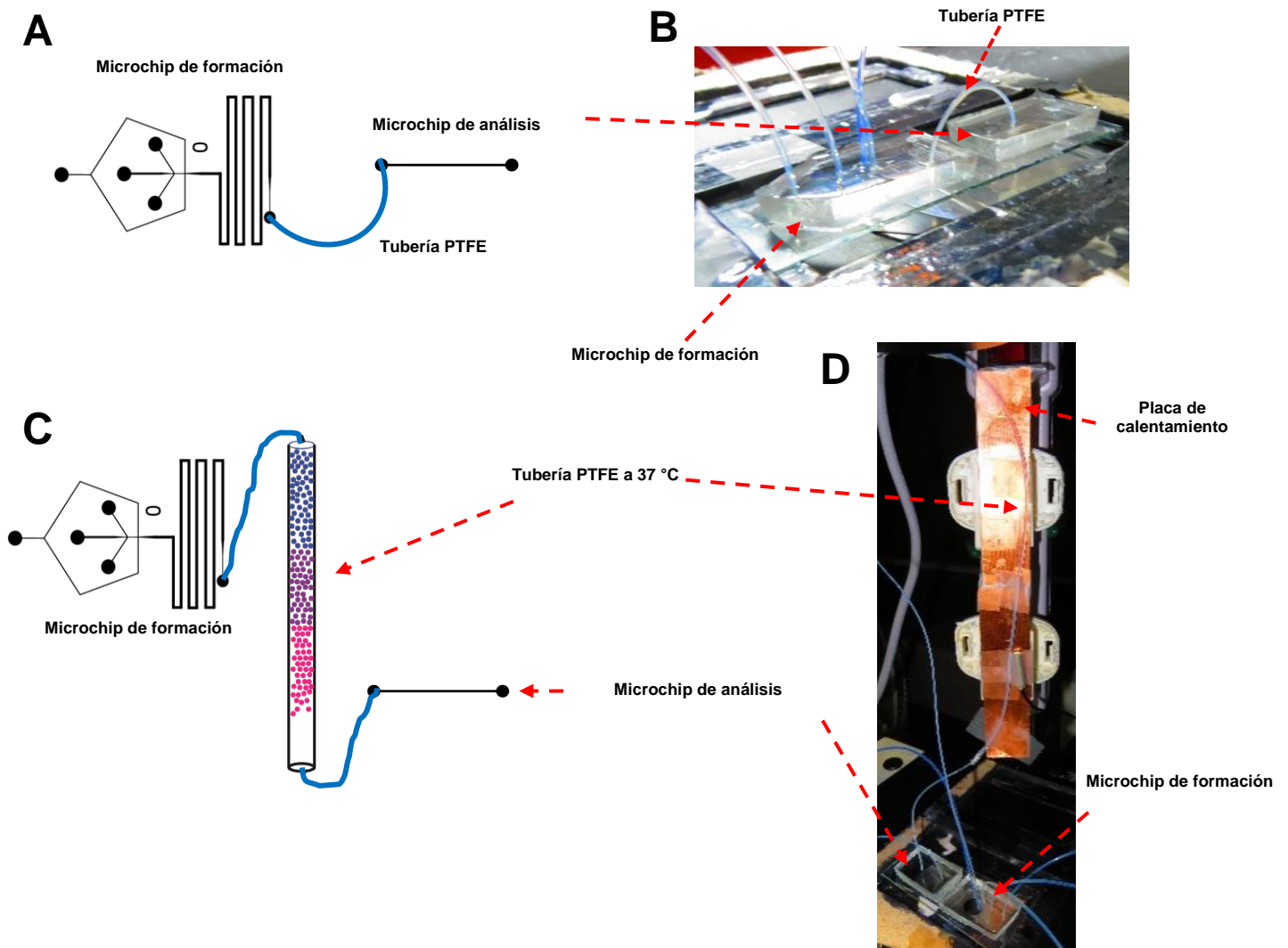


Figura 5-5. Esquemas y fotografías de la plataforma de microfluidica desarrollada en este trabajo para identificación de agentes bactericidas. (A) Esquema para formación de microgotas y análisis casi inmediato, el arreglo es útil para la obtención del tiempo cero de incubación. (B) Fotografía del arreglo experimental para el tiempo cero de incubación de microgotas. (C) Esquema para la formación de microgotas e incubación previa al análisis durante 130 min a 37 °C. (D) Fotografía del arreglo experimental para microgotas con incubación.

5.2.3 Análisis de microgotas

El canal de irradiación para análisis de microgotas consiste en un canal sencillo de 1 cm de longitud, 70 μm de alto y 70 μm de ancho. Las dimensiones de este canal son comparables con las dimensiones de las microgotas. Así, cuando éstas entran en el canal se acomodan una detrás de la otra en forma de tren y ésta conformación permite analizar cada

microgota de manera independiente, continua, rápida y automatizada, conservando el orden de formación.

5.2.4 Arreglo óptico para la interrogación de microgotas

Los ensayos realizados en este trabajo se analizaron mediante el seguimiento del compuesto Rf, compuesto de mayor intensidad de fluorescencia que su precursor Rz. La Rf presenta una banda de absorción centrada en 572 nm (superficie verde en la figura 5-6) y una banda de emisión a los 585 nm (superficie roja en la figura 5-6).

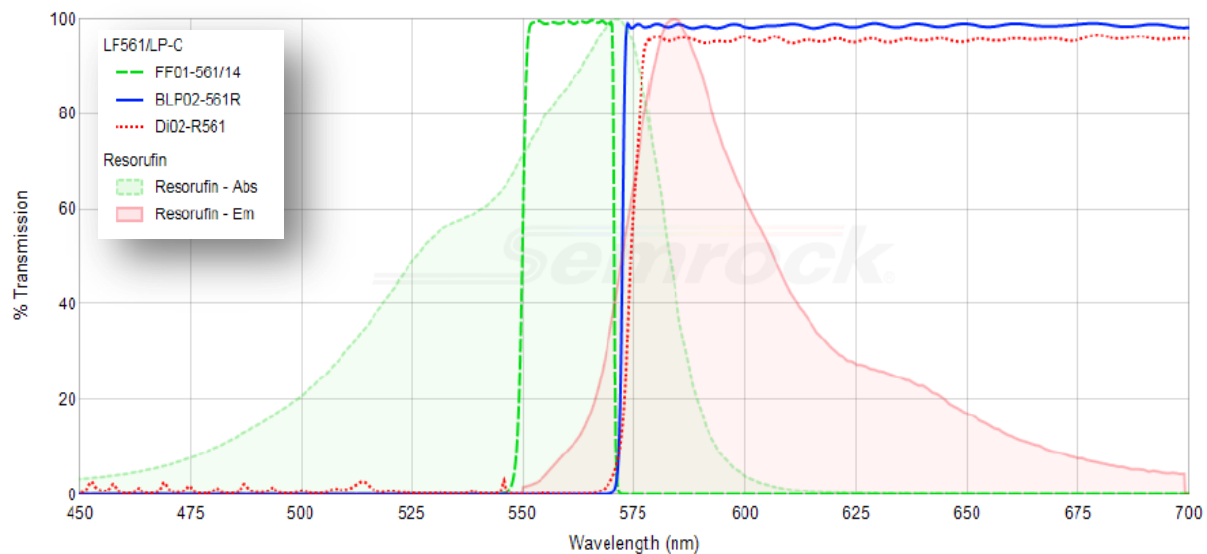


Figura 5-6. Espejos de transmitancia para el set de filtros y espejos utilizados en el microscopio de fluorescencia para la obtención de la intensidad luminosa de las microgotas con Rz y Rf: Línea Verde, transmitancia del filtro de excitación; Línea roja, transmitancia del espejo dicróico; Línea azul, transmitancia del filtro de emisión. La superficie verde corresponde al espectro de absorción de Rf y la superficie morada a su respectivo espectro de emisión.

Se utilizó la técnica de microscopía de fluorescencia para el análisis de la actividad metabólica de las bacterias en las microgotas. El vidrio, que soporta tanto al microchip de formación como de análisis de microgotas, se colocó sobre la platina de un microscopio de fluorescencia invertido (Leica, DMI3000-B) y se observó a través de un objetivo 20x (Leica, NA = 0.3). Como fuente luminosa se utilizó una lámpara de halógeno (PhotoFluor II, 89 North). La luz se dirigió hacia el microscopio a través de un cable de fibra óptica. El microscopio cuenta con un arreglo óptico compuesto por el set de filtros y espejos LF561/LP-C (Semrock) adecuados para la medición de fluorescencia de Rf:

Filtro de excitación (FF01-561/14): corresponde a un filtro de paso de banda que transmite longitudes de onda entre 550 y 570 nm y absorbe el resto de las longitudes de onda (línea verde en el figura 5-6). Este filtro recibe la luz blanca, la filtra y la pasa hacia el espejo dicroico.

Espejo dicroico (Di02-R561): este espejo refleja todas aquellas longitudes de onda que estén por debajo de los 570 nm y permite el paso de longitudes que estén por encima de dicho valor (línea roja en la figura 5-6). Es decir, refleja la luz que sale del filtro de excitación y la direcciona hacia la muestra a través del objetivo del microscopio. Así se genera la excitación y emisión de luz de la muestra, y una fracción de la luz de emisión regresa a través del objetivo del microscopio y se vuelve a encontrar con el espejo dicroico. En este caso, la luz de emisión, de mayor longitud de onda, atraviesa el espejo y pasa hacia el filtro de emisión.

Filtro de emisión (BLP02-561R): es un filtro de banda ancha que absorbe longitudes de onda menores a los 570 nm y transmite casi al 100 % las que están por encima de 570 nm (línea azul en la figura 5-6). Así, parte de la luz de excitación remanente se filtra y predomina la luz que emite la Rf. La luz filtrada pasa hacia el detector o los lentes del microscopio.

5.2.5 Determinación de la intensidad de fluorescencia en microgotas

Para determinar la intensidad de fluorescencia en la microgotas, se tomaron videos para cada ensayo del paso de las microgotas a través del canal de análisis. Cada video tuvo un duración de al menos 10 min y se tomaron con una cámara phantom (Miro M110, AMTECK) acoplada al microscopio y que funcionó como detector. Se utilizó una velocidad de captura de 12 c/s (cuadros por segundo), un tiempo de apertura del obturador de 7100 μ s y una resolución de imagen de 520x320 px. A excepción de que se mencione lo contrario, todos los videos se tomaron utilizando estos parámetros.

La cámara phantom tiene una memoria interna que determina el tiempo de video que se puede grabar. Esto depende de la velocidad de captura y la resolución de la imagen. Para obtener videos de larga duración se necesitan frecuencias bajas de captura y resoluciones de imagen bajas. Sin embargo, el controlador interno de la cámara solo permite grabar a 24 c/s como la frecuencia más lenta. La resolución utilizada en los ensayos solo permitía obtener 4 min de video. Con la intención de obtener videos de mayor duración y muestrear un mayor número de gotas por ensayo, se disminuyó la frecuencia de captura de la cámara con un controlador externo. Para ello, se utilizó una tarjeta de adquisición de datos (Multifunction DAQ, National Instruments) que permitió transferir a la cámara pulsos de 5 V a una frecuencia de 12 pulsos/s, cada pulso corresponde a un disparo de la cámara. De esta manera se pueden obtener videos de hasta 30 min de duración.

Los videos obtenidos se analizaron con un código en Matlab que permite determinar la intensidad de luz, mediante el promedio de pixeles RGB, en una región de interés fija a través de todos los cuadros del video. Para hacer uso del código se deben de seguir los siguientes pasos:

- 1) Abrir en Matlab el código nombrado *microgotas.m* (Anexo 1)
- 2) Arrastrar a la ventana de comando el video que se desea analizar. Este se debe encontrar en formato *.mov* para que el código pueda procesarlo. El programa toma unos minutos para importar el video y posteriormente aparece la opción de renombrar el video. El nombre que se le dé a la variable en esta ventana se deberá escribir también en la línea once del código.

```
11 >> tempImage=double(Nombre del video(:,:,1, cuadros));
```

- 3) En la ventana de comando se debe escribir la instrucción:

```
>> size(Nombre del video)
```

Como resultado se obtienen el número de cuadros o fotografías que contiene el video y las dimensiones de los cuadros en pixeles. En la línea 9 del editor se debe modificar el número de cuadros que el programa analizará. Por ejemplo, si el video contiene 1000 cuadros y se desearan analizar por completo se deberá escribir en la

línea 9, 1:1000. Si solo se quisieran analizar los primeros 500 cuadros, se debe escribir entonces 1:500. Si por error se anota 1:2000 el código generará un error ya que el video es más corto que 2000 cuadros.

4) En la ventana de comando escribir la instrucción:

```
>> imagesc(Nombre del video(:, :, :, # de cuadro que se desea abrir))
```

Este comando permite abrir cualquier cuadro del video. Los dos puntos en el argumento del comando indican que queremos abrir los cuadros (imágenes del video) en todo su largo, ancho y con todos los colores que contienen, respectivamente. Al final del argumento se debe especificar el número de cuadro en el video que se desea abrir. En los experimentos realizados en este trabajo se graba una posición fija en el microchip durante toda la extensión del video, por lo tanto, es indiferente el cuadro seleccionado.

5) Correr el código y dibujar las regiones de interés en la imagen obtenida en el paso 4. Se recomienda colocar la región de interés en la parte central del canal por donde viajan las microgotas, según se indica en la figura 5-7. La región seleccionada será la misma que se analizará en todos los cuadros del video seleccionado.

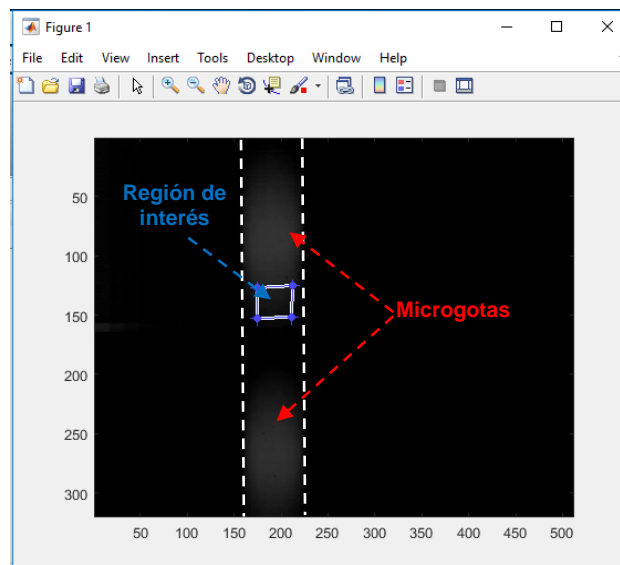


Figura 5-7. Ejemplo de la manera recomendada para dibujar la región de interés en el análisis de videos con matlab.

- 6) Una vez que el programa analice los cuadros seleccionados, en el espacio de trabajo aparecerá la variable **datos a3**. Cuando se abre esta variable se podrán copiar los datos en una hoja de cálculo para su posterior procesamiento.

5.3 Ensayos celulares en microgotas.

Para determinar la actividad metabólica bacteriana en las microgotas se introdujeron en el microchip 3 disoluciones diferentes en fase acuosa según se indica en la figura 5-4. El flujo de introducción de todas las disoluciones acuosas fue de 20 $\mu\text{L/h}$, y el aceite fluorado con 0.1 % de KryJeff se introdujo a 100 $\mu\text{L/h}$.

5.3.1 Preparación de disoluciones.

Para la suspensión de bacterias se inoculó, dentro de una campana de flujo laminar, una placa de agar-LB con células de *E. coli* BL21 (DE3) y se incubó a 37 °C durante 16 horas. De esta placa se tomaron de tres a cuatro colonias y se re-suspendieron en 2 mL de medio líquido 2YT. La suspensión se colocó en una incubadora (Excella E24, New Brunswick Scientific) a 37 °C y con agitación a 200 RPM durante una hora. Posteriormente, se tomó 1 mL de esta suspensión y se llevó a 2 mL en medio líquido 2YT fresco. La absorbancia a 600 nm de la última suspensión se determinó con un espectrofotómetro (Spectronic 200, Thermo Scientific) y se ajustó la densidad óptica a un valor de 0.2 A_{600} . Esta serie de pasos se realizó para evitar la aglomeración de células en la suspensión de trabajo. La solución bacteriana final se colocó dentro de una jeringa de 1 mL (BD) y se inyectó en el microchip mediante una bomba (New Era) a 20 $\mu\text{L/h}$.

Para las disoluciones de Rz (Sigma) se preparó una solución madre de 1 mM en amortiguador de fosfatos pH 7.5. Ésta solución se guardó en congelación hasta su uso. Se tomaron 150 μL de la solución madre y se llevaron a 1 mL con medio líquido 2YT, obteniendo disoluciones 150 μM de Rz para cada ensayo. Estas disoluciones se colocaron en jeringas de 1 mL (BD) y se introdujeron en el microchip a 20 $\mu\text{L/h}$.

Por último, el tercer componente de la fase acuosa corresponde a una disolución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 10 mM que se inyectó a 20 $\mu\text{L}/\text{h}$ en el microchip. Dependiendo del ensayo, el amortiguador se preparó: (i) sin ningún antibiótico disuelto, para determinar la actividad metabólica basal de las bacterias sin ningún agente tóxico; (ii) con kanamicina (monosulfato de kanamicina, GoldBio) a una concentración 1 mM, para establecer un control de inhibición del metabolismo bacteriano; y (iii) con el extracto acuoso de la raíz de *Pelargonium sidoides* (Umckaloabo, Farmasa Schwabe) a 3.0 mg/mL, para la evaluación de su poder bactericida (muestra problema).

El extracto de *P. sidoides* se obtuvo del producto comercial Umckaloabo en forma de grageas. A partir de 10 grageas sin recubierta y pulverizadas se agregaron 10 mL de agua destilada y la mezcla se dejó con agitación durante una noche. Al final de este periodo, se tomó el sobrenadante y se evaporó el disolvente al vacío y con líneas de aire. Al final se obtuvo un sólido color café del que se pesaron 3 mg y se disolvieron en 1 mL de amortiguador pH 7.5. Esta se pasó a través de un filtro de 0.2 μm y se colocó sobre una jeringa de para su inyección en el microchip.

5.3.2 Ensayos celulares en placas de 96 pozos

Con la intención de comparar los resultados obtenidos en los ensayos con microgotas y los métodos tradicionales para ensayos celulares, se realizaron pruebas con kanamicina y el extracto de *P. sidoides* en placas de 96 pozos siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se inoculó una placa de LB-agar con células de *E. coli* e incubó a 37°C por 16 h. Trabajando siempre dentro de una campana de flujo laminar.
2. Se tomaron de tres a cuatro colonias aisladas del mismo tamaño y forma, y se resuspendieron en 200 μL de medio líquido 2YT estéril.
3. Se tomaron 100 μL de la suspensión y diluyeron 1:10 con medio 2YT, se determinó la densidad óptica a 600 nm.

4. Se calculó la concentración de bacterias de la suspensión original (paso 2) tomado en cuenta la relación aproximada: $OD_{600} = 0.135$ equivale a 3.2×10^7 UFC (unidades formadoras de colonia).
5. Se diluyó la suspensión original (paso 2) con 2YT hasta una concentración final entre 0.25×10^6 y 0.5×10^6 UFC. El volumen final se debe calcular considerando que se utilizarán 90 μ L de esta suspensión por cada pozo que se quiera emplear.
6. Se disolvieron el antibiótico kanamicina y la muestra problema *P.sidooides* a una concentración 10 veces mayor de la que se utilizó en el pozo, según se indica en la tabla 5-2.

Tabla 5-2. Concentraciones para las disoluciones utilizadas de kanamicina y el extracto de *P.sidooides* en los ensayos de placas de 96 pozos. Esta concentración quedo 10 veces diluida en cada pozo.

# de Disolución	Kanamicina (μ M)	Extracto acuoso de <i>P. sidooides</i> (mg/mL)
1	10	10
2	33	33
3	100	100
4	333	333
5	1000	1000
6	3330	3330

7. En cada pozo se colocaron 90 μ L de la suspensión de bacterias del paso 5 y agregaron 10 μ L de la solución de kanamicina o *P. sidooides* para cada concentración.
8. La placa de 96 pozos se selló con parafilm e incubó a 37°C y 200 rpm durante 16 h.
9. Al termino de este periodo, se registró la densidad óptica a 600 nm con ayuda de un lector de placas (FLUOstar Omega, BMG Labtech)

6 Resultados y discusión

En este trabajo se desarrolló una plataforma de microfluídica basada en microgotas con la finalidad de identificar el efecto de un agente antibiótico sobre la actividad metabólica bacteriana. La plataforma, se conforma por tres componentes: un microchip de PDMS para la formación de microgotas, tubería PTFE para traspasar e incubar las microgotas y un microchip de PDMS para el análisis de las mismas. Para determinar el metabolismo bacteriano en este sistema, se utilizó el marcador de viabilidad celular por fluorescencia Rz. Este compuesto puede ser transformado por las bacterias con actividad metabólica a Rf, el cual es un compuesto de mayor intensidad de fluorescencia. La intensidad luminosa de las microgotas, asociada al metabolismo celular, se midió utilizando la técnica de microscopia de fluorescencia y análisis de imágenes. A través de este capítulo se irán abordando cada uno de los componentes mencionados, sus características físicas y funcionalidad. Así mismo, se explicarán los ensayos realizados haciendo uso de esta plataforma.

6.1 Caracterización física de microchips

Los microchips de formación y análisis de microgotas se fabricaron en PDMS mediante la técnica de litografía suave. Se llevó a cabo una caracterización física de los dispositivos en PDMS, que consistió en determinar las dimensiones reales (largo y ancho) de los canales por los cuales viajan las microgotas. Con este fin, se realizaron cortes con bisturí en ambos dispositivos según se indica en la figura 6-1. Cada sección obtenida se observó al microscopio con un objetivo 20x, se tomaron fotos y analizaron con el programa Image J previamente calibrado, los resultados se muestran en la tabla 6-1.

Tabla 6-1. Resultados de la caracterización física de los microcanales, los valores corresponden al valor medio de tres mediciones con su respectiva desviación estándar.

	Microchip de formación		Microchip de análisis	
	canal de fase acuosa (μm)	canal de aceite (μm)	canal de microgotas (μm)	canal de análisis (μm)
Ancho	43 ± 1	63 ± 1	235 ± 1	69 ± 3
Altura	52 ± 1	61 ± 1	56 ± 1	72 ± 2

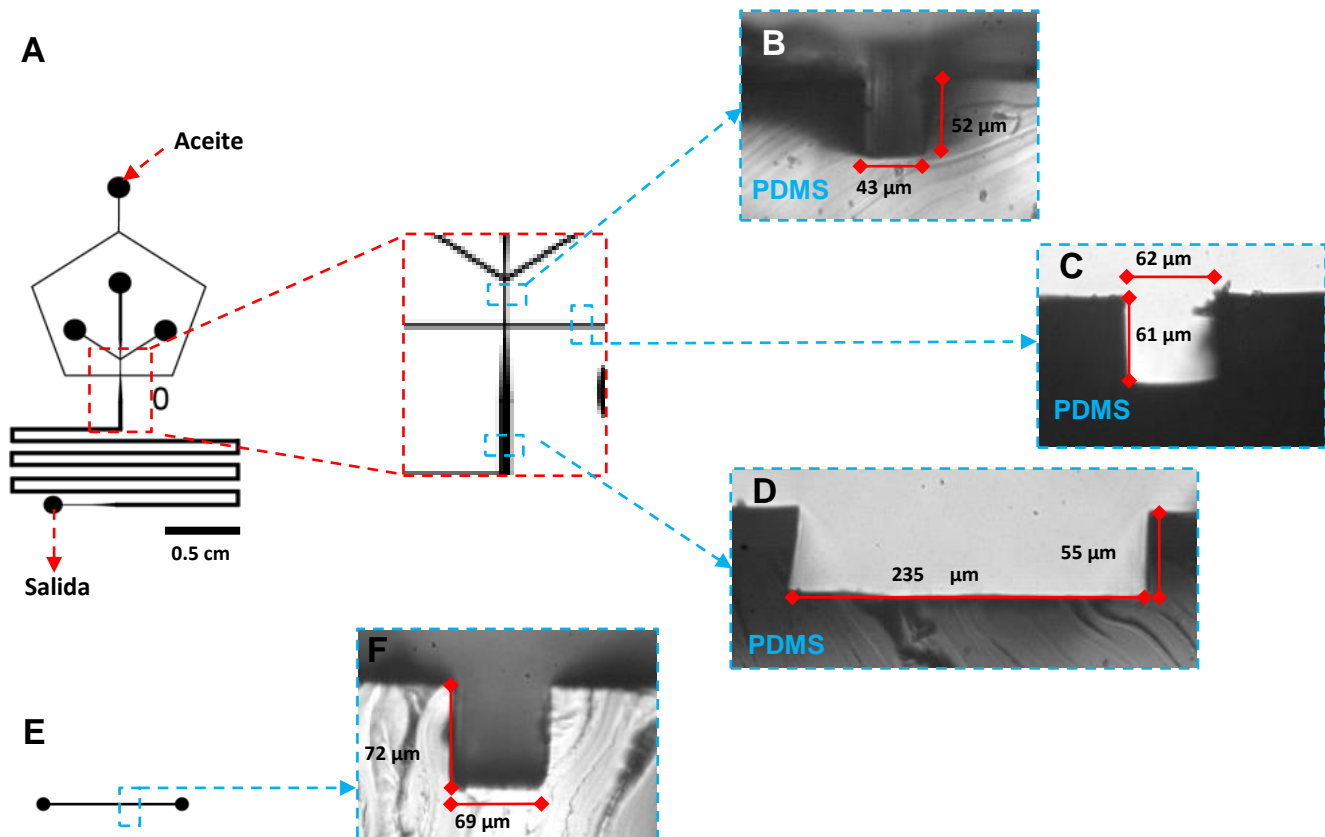


Figura 6-1. (A) Diseño del microchip para formación de microgotas. (B) Dimensiones del canal donde se juntan los tres componentes de la fase acuosa. (C) Dimensiones del canal por donde viaja la fase oleosa. (D) Dimensiones del canal por donde viajan las microgotas recién formadas antes de traspasarse al canal de análisis o incubación. (E) Diseño del canal de análisis. (F) Dimensiones del canal de análisis.

6.2 Formación de microgotas

El microchip de formación de microgotas tiene una geometría de enfoque de flujo. Esta permite que la fase acuosa (componentes del ensayo celular) y oleosa (aceite fluorado con 0.1% de KryJeff) se intersecten en la base del pentágono donde se generan las microgotas (figuras 6-1 A y 6-2). El aceite, se introduce a un flujo de 100 $\mu\text{L/h}$ por la parte superior del pentágono y viaja por las líneas que lo dibujan. De igual forma, cada uno de los tres componentes de la fase acuosa se introduce a 20 $\mu\text{L/h}$ en la parte interna del pentágono, donde se unen y fluyen hacia la base. Las fuerzas interfaciales que se presentan cuando ambas fases se intersectan, propician la fragmentación de la fase acuosa en microgotas, que se dispersan en la fase continua de aceite y viajan hacia la salida del microchip (figura 6-2).

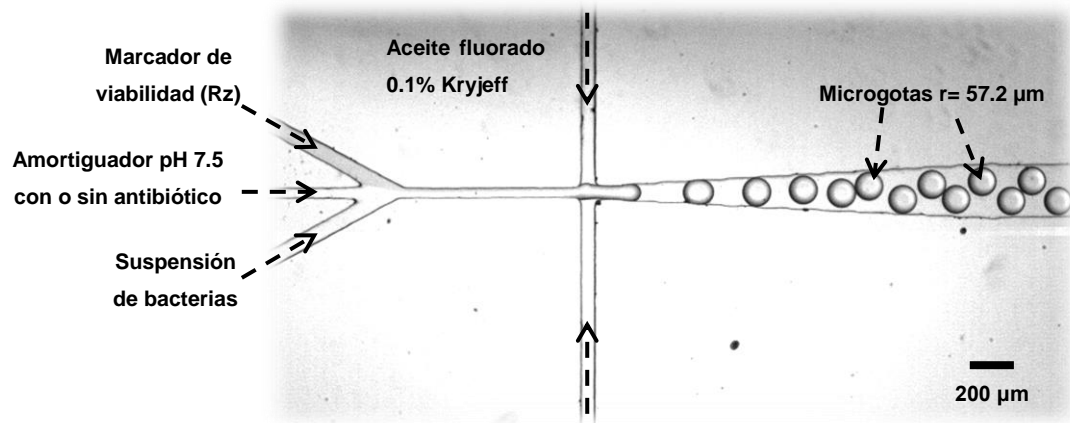


Figura 6-2. Fotografía del microchip de formación de microgotas observado en el microscopio con un objetivo 4x. Se utilizó una geometría de enfoque de flujo, la fase oleosa interseca a la fase acuosa por dos flancos generando su fragmentación en microgotas con una distribución de tamaño muy estrecha (< 1.5 %).

Como se mencionó en la sección 2.4 de los antecedentes, la encapsulación de bacterias en microgotas permite que los metabolitos que excreta la célula queden retenidos dentro de la gota por la interfase agua-aceite, generando así un microambiente a los alrededores del espécimen en estudio. Por otro lado, una de las conclusiones del trabajo realizado por Kaushik A. M. en 2017⁵⁴ explica: “mientras menor sea el volumen de la microgota que encapsula el espécimen, entonces, los metabolitos excretados se concentrarán a mayor velocidad y, por lo tanto, la detección del metabolito será más rápida y eficiente que en gotas de mayor volumen”.

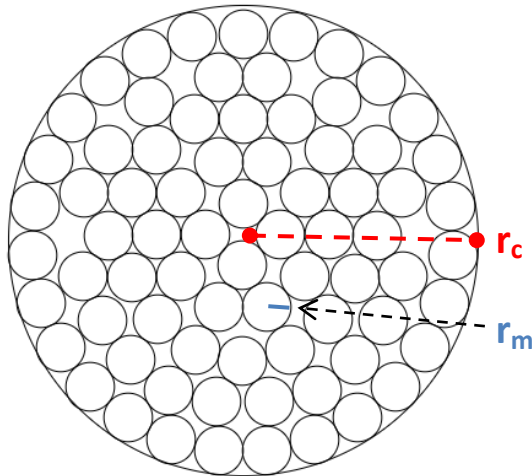
Las observaciones anteriormente mencionadas justifican las dimensiones de los canales utilizados en este proyecto. Mientras menor sea el área de la zona de intersección entre la fase acuosa y oleosa, menor será el diámetro de las microgotas formadas. De tal forma, con los flujos y las dimensiones de los canales utilizados, se lograron generar gotas de **381.5±5.1 pL**. Con estas condiciones, a tan solo dos horas de incubación de las microgotas que encapsulan bacterias, fue posible identificar el producto del marcador de viabilidad celular, Rf. Este tiempo de incubación es comparable con otros estudios similares reportados en los últimos años^{55,60}.

6.3 Incubación de microgotas

Una vez formadas, las microgotas se pueden traspasar rápidamente al microchip de análisis, o bien, conducir las por un camino más largo para una incubación previa. El camino largo consistió en una tubería de PTFE, de 25 cm de longitud y un diámetro interno de 1.1 mm, colocada en posición vertical sobre una placa de calentamiento a 37 °C. Inicialmente, se llenó la tubería con aceite fluorado y las microgotas se introdujeron por la parte superior, de tal forma que las microgotas, al ser de menor densidad, desplazaron al aceite que ocupaba la tubería conforme las microgotas fueron entrando.

En la extrema izquierda de la figura 6-3, se muestra en color morado la entrada de las primeras microgotas que se introdujeron en la tubería (parte superior de la imagen). A medida que van pasando los minutos, se producen nuevas microgotas que empujan a las anteriormente formadas y generan un desplazamiento continuo a través del capilar. Todas las microgotas avanzan en forma de capas en la sección transversal a la tubería empujando a sus antecesoras en un flujo ininterrumpido. Debido a que el radio de la tubería es 9.6 veces mayor que el radio de las microgotas, solo se pueden formar monocapas de un máximo de 75 microgotas⁶¹ (figura 6-3 A). De tal forma, no se puede asegurar que la primera microgota en formarse será la primera microgota en ser analizada, pero si sabemos que la primera gota que se analizará será de las primeras 75 que entraron en la tubería. A los flujos utilizados, cualquier microgota que se forma y pasa por esta tubería, tardará 130 min en recorrerla de extremo a extremo. Es decir, pasaran 130 min entre la formación y la detección de cualquier microgota a la salida de la tubería. Es importante reiterar que durante todo este trayecto, la tubería se encuentra a 37 °C, parámetro muy importante para los ensayos celulares que se presentarán más adelante.

A



Si

$$r_c = 9.6r_m$$

Entonces el número máximo de gotas por monocapa es:

75

B

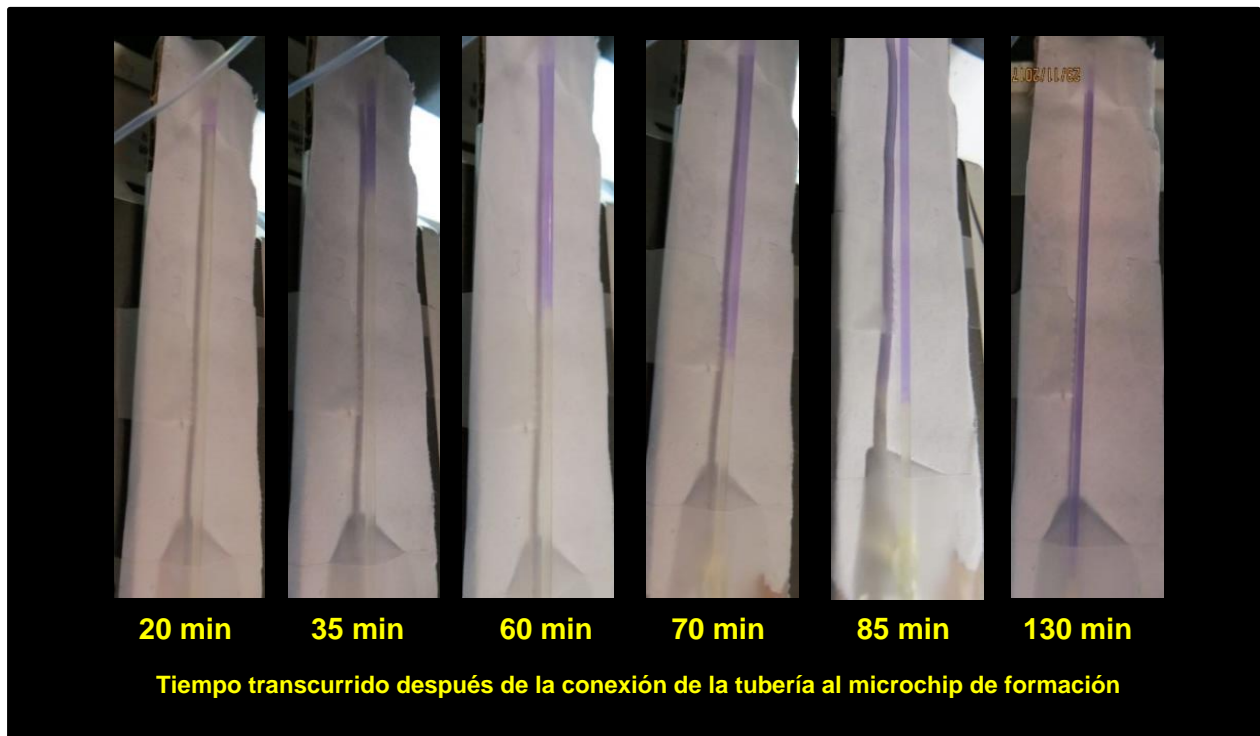


Figura 6-3. (A). Número de gotas que se pueden empaquetar en una monocapa circular cuyo radio del círculo mayor (r_c) es 9.6 veces mayor que el radio de las microgotas (r_m). (B) Tubería de incubación de microgotas. De izquierda a derecha se observa, en color morado, el avance de las microgotas a través del capilar. Se necesitan 130 min para llenar por completo la tubería, es decir, cualquier microgota recién formada tarda 130 min en recorrer toda la tubería y llegar a la zona de análisis a la salida de la misma. Debido a que se tiene un flujo continuo y constante a través del tiempo, se puede aseverar que en un punto específico de la tubería todas las microgotas que se encuentren a esa altura tendrán el mismo tiempo de haberse formado.

Con la intención de observar el orden en que las microgotas viajan a través de la tubería, se realizaron experimentos con colorantes. Disoluciones de un colorante rojo, colorante

azul y una disolución incolora de amortiguador pH 7.5 se inyectaron en el microchip de formación acoplado al capilar de incubación. Durante la formación de microgotas, los flujos de los colorantes se fueron cambiando proporcionalmente. Si los flujos eran iguales, se obtenían gotas color morado. Si el flujo del colorante azul era mayor con respecto a los otros, entonces se obtenían gotas color azul (figura 6-4 A) o viceversa para la generación de gotas rojas (figura 6-4 B). Con esta estrategia, se formaron gotas hasta llenar la tubería de incubación, intercalando la proporción de flujos para obtener gotas de diferente color durante el llenado. En la figura 6-4 C, se observa claramente que se conserva cierto orden de formación de las microgotas. Los cambios en las tonalidades de las microgotas a través de la tubería concuerdan con el registro de las variaciones en el flujo.

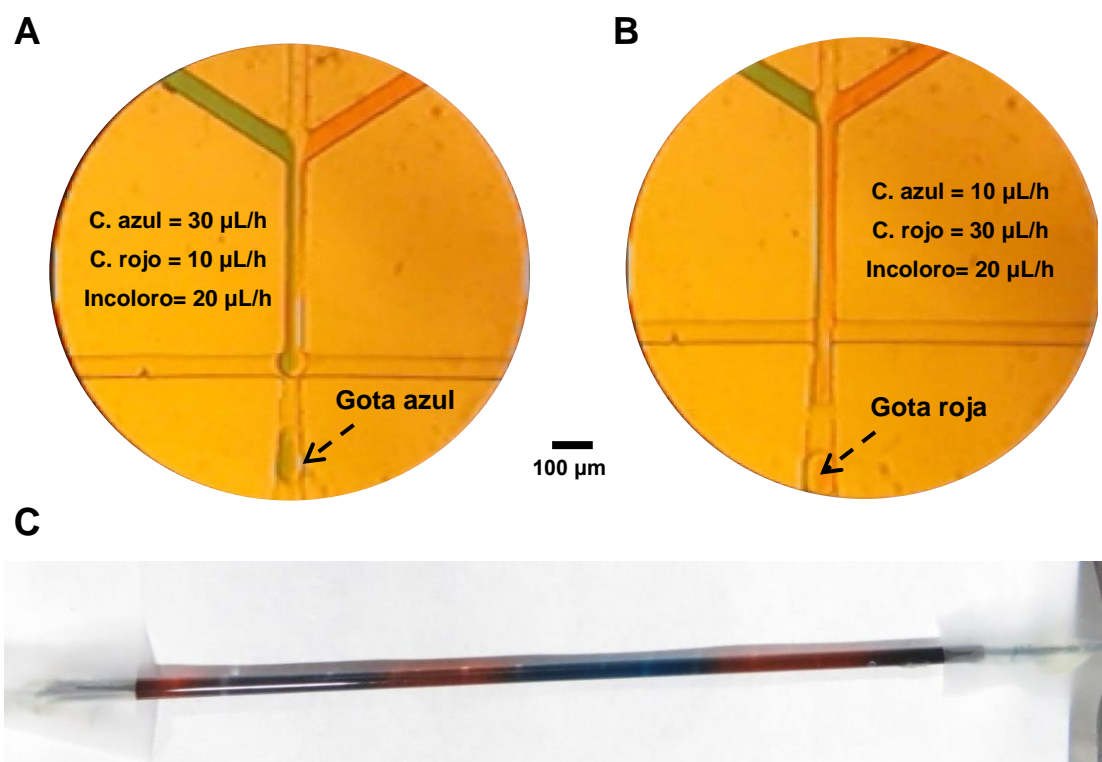


Figura 6-4. Formación de microgotas con colorantes variando la proporción de flujos. (A) El flujo de colorante azul es mayor que el flujo de colorante rojo, dando como resultado gotas color azul. (B) Formación de microgotas color rojo, debido a un mayor flujo de colorante rojo sobre el azul. (C) El capilar, al cual se traspasaron la microgotas formadas con colorantes, conserva el registro de los cambios en las proporciones del flujo.

6.4 Ensayos celulares utilizando la plataforma de microfluídica

Todos los ensayos celulares se llevaron a cabo con la cepa de *E. coli* BL21 y Rz como marcador de viabilidad celular por fluorescencia. Haciendo uso de la plataforma de microgotas se realizaron los siguientes ensayos: (i) sin antibióticos, para establecer la actividad metabólica de bacterias con las condiciones adecuadas para la proliferación celular; (ii) sin bacterias, para observar el comportamiento del sistema y de la tinta Rz en ausencia de bacterias; (iii) en presencia del antibiótico kanamicina, para determinar un control positivo de inhibición y (iv) con una muestra problema para la identificación de extractos naturales con propiedades bactericidas.

6.4.1 Ensayos sin antibióticos

Para determinar la actividad metabólica de las células de *E. coli* mediante la cantidad de tinta Rz reducida por el metabolismo celular bajo las condiciones adecuadas para su proliferación en microgotas, se mezclaron tres soluciones acuosas en el microchip de formación de microgotas. La primera fue una suspensión de bacterias a una $OD_{600}=0.2$ en medio 2YT. La segunda solución consistió en Rz disuelta en el medio 2YT. Por último, el tercer componente de la fase acuosa consistió en un amortiguador de fosfatos pH 7.5, este componente se agrega para contrarrestar las variaciones en el pH producidas por el metabolismo celular y que podrían provocar variaciones en la intensidad de fluorescencia de Rz²³.

En la figura 6-5 A, se muestra la inyección de los tres componentes de la fase acuosa en el microchip de formación de microgotas iluminados con luz de longitudes de onda entre 350 y 400 nm a través de un objetivo 20x. A estas longitudes de onda, el medio 2YT fluoresce en color azul y el marcador Rz en color rosa, y el amortiguador, que se introduce en la parte central, no tiene propiedades fluorescentes. La imagen 6-5 A solo se presenta para ilustrar la introducción de los componentes de la fase acuosa. En la figura 6-5 B, se observa la misma sección del microchip pero iluminado con longitudes de onda entre 550 y 575 nm. Con este arreglo óptico, solo la disolución de Rz presenta propiedades fluorescentes, ya que se excita con un máximo de absorción en 600 nm y emite luz naranja

con un espectro centrado a los 634 nm. Unos 400 μm más a la derecha, de lo que se puede observar en las imágenes 6-5 A y B, los componentes del ensayo se intersectan con la fase oleosa formando microgotas fluorescentes como las que se aprecian en a figura 6-5 C y que se encuentran viajando hacia la salida del microchip de formación.

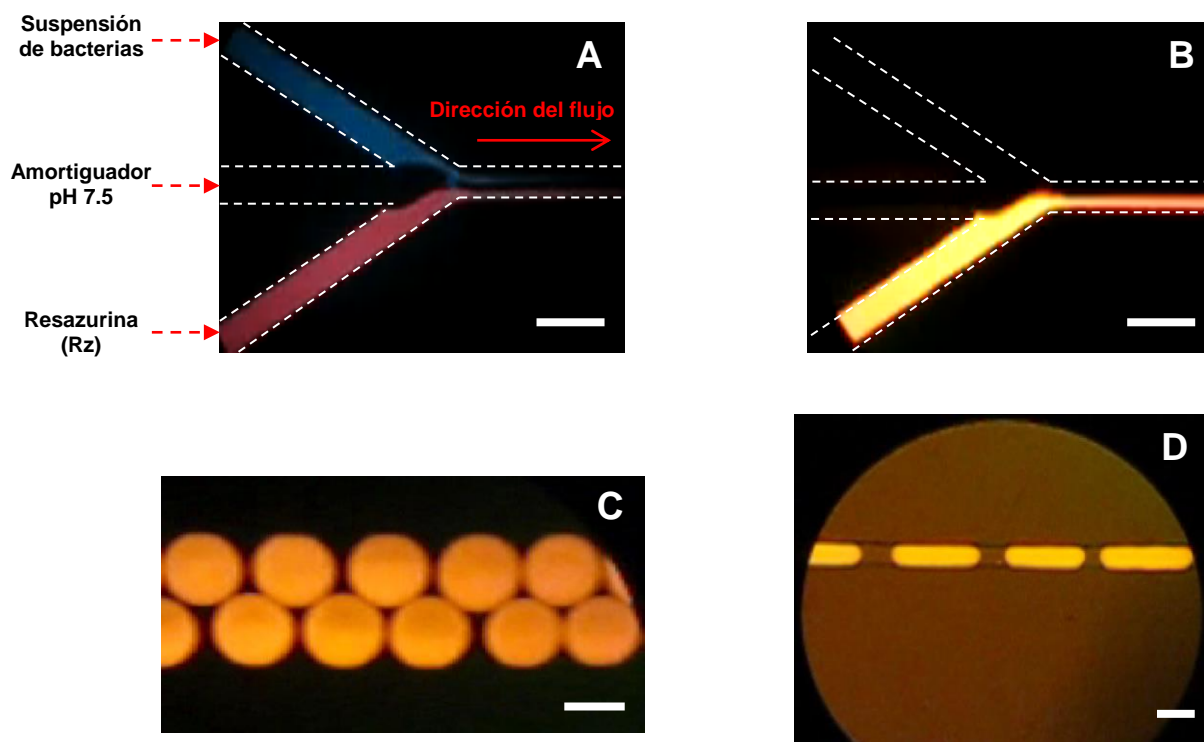


Figura 6-5. (A) Introducción de los componentes del ensayo celular en el microchip de formación de microgotas. El microchip se encuentra iluminado con luz de longitudes de onda entre 350 y 400 nm que provocan la fluorescencia tanto de Rz como del medio 2YT. (B) Se muestra la misma sección del microchip que en “A” pero esta vez se ilumina con luz de longitudes de onda entre 550 y 575 nm que solo inducen a fluorescencia de Rz. (C) Microgotas viajando hacia la salida del microchip de formación por el canal de 235 μm de ancho, se observan bajo el mismo arreglo óptico que en “B”. (D) Microgotas reintroducidas en el canal para su irradiación y análisis, el ancho de este canal (70 μm) obliga a las microgotas a viajar una tras otra en forma de tren (objetivo 10x para D). Las barras de escala corresponden a 100 μm .

Después las microgotas que salen del microchip de formación se dirigen hacia el canal de análisis por la tubería de PTFE para poder así determinar su intensidad luminosa. A diferencia del canal de formación, las dimensiones del canal de análisis solo permiten que las microgotas viajen ordenadas una tras otra en forma de tren, favoreciendo que se pueda medir la intensidad luminosa de una gota a la vez (figura 6-5 D).

Un trazo típico de la señal de fluorescencia emitida por el paso de las microgotas a través del canal de análisis se muestra en la figura 6-6. En estas gráficas, cada oscilación representa el paso de una gota a través de la zona de interés, esto con la intención de obtener un perfil adecuado de las microgota y determinar su frecuencia de paso a través de la zona de detección. Los puntos con intensidades cercanas a cero corresponden a la intensidad de luz del aceite que separa a una gota de otra, mientras que los puntos máximos corresponden a la intensidad de luz en el centro de la microgota. De esta figura se puede deducir que la frecuencia de reintroducción de la microgotas es de alrededor de 50 gotas por segundo, ya que en el intervalo de 0.5 segundo se logran registrar alrededor de 25 gotas. Además, se comprueba que la frecuencia de reintroducción es la misma para gotas sin y con incubación.

En la figura 6-6 A se muestra el paso de gotas que se transfirieron inmediatamente después de su formación hacia el chip de análisis. Debido a que éstas microgotas no tuvieron tiempo de incubación ni calentamiento, la intensidad de la fluorescencia que se registra corresponde solo a la concentración inicial R_z en la microgota, sin haberse generado una cantidad detectable de R_f . En la figura 6-6 B, se presenta el trazo típico de microgotas después de 130 min de incubación a 37 °C. En este caso, las bacterias y la R_z presentes en la microgota estuvieron en las condiciones adecuadas para reaccionar y producir concentraciones detectables de R_f . La transformación se ve reflejada en un aumento de la fluorescencia en las microgotas y se puede apreciar que existe un delta de alrededor de 20 unidades relativas de fluorescencia (RFU) entre las gotas sin incubación y las gotas con incubación. Dicha diferencia está directamente asociada a la actividad metabólica bacteriana ya que para un control de microgotas cargadas con R_z pero sin bacterias, se observa la misma intensidad de señal con incubación y sin incubación.

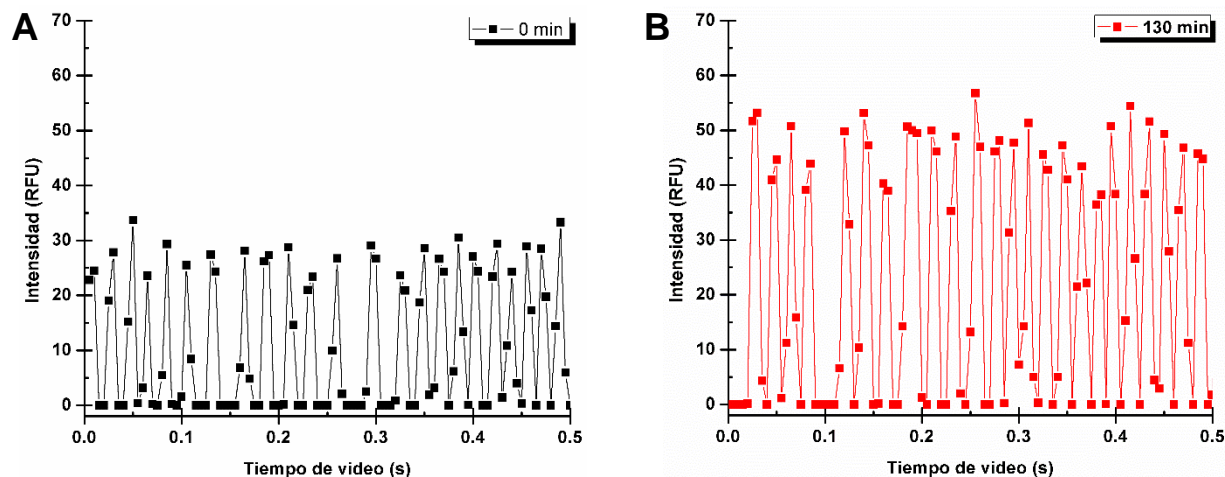


Figura 6-6. Trazo típico de la señal de fluorescencia (>575 nm) emitida por las microgotas que pasan a través del canal de detección. Cada oscilación corresponde al paso de una microgota por la zona de interés en el análisis de videos. La velocidad de captura del video es de 200 c/s y se observó con un objetivo 20x. En (A) se muestra la señal obtenida para gotas sin incubación ni calentamiento. En (B) se presenta la señal registrada para microgotas con 130 min de incubación a 37 °C. Se observa claramente un aumento en la intensidad de fluorescencia asociado directamente a la actividad metabólica de las células de *E. coli* encapsuladas en cada microgota.

A partir de este momento los resultados que se presentarán corresponden al análisis de videos tomados a 12 c/s cuya frecuencia de captura nos permite tomar videos de 10 minutos con una baja densidad de cuadros facilitando su análisis y muestreando gotas por mucho más tiempo, según se indica en la sección de metodología.

El análisis de videos en el programa Matlab permite obtener la intensidad de luz para una región de interés fija en cada uno de los cuadros del video. En la figura 6-7 se muestran los histogramas típicos para la serie de datos de las gotas sin incubación (t=0; columnas negras) y gotas con incubación (t=130 min; columnas rojas). Se pueden observar los valores de fluorescencia de aproximadamente 7500 imágenes tanto para gotas sin incubación, como para aquellas con 130 min a 37 °C. En ambos casos se observa una gran cantidad de datos en la primera clase de cada histograma, centrada en cero, cuyos valores corresponden a las mediciones del aceite que separa a una microgota de otra. Las clases hacia mayores intensidades corresponden a las mediciones en los extremos y centro de las microgotas. La diferencia de intensidad luminosa entre la serie de datos en barras

negras y la serie en barras rojas se asocia directamente a la cantidad de Rz que ha sido metabolizada por las bacterias, generando así un aumento en la intensidad de fluorescencia debido a la acumulación de la especie reducida Rf.

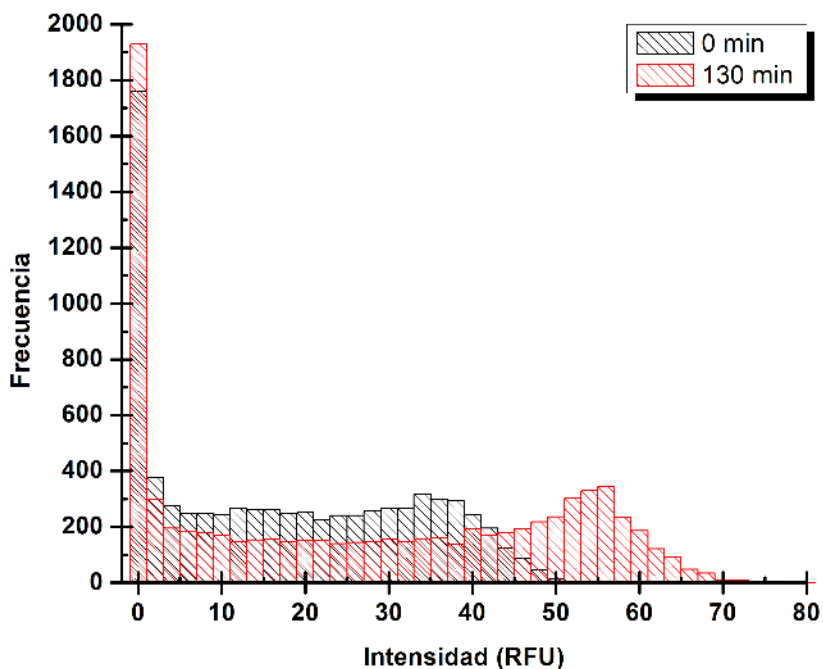


Figura 6-7. Histogramas de intensidad de fluorescencia de microgotas con incubación a 37°C durante 130 min (región roja) y sin incubación (región negra). Se representan los datos crudos obtenidos con matlab.

Sin embargo, no todas las clases que conforman los histogramas de la figura 6-7 corresponden a mediciones de gotas completas. Por ejemplo, en la figura 6-8 se muestran algunos cuadros de video seleccionados, pertenecientes a las clases que conforman los histogramas rojos en la figura 6-7. Los recuadro rojos, en la figura 6-8, indican las regiones de interés seleccionadas para el análisis de luz en todos los cuadros del video. El cuadro A, con una intensidad de fluorescencia de 60 RFU, pertenece a la clase de 59 a 61 RFU y todas las mediciones de esta clase son similares (en el centro de la gota). El mismo tipo de medición se presenta para las clases de 55 a 58 RFU. La diferencia de intensidad luminosa entre estas dos familias de microgotas se atribuyó principalmente a variaciones en los flujos de formación y a la diferencia del número de bacterias iniciales encapsuladas en cada microgota.

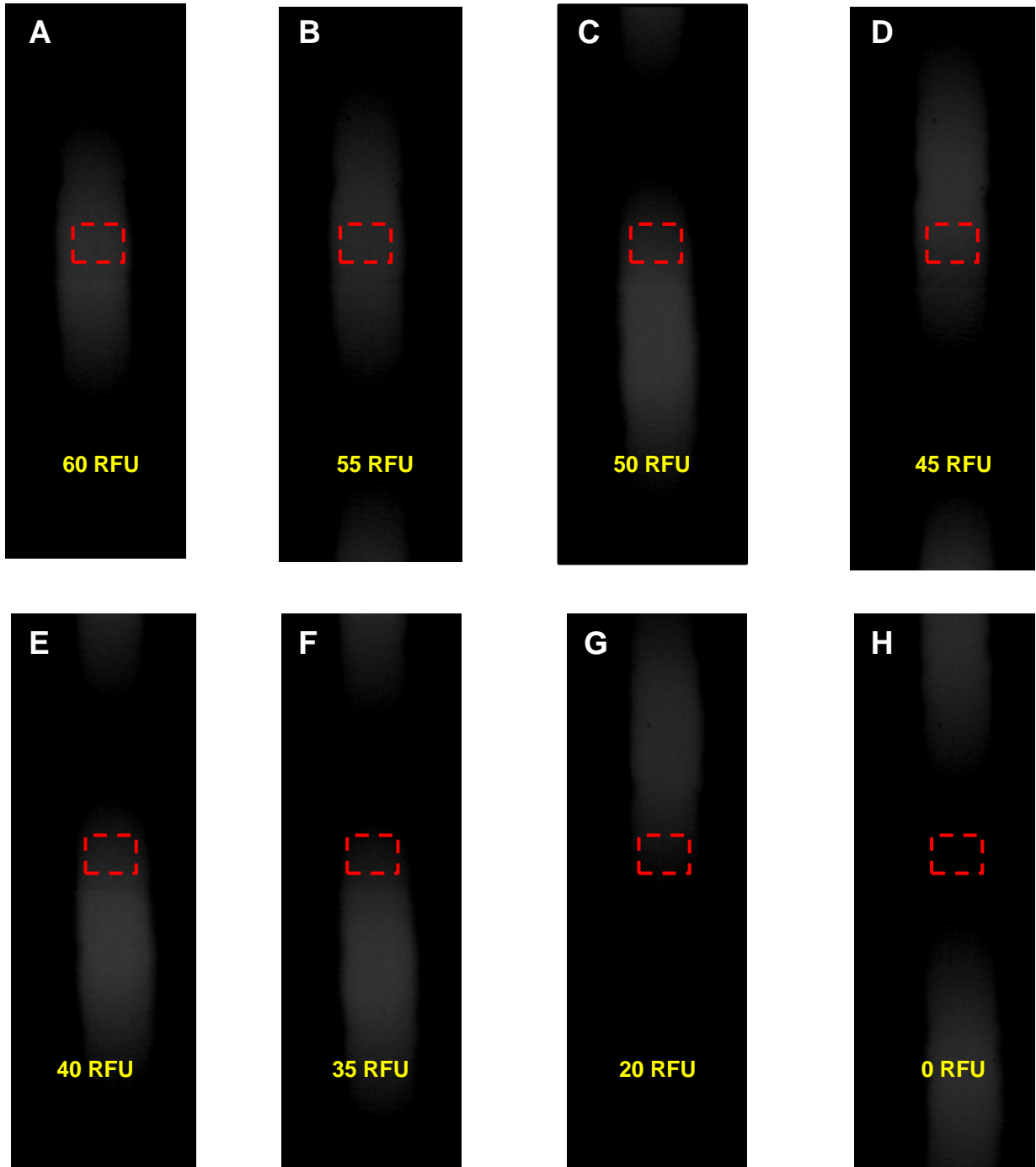


Figura 6-8. Tipos de mediciones que se pueden presentar cuando se examina la intensidad de fluorescencia de microgotas mediante análisis de videos con matlab.

Por otra parte, cuando se comienzan a analizar cuadros pertenecientes a las clases de 45 a 55 RFU se observan dos tipos de mediciones: la primera, como se muestra en el cuadro C de la figura 6-8, es la medición en la cabeza o en la cola de una microgota con mucha intensidad de fluorescencia, generando así un valor de intensidad alrededor de 50 RFU. El segundo tipo de medición corresponde a las determinaciones en el centro de las microgotas con baja intensidad de fluorescencia, debidas a variaciones en los flujos y número de bacterias encapsuladas.

Las clases que se encuentran por debajo de 45 RFU representan mediciones en colas o cabezas de microgota de diferentes intensidades. La sección de microgota que cae dentro de la región de medición se vuelve cada vez menor conforme nos movemos a clases de menor intensidad de fluorescencia. Esta tendencia se conserva hasta llegar a un punto límite, donde la medición se realiza en el aceite que separa a una microgota de otra registrándose un valor de 0 RFU (cuadro H en la figura 6-8).

Bajo estas observaciones y con la intención de seleccionar únicamente aquellos cuadros donde la medición se realizó preferentemente en el centro de la microgota, se decidió aplicar un umbral de 10 RFU por debajo de la clase de mayor frecuencia. Así, se procedió a construir un nuevo histograma (figura 6-9) utilizando solo los cuadros donde se obtuvieron mediciones de intensidad de fluorescencia en el centro de la microgota. La asimetría de las distribuciones obtenidas se atribuye entonces a las mediciones de colas o cabezas de gotas con alta intensidad de fluorescencia, cuyos casos solo se presentan de 4 a 5 clases por debajo de la familia de mayor frecuencia. Es decir, el impacto de este error de medición es más grande en la mitad izquierda de cada distribución que sobre su mitad derecha.

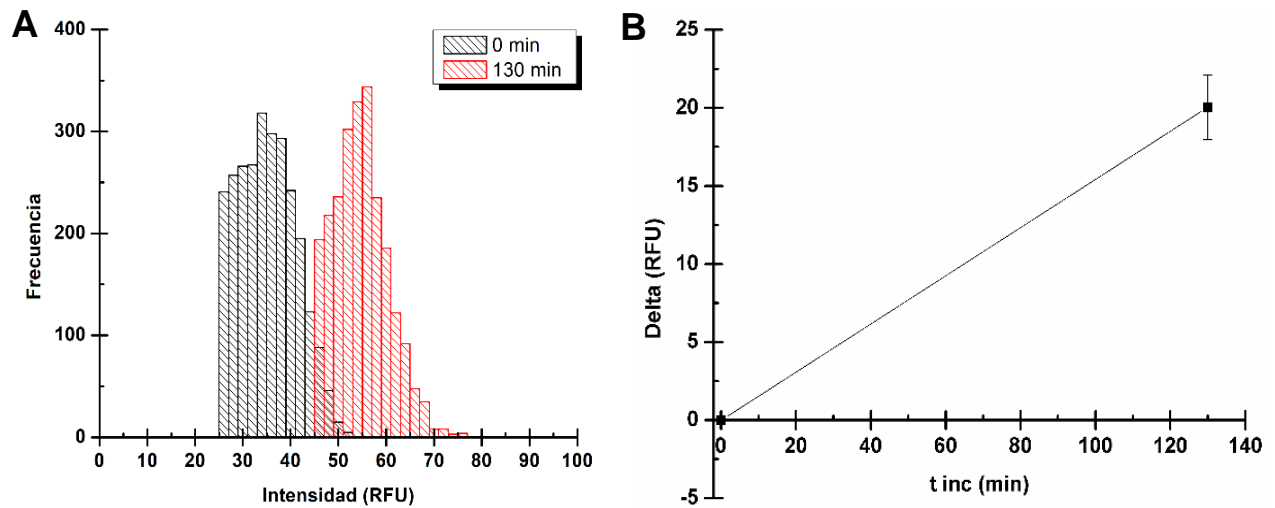


Figura 6-9. (A) Distribución de intensidad de fluorescencia de microgotas sin incubación (clases negras) y con incubación de 130 min a 37 °C (clases rojas). Los datos representados provienen de la misma serie con la que se construyó la figura 4-7 después de haber aplicado un umbral para seleccionar solo mediciones en el centro de microgotas. (B) Diferencia del promedio de intensidad que existe entre las microgotas con 130 min de incubación y aquellas que no la tuvieron, las barras de error para los puntos en el tiempo 0 min y 130 min corresponden a tres experimentos independientes.

De tal forma, los histogramas que se presentan en la figura 6-9 A, corresponden a una distribución de intensidades de fluorescencia de alrededor de 2500 microgotas, que pasan a través de la región de interés en un video de 10 minutos de duración. La diferencia del promedio de intensidad entre cada distribución obtenida se representa en la figura 6-9 B y las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Este delta de fluorescencia se asocia directamente a la actividad metabólica de las bacterias, ya que encapsuladas en las condiciones adecuadas para su proliferación, metabolizan Rz y la transforman en Rf de mayor intensidad de fluorescencia, generando así un delta de 20 RFU entre microgotas con 0 min y 130 min de incubación. La diferencia obtenida concuerda claramente con la que se muestra en la figura 6-6.

6.4.2 Ensayos sin bacterias

Hasta ahora se ha demostrado que haciendo uso de la plataforma desarrollada se puede observar el metabolismo bacteriano en microgotas. Con la finalidad de demostrar que las bacterias son las responsables de la transformación de Rz en Rf, se realizaron ensayos en

microgotas sin bacterias pero sí con el resto de los componentes del ensayo (medio de cultivo sin bacterias, Rz y amortiguador sin antibiótico)

Siguiendo el mismo tratamiento de datos que se mencionó anteriormente, en la figura 6-10 A se muestran los resultados obtenidos para las microgotas sin bacterias pero si con Rz a un tiempo cero de incubación (barras negras) y, las barras rojas muestran la serie de datos para las microgotas sin bacterias y si con Rz después de 130 min de incubación a 37 °C. Se puede observar que las microgotas con incubación no presentaron un aumento en la fluorescencia y que ambas series de datos están sobrepuestas, ya que no hubo ningún componente en las microgotas que provocara la reducción de Rz en Rf. Incluso, como se observa en la 6-10 B, el promedio de tres experimentos independientes para la diferencia entre el t=0 min y t=130 min está 1.7 RFU por debajo de cero. Éste resultado podría deberse a que algunas moléculas de Rz migran desde las microgotas de fase acuosa hacia la fase continua de aceite debido a un fenómeno de reparto entre ambas fases. Sin embargo, la disminución en la intensidad de fluorescencia debido a este fenómeno es menor a 2 unidades y afectaría por igual a ambos experimentos sin alterar los resultados obtenidos.

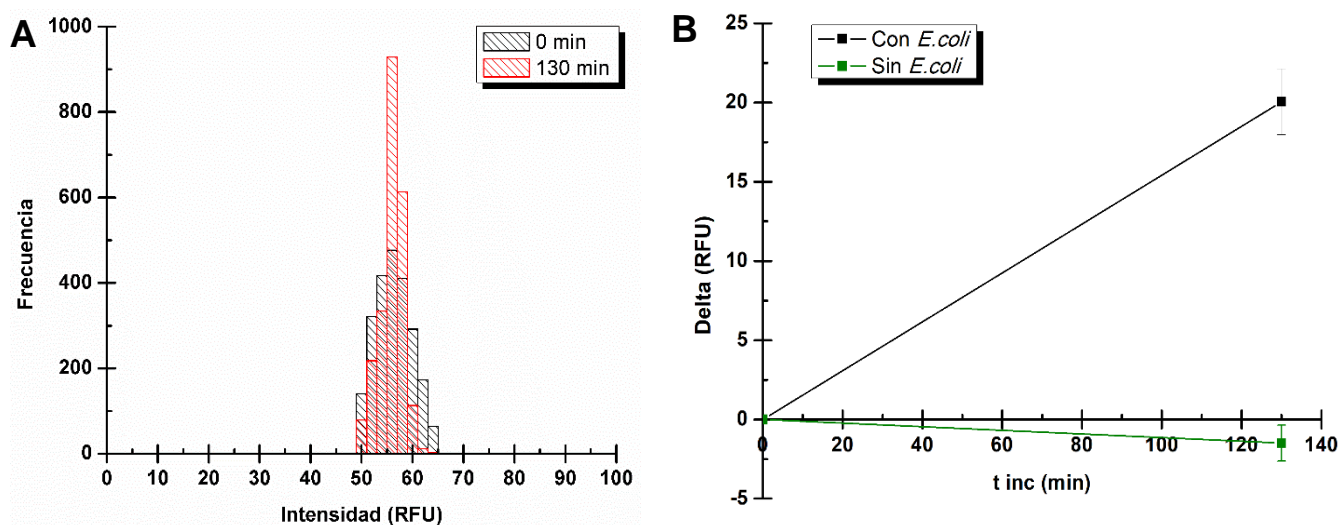


Figura 6-10. (A) Distribución de intensidad de fluorescencia de microgotas en ausencia de bacterias pero si con el resto de los componentes del ensayo. En negro se muestran las microgotas sin incubación y en rojo aquellas con incubación de 130 min a 37 °C (B) Diferencia del promedio de intensidad que existe entre las microgotas con 130 min de incubación y aquellas que no la tuvieron. En negro se muestran los ensayos sin antibiótico y en verde los ensayos sin bacterias. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para controlar el fenómeno de reparto del par Rz-Rf entre la fase acuosa y el aceite fluorado se agregó una concentración baja del tensoactivo KryJeff. La concentración adecuada se estableció con base en lo reportado en la literatura. En 2012, el grupo de trabajo de J.C. Baret ⁴² demostró que a concentraciones altas de KryJeff, la Rz se distribuye entre ambas fases a mayor velocidad debido a la presencia de micelas del tensoactivo capaces de albergar la tinta en la fase de aceite. La opción para contrarrestar el fenómeno de reparto es disminuir la concentración de tensoactivo, sin embargo, si se disminuye demasiado la concentración se compromete la estabilidad de la emulsión, impidiendo la incubación de microgotas durante tiempos prolongados. Para el tiempo de incubación que se utilizó en nuestra plataforma, el 0.1 % de KryJeff disuelto en el aceite nos permitió llevar a cabo los ensayos satisfactoriamente.

Así mismo, si este fenómeno se quisiera disminuir existen varias alternativas ya reportadas. La más eficiente por el momento es el uso de nanopartículas de SiO₂ modificadas. Estas presentan propiedades anfífilas y disminuyen drásticamente el reparto de Rz entre ambas fases ⁶². O bien, otra alternativa es el uso de dodecilresazurina (C12Rz), que corresponde a una modificación en la molécula de Rz con una cadena de 12 carbonos, disminuyendo así su solubilidad en aceite fluorado. La C12Rz permite la incubación de microgotas por un tiempo prolongado sin que se pierda el producto fluorescente encapsulado ⁶³.

6.4.3 Ensayos en presencia de antibiótico (kanamicina)

En las secciones anteriores se mostraron los resultados para ensayos con las condiciones adecuadas para que la actividad metabólica se llevara a cabo libremente y se comprobó que son las bacterias las que llevan a cabo la transformación de Rz. Sin embargo, la pregunta ahora a resolver es: ¿Cómo se comporta el sistema cuando se agrega algún compuesto que impida o inhiba de alguna manera la actividad metabólica de las bacterias?, para resolver esta cuestión se realizaron ensayos en microgotas y en placas de 96 pozos con kanamicina, un compuesto capaz de inhibir la síntesis de proteínas en los ribosomas.

Ensayos con kanamicina en placas de 96 pozos

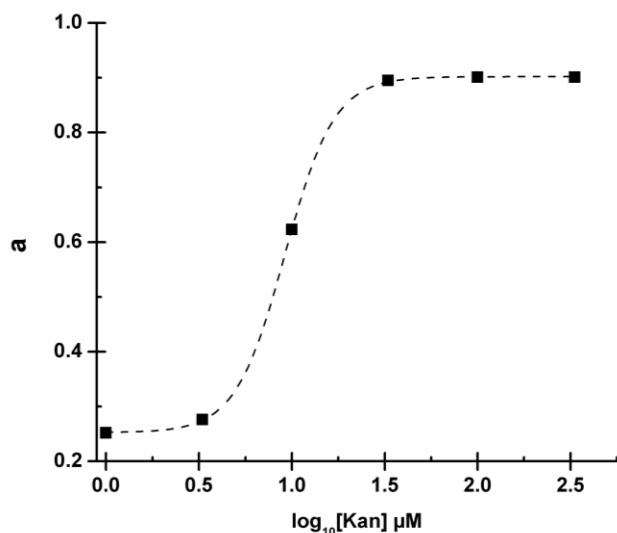
En primer lugar se realizaron ensayos en placas de 96 pozos para verificar que la kanamicina con la que se contaba en el laboratorio de trabajo se encontrará en buenas condiciones y presentara actividad contra las células de *E. coli*. Como se indicó en la sección de metodología, se agregó una suspensión diluida de bacterias en cada pozo con 6 concentraciones diferentes de kanamicina. Después de 16 horas de incubación, se realizó la medición de la absorbancia a 600 nm. La fracción de inhibición del crecimiento bacteriano, "a", se define en la ecuación 1 y se graficó contra el logaritmo de cada concentración de kanamicina utilizada (figura 6-11).

$$a = \frac{A_{600 \text{ sin antibiótico}} - A_{600 \text{ con antibiótico}}}{A_{600 \text{ sin antibiótico}}} \quad (1)$$

Los datos de fracción de inhibición, **a**, contra el \log_{10} de la concentración del antibiótico, **x**, se ajustaron al modelo no lineal de dosis-respuesta que se presenta en la ecuación 2⁶⁴.

$$a = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(log IC_{50} - x)p}} \quad (2)$$

Donde **A₁** es el valor de la asíntota inferior, **A₂** el valor de la asíntota superior, **p** la pendiente de Hill y el **IC₅₀** que se define como la concentración de antibiótico a la cual el crecimiento bacteriano se ha inhibido en un 50 %.



Ecuación	$y = A_1 + (A_2 - A_1) / (1 + 10^{((\log IC_{50} - x) * p)})$		
R^2	0.99993		
		Valor	Error estándar
A_1	0.25259	0.00254	
A_2	0.90205	0.00161	
$\log IC_{50}$	0.96211	0.00301	
p	3.26934	0.13501	
IC_{50}	9.16458		

Figura 6-11. Resultados de los ensayos realizados en placas de 96 pozos con kanamicina, como control positivo de inhibición del crecimiento bacteriano. Los resultados experimentales se ajustaron a un modelo no lineal que permitió determinar el valor de IC_{50} de la kanamicina.

Así, se logró establecer el IC_{50} de la kanamicina contra la cepa de *E. coli* en estudio es de 9.2 μM .

Ensayos con kanamicina en microgotas

Para los ensayos con antibiótico en las microgotas se agregó 1 mM de kanamicina en la disolución amortiguadora que se introduce en el microchip, quedando una concentración final de 333 μM en las microgotas. Ésta concentración de kanamicina utilizada es muy elevada con respecto al valor de IC_{50} determinado mediante el ensayo en pozos (36 veces mayor), y se debió a la diferencia en la cantidad inicial de bacterias en cada ensayo; en los ensayos realizados en pozos se utilizó una concentración inicial de bacterias de 0.5×10^6 UFC/mL, mientras que, la concentración inicial de bacterias en las microgotas fue de 1.58×10^7 UFC/mL, 32 veces mayor. De tal forma, si en la microgotas se agregará una concentración menor de kanamicina no se observaría el efecto esperado en un corto plazo. Por el contrario, debido a la alta concentración inicial de bacterias, estas serían capaces de transformar todo el sustrato Rz antes de ser inhibidas por el efecto de la kanamicina.

De igual forma que en los ensayos anteriores, se llevó a cabo la formación y análisis de las microgotas con kanamicina. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6-12. La serie de datos en color negro corresponde a microgotas con bacterias y kanamicina pero

sin incubación ($t=0$; barras negras), y la de color rojo, corresponde a microgotas con bacterias y kanamicina después de 130 min de incubación a 37 °C. En éste caso, se observó un aumento claro en la media de la fluorescencia de 10 RFU entre las dos series de datos, diferencia que corresponde a la mitad en comparación con los experimentos sin antibiótico (figura 6-12 B).

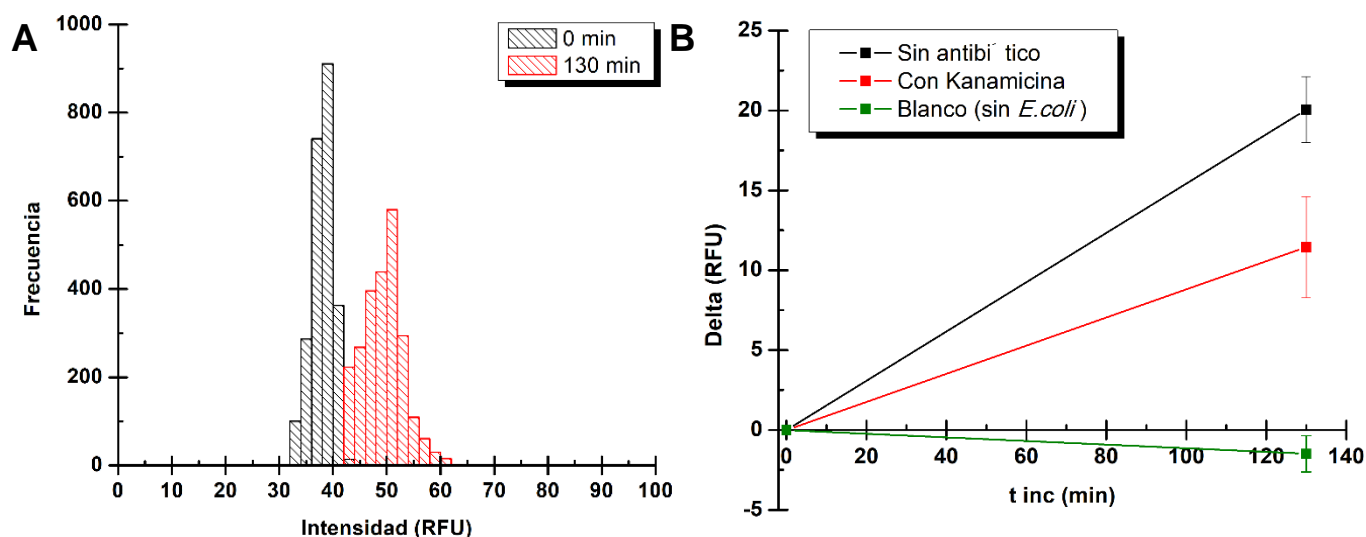


Figura 6-12. (A) Distribución de intensidad de fluorescencia de microgotas sin incubación y con incubación de 130 min a 37 °C en presencia de kanamicina 333 μ M (B) Diferencia del promedio de intensidad que existe entre las microgotas con 130 min de incubación y aquellas que no la tuvieron. En negro se muestran los ensayos sin antibiótico, en rojo los ensayos con 333 μ M de kanamicina y verde los ensayos sin bacterias (blanco). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Debido a que la kanamicina es un amino glucósido que afecta la síntesis de proteínas en las células, provocando la ruptura de su membrana celular, su actividad no necesariamente induce una muerte instantánea de las bacterias. Por lo tanto, dado que las bacterias están en contacto con el antibiótico y la Rz desde que se forma la microgota, se puede llevar a cabo cierta transformación de Rz en Rf, ya que las bacterias están vivas en un inicio. Sin embargo, conforme va pasando el tiempo la kanamicina comienza a actuar y se inhibe la actividad metabólica quedando un número menor de bacterias capaces de metabolizar Rz con respecto al experimento sin antibiótico. En consecuencia, es de esperarse un menor aumento en la intensidad de la fluorescencia de las microgotas, tal como se observa en la figura 6-12 B.

6.4.4 Pruebas con un extracto natural (raíz de *Pelargonium sidoides*)

Una vez comprobado el funcionamiento de la plataforma de microfluídica para la identificación de agentes con propiedades bactericidas, el siguiente paso fue la identificación de nuevas sustancias con potencia antibiótica. Como ya se ha mencionado en los antecedentes, los extractos naturales son una de las fuentes más fructíferas para estos fines. Por ejemplo, en una gran cantidad de trabajos se ha demostrado que *Pelargonium sidoides*, una planta originaria de África, presenta actividad biológica contra diferentes microorganismos⁶⁵. Su principal aplicación se encuentra en el tratamiento de enfermedades respiratorias de origen viral. Sin embargo, también se ha observado actividad contra algunas cepas bacterianas⁶⁶. Por tal razón, se decidió hacer uso de un extracto acuoso de la raíz de *P. sidoides* contra la cepa de *E. coli* en estudio.

Ensayos con el extracto de *P. sidoides* en placas de 96 pozos

En primer instancia se probó la actividad de *P. sidoides* contra *E. coli* en placas de 96 pozos, siguiendo el protocolo descrito en la sección de metodología. Al comparar estos resultados con los obtenidos de la misma forma para kanamicina, se observa que *P. sidoides* inhibe muy poco la actividad metabólica de las bacterias. En la figura 6-13, se muestra la fracción de inhibición, “a”, contra la concentración de antibiótico en mg/mL. Tras el ajuste de estos datos, se obtiene un IC₅₀ de 0.005 mg/mL para kanamicina y de 10 mg/mL para el extracto de *P. sidoides*. A pesar de la baja actividad del extracto de *P. sidoides*, se decidió continuar con el ensayo en microgotas.

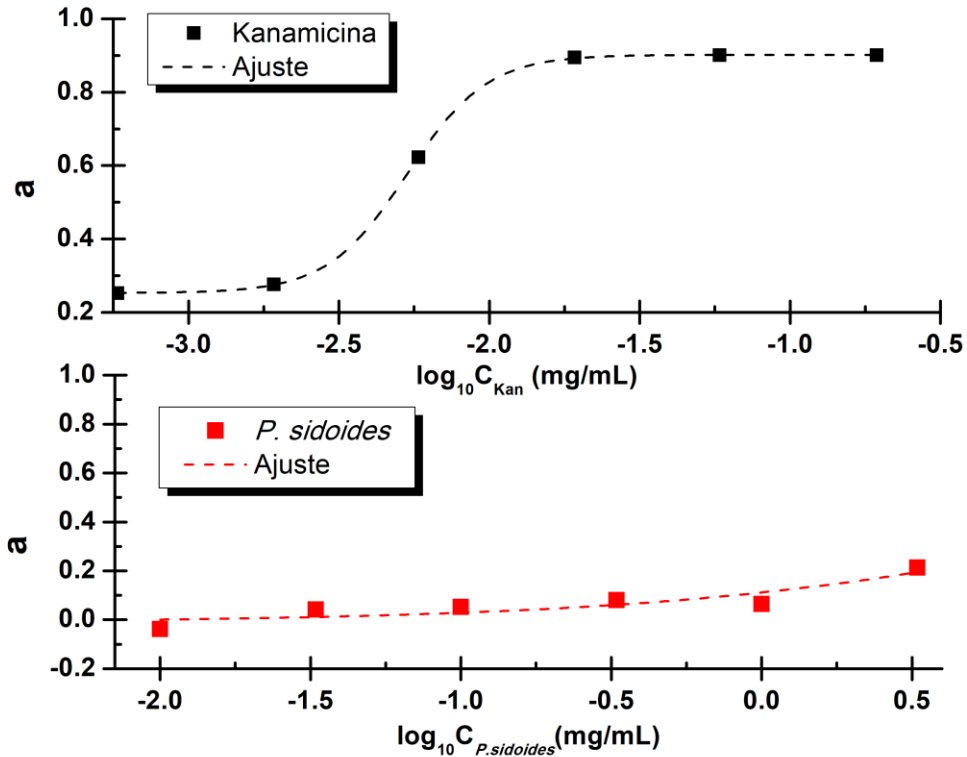


Figura 6-13. Resultados de los ensayos realizados en placas de 96 pozos con kanamicina (negro) y extracto de *P. sidoides* (rojo) contra células de *E. coli*. Los resultados experimentales se ajustaron a un modelo no lineal que permitió determinar el valor de IC₅₀ de cada muestra problema. Se observa que *P. sidoides* presenta una menor eficiencia para la inhibición del crecimiento de celular.

Ensayos con *P. sidoides* en microgotas

Para el ensayo se realizó la encapsulación en microgotas de las bacterias, la Rz y el extracto de *P. sidoides*. El extracto se agregó disuelto en el amortiguador de trabajo a una concentración 3.0 mg/mL, el cual diluyo 3 veces en las microgotas. Los resultados obtenidos para cada conjunto de microgotas (sin incubación y con 130 min a 37 °C) se presentan en la figura 6-14 A. En esta figura se observa una separación de alrededor de 17 unidades entre las distribuciones obtenidas que se asocia a la actividad metabólica de las bacterias en presencia del extracto de *P. sidoides*. En la figura 6-14 B, la línea negra representa la actividad metabólica sin presencia de antibiótico y la línea azul, representa la actividad metabólica de las bacterias en microgotas con 1 mg/mL del extracto de *P. sidoides* disuelto. A diferencia de los ensayos realizados con Kanamicina (línea roja), el extracto de *P. sidoides* mostró una inhibición de la actividad metabólica de las bacterias muy pequeña, solo 3 unidades de fluorescencia por debajo del delta sin antibióticos.

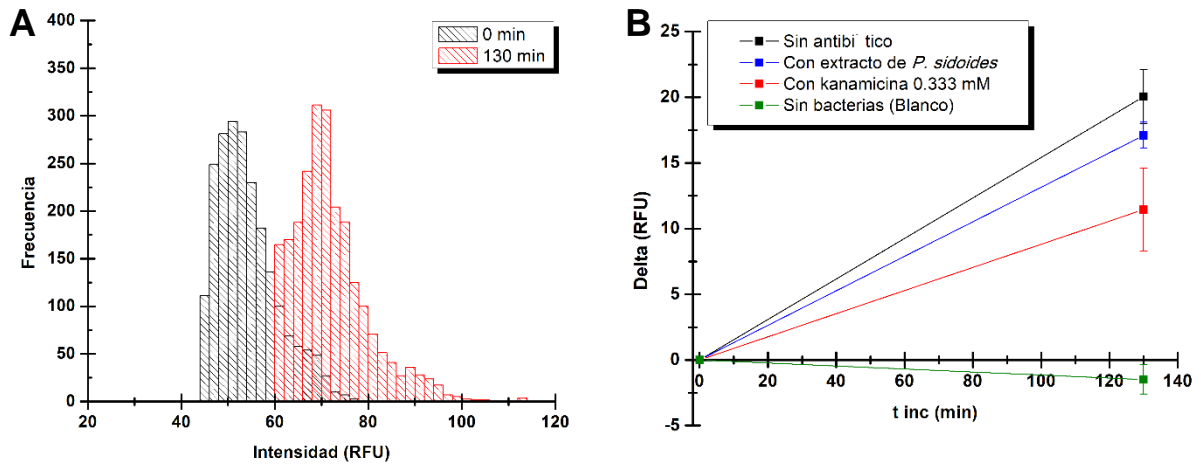


Figura 6-14. (A) Distribución de intensidad de fluorescencia de microgotas sin incubación y con incubación de 130 min a 37 °C en presencia de un extracto acuoso de *P. sidoides*. (B) Actividad metabólica de células de *E. coli* para los diferentes ensayos realizados: En negro, se muestran los ensayos sin antibiótico; en azul, se muestran los ensayos utilizando el extracto acuoso de *P. sidoides*; en rojo, los ensayos con 333 μ M de kanamicina y en verde los ensayos sin bacterias. Las barras de error corresponden a tres experimentos independientes.

De manera general, los resultados obtenidos en microgotas concuerdan con los obtenidos en placas de pozos, es decir, mediante los ensayos en pozos se observó que la kanamicina es un mejor inhibidor que el extracto crudo de *P. sidoides* y dicho resultado se repitió haciendo uso de la plataforma de microfluídica. De tal forma, el conjunto de los resultados presentados comprueban el funcionamiento de la plataforma de microfluídica desarrollada en este trabajo. La cual permite identificar el efecto de un agente antibiótico sobre el metabolismo bacteriano y permite comparar la capacidad que tiene cada uno para hacerlo.

6.5 Comparación de resultados en microfluídica

En la tabla 6-2 se hace una comparación de los resultados obtenidos en este trabajo contra algunos arreglos experimentales de microfluídica reportados en la literatura por grupos internacionales utilizando Rz como marcador de la actividad metabólica de bacterias.

Tabla 6-2. Tabla comparativa de los resultados obtenidos en este trabajo contra reportes en la literatura por grupos con líneas similares de investigación. En todos los casos que se presentan se realizaron ensayos de celulares en dispositivos de microfluídica haciendo uso de Rz como marcador de la actividad metabólica de las bacterias.

Ref.	V de ensayo	t de incubación	Técnica de medición	Tipo de bacteria	Compuestos probados
Este trabajo	380 pL Microgotas	2 h	Análisis de imágenes	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kanamicina Extracto acuso de <i>P. sidoides</i>
(55)	18 nL Microgotas	3 h	LIF	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ampicilina Tetraciclina Cloranfenicol
(54)	20 pL Microgotas	1 h	LIF	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>E. coli</i> ATCC BAA 2471	Gentamicina
(67)	100 µL Compartimientos	1 h	Electroquímica	GFP <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> ATCC 700928 <i>K. pneumoniae</i>	Ampicilina Ciprofloxacino
(68)	1 µL Compartimientos	2-10 h	Análisis de imágenes	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>C. freudii</i> <i>K. pneumanie</i> <i>A. buaumannii</i>	Ampicilina Ciprofloxacino Colistina Eritromicina Gentamicina

En los primeros tres ejemplos de la tabla 6-2 se muestra información para ensayos realizados en microgotas, en estos se puede observar una dependencia directa del tiempo de incubación respecto al volumen de la microgota: a menor volumen menor tiempo de incubación. En nuestro trabajo, con microgotas de 380 pL, se logró obtener una diferencia detectable de fluorescencia en tan solo 2 h de incubación, un tiempo mucho menor que los ensayos de microdilución en placas (16-24 horas) y comparable con otros ensayos en microgotas tal como se muestra en la tabla 6-2. Cuando se hace uso de microcompartimientos en dispositivos de microfluídica, como es el caso de Besant y colaboradores⁶⁷ y el grupo de Avesar⁶⁸ citados en la tabla 6-2, se utilizan volúmenes de

reactivos que están en el orden de los microlitros, volumen comparable con el uso de placas de 1536 pozos. Sin embargo, realizar los ensayos en dispositivos de microfluídica provee de una mejor automatización sin la necesidad de sofisticados equipos robotizados, debido a que esta técnica es compatible con una gran variedad de técnicas de análisis, contrario a la microdilución que comúnmente utiliza técnicas ópticas. Con respecto al uso de micro-compartimientos contra microgotas, el volumen del ensayo nuevamente es la principal ventaja de las microgotas y, aunque no se muestra, la cantidad de ensayos que se pueden llevar a cabo con microgotas es mucho mayor (2500 gotas por ensayo mediante análisis de imágenes y hasta 10^5 microgotas haciendo uso de LIF ⁵⁴) que con el uso de micro-compartimientos (200 aproximadamente ⁶⁸). Otra ventaja de nuestro trabajo es que no existen en la literatura trabajos de microfluídica que puedan analizar mezclas de compuestos sin purificar. Además, el potencial acoplamiento de nuestro arreglo experimental con una columna cromatográfica nos permitirá no solo muestrear extractos naturales y comparar su poder bactericida, sino que también nos permitirá llevar a cabo la separación del extracto y de manera automatizada, introducir cada pico cromatográfico en las microgotas junto con bacterias y el marcador de viabilidad celular de manera ordenada, logrando así la identificación de los componentes individuales en un extracto natural con actividad bactericida ³⁶.

6.6 Resultados adicionales

Una de las perspectivas más importantes de este proyecto es analizar una gran cantidad de compuestos diferentes en un mismo ensayo. Por ejemplo, si se acopla la salida de una columna cromatográfica al dispositivo de formación de microgotas, será posible encapsular los componentes de cada pico en microgotas juntos con los componentes del ensayo celular, justo como se realizó en nuestro trabajo reportado en 2017 para ensayos enzimáticos ³⁶. En primera instancia, ya se demostró que la incubación de microgotas en la tubería utilizada conserva cierto orden de formación (figura 6-4 C). Por lo tanto, podemos asegurar que la plataforma es capaz de encapsular un tren de picos cromatográficos junto con los componentes del ensayo, conservando el orden de elución durante todo el tiempo

de incubación hasta su irradiación y análisis. Esto permitiría por ejemplo, evaluar la actividad de cada pico cromatográfico de un extracto natural sobre la actividad metabólica bacteriana de manera rápida y continua, e identificar cual o cuales son los componentes dentro de un extracto con actividad bactericida y merezcan un paso de purificación y caracterización mediante técnicas analíticas.

Sin embargo, para que lo mencionado funcione correctamente es necesario comprobar que la cantidad de bacterias introducidas en las gotas durante periodos prolongados de formación sea constante. En los resultados presentados en las secciones anteriores, se mostraron solo los datos recabados para las microgotas formadas durante los primeros minutos y que son las primeras gotas en salir de la columna de incubación (Figura 6-15). Pero, ¿qué pasa con las microgotas que se formaron 30 ó 60 minutos después y que se encuentran en el centro o en la parte más alta del capilar de incubación cuando se analizan las primeras gotas?. Las gotas que se encuentran en la parte central se formaron en promedio 30 minutos después que las primeras y por ende, las últimas 1 hora después. Es importante aclarar que esto no cambia el tiempo total de incubación para ninguna gota al momento de ser detectadas ya que todas las microgotas que entran por la parte superior del capilar tardaran 130 min en recorrerlo y llegar a la zona de análisis. El parámetro que cambia es el tiempo que pasa entre la formación de la microgota y el momento en que el capilar de incubación se conecta al microchip de formación de microgotas, según se ilustra en la figura 6-15.

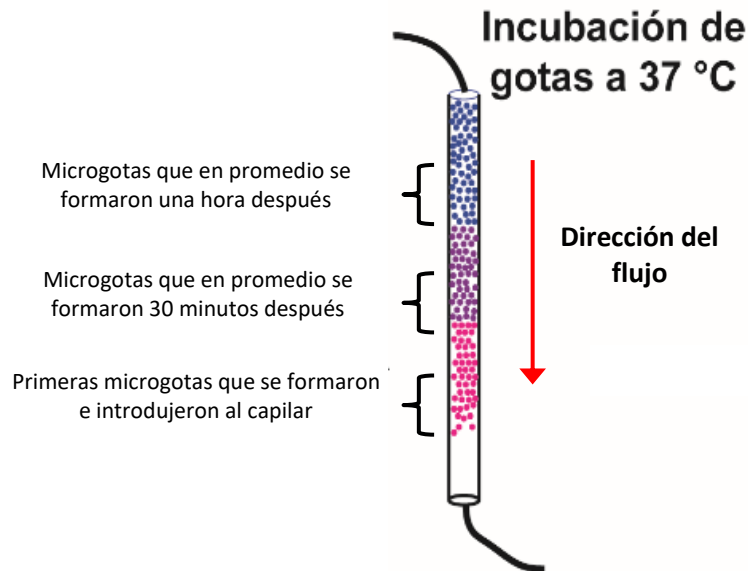


Figura 6-15. Esquema de la diferencia que tienen las microgotas con respecto al tiempo en que se formaron. Recordar que microgotas a la misma altura del capilar tienen el mismo tiempo de incubación, lo que cambia es el tiempo en que se formaron una vez que se inicia el ensayo. Los cambios en las tonalidades esquematizan la transformación de R_z en R_f debido al metabolismo bacteriano.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para microgotas que se formaron 30 min después y para aquellas que se formaron una hora después. Para cada uno de los ensayos cuyos resultados se muestran en la figura 6-16, se observa un desplazamiento hacia valores de menor intensidad conforme aumenta el tiempo de formación de microgotas. Creemos que este comportamiento se debe a variaciones en la suspensión de bacterias en la jeringa de inyección, ya que como no está en constante agitación, las bacterias comienzan a asentarse, aglomerarse y depositarse en la superficie baja de la jeringa. De tal forma, una vez que inicia el ensayo, el número de unidades formadoras de colonia (UFC) que se introduce en el microchip disminuye conforme pasa el tiempo, ya pesar de que el flujo al que se introducen es constante, el número de bacterias suspendidas en la jeringa es menor a través del tiempo.

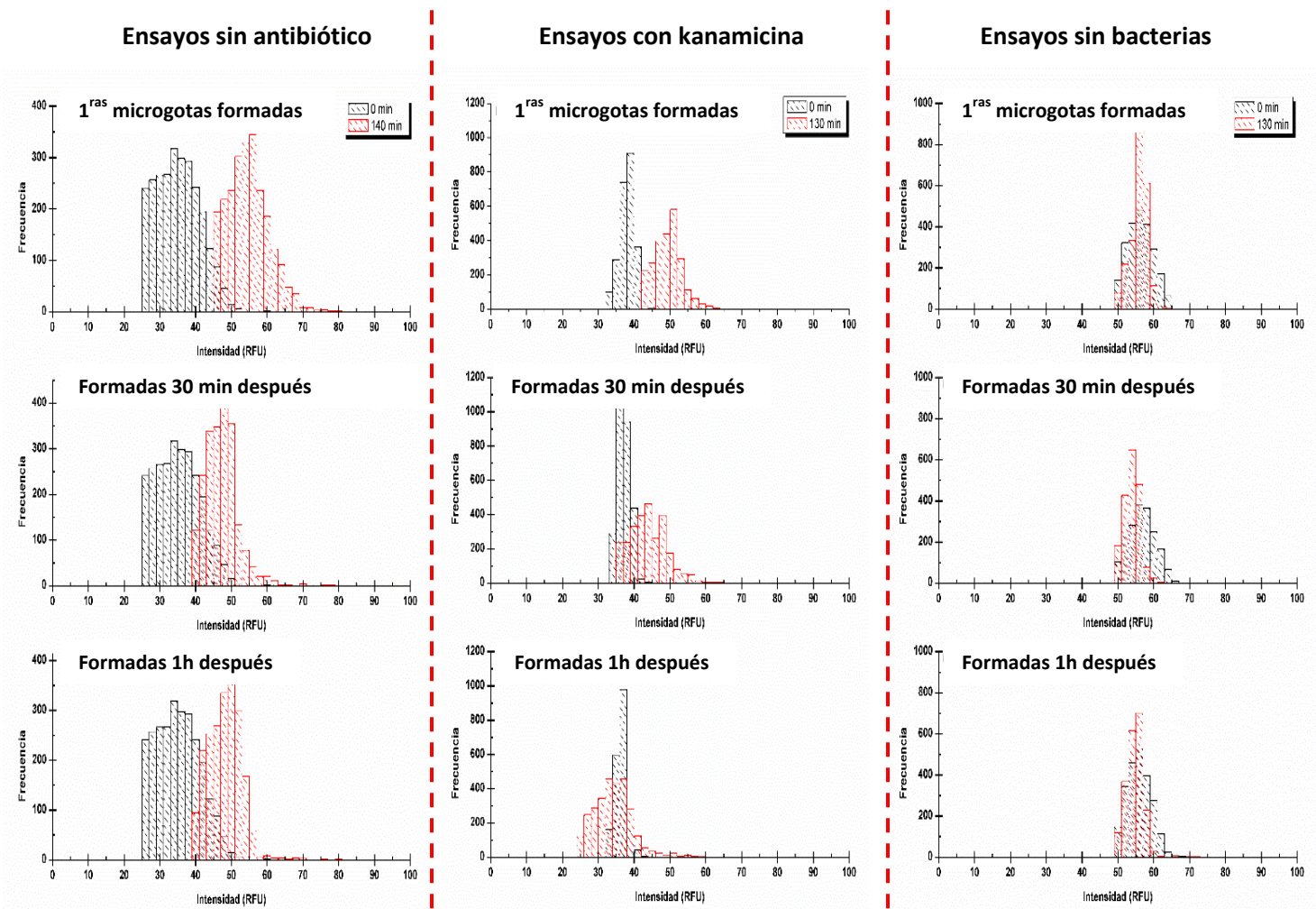


Figura 6-16. Histogramas para ensayos sin antibiótico, con kanamicina y sin bacterias. En el primer renglón de histogramas se presenta la intensidad de las primeras microgotas formadas. En el segundo renglón, la intensidad de aquellas microgotas que en promedio se formaron 30 minutos después. En el último renglón se muestra la intensidad de microgotas que se formaron 1 hora después que las primeras mencionadas.

Así, al inicio del ensayo sin antibióticos la cantidad de bacterias que entran al microchip es alta, y por lo tanto, a cantidad de Rz que se transforma en Rf también es alta y muestra un delta de fluorescencia de alrededor de 20 unidades. Sin embargo, en las microgotas que se forman 30 minutos después, donde la cantidad inicial en la microgotas de UFC es menor, se observa un aumento menor de la fluorescencia, de alrededor de 10 unidades. Mismo es el caso para las microgotas que se formaron una hora después que las primeras, pero la disminución en la intensidad de fluorescencia no es tan drástico como en los primeros 30 min. Podemos suponer que la velocidad a la que se asientan las células es

mayor al inicio, pero cuando la mayoría se asienta se establece un equilibrio después de los primeros 30 min.

Para el ensayo con antibiótico, la disminución en el número inicial de UFC en las microgotas mostró diferencias de fluorescencia más drásticas. En las primeras microgotas, las bacterias logran transformar suficiente Rz en Rf para generar un delta de 10 RFU. Sin embargo, 30 min después, la cantidad de bacterias presente en cada gota es menor que al inicio del experimento debido al asentamiento de las células en la parte inferior de la jeringa. Por esta razón, el número de bacterias presentes en la microgota ya no logran transformar tanta Rz como las anteriores, y además, la relación de kanamicina por bacteria es mayor, e inhibe de manera más eficiente su metabolismo. Entonces, para las últimas microgotas que se forman, la concentración inicial de UFC con respecto a la concentración de kanamicina es tan baja que las bacterias presentes ya no pueden metabolizar Rz antes de que la kanamicina actúe sobre ellas, obteniéndose entonces dos distribuciones encimadas (Figura 6-16).

En el caso de los ensayos sin bacterias, este fenómeno de asentamiento de bacterias no existe, por lo tanto, aunque sea muy prolongado el tiempo de formación de microgotas siempre se obtendrán distribuciones encimadas para microgotas con y sin incubación. En este caso, las variaciones solo se pueden atribuir a los cambios aleatorios que generan las bombas en los flujos de introducción de las disoluciones.

Los resultados de la Figura 6-16 muestran que la plataforma desarrollada necesita optimizaciones para que sea capaz de muestrear una serie de compuestos diferentes contra el metabolismo bacteriano de manera continua y en un mismo ensayo. Para solucionar el problema aquí descrito, se recomienda el uso de bombas basadas en presión de aire, las cuales funcionan mediante cambios de presión en el recipiente que contiene la disolución a inyectar. Además este tipo de bombas permitirá llevar a cabo una agitación constante de la suspensión de bacterias, de tal forma, siempre se introduciría la misma cantidad de bacterias a las microgotas durante todo el experimento. Otra alternativa es el uso de aditivos, tal como glicerol, en la suspensión inicial de bacterias. Estos pueden

modificar la densidad del medio y disminuir la velocidad a la que se asientan las bacterias generando que la cantidad inicial de UFC en microgotas permanezca constante durante un tiempo más prolongado.

7 Resumen de resultados

- Con una geometría de enfoque de flujo de canales para la formación de microgotas (canal de fase acuosa: 43 μm de ancho y 52 μm de alto; Canal de aceite: 63 μm de ancho y 61 μm de alto) se logró conseguir gotas de 380 pL y que permitieron identificar un cambio apreciable de intensidad de fluorescencia en tan solo 130 min de incubación, resultado muy competitivo con reportes anteriores en la literatura. Si se quisiera aumentar el delta de fluorescencia o disminuir el tiempo de incubación, se deben de formar microgotas de menor tamaño. Esto se puede lograr modificando las dimensiones de los canales o las proporciones en los flujos de formación. Sin embargo, la disminución en el tamaño de los canales puede representar un reto experimental y cambios en la plataforma propuesta.
- El paso de las microgotas a través de una tubería larga entre el microchip de formación y el de análisis al flujo utilizado permite incubar las microgotas junto con las bacterias, el marcador de viabilidad celular y el o los compuestos muestra durante 130 min conservando el orden de formación. Este resultado abre las puertas a distintas aplicaciones para esta plataforma, entre ellas la prueba de diferentes compuestos de manera continua en un arreglo de tren.
- La plataforma desarrollada permite realizar el muestreo de 2500 microgotas que se registran en un video de 10 minutos, equivalente a realizar 2500 repeticiones de un ensayo en 10 minutos.
- Se logró determinar la actividad metabólica de células de *E. coli* en microgotas haciendo uso de esta plataforma en presencia y en ausencia de agentes bactericidas, logrando observar una diferencia de 10 RFU entre estos. Así mismo, la plataforma desarrollada permite diferenciar entre la capacidad bactericida de dos compuestos o disoluciones diferentes. De igual forma, se comprobó que en las microgotas son las bacterias las que llevan a cabo la transformación de Rz en Rf y no algún otro compuesto químico presente en la microgota.

- El extracto acuoso de *P. sidoides* presenta propiedades bactericidas bajas en comparación con la kanamicina, la cual inhibió en un 50 % la actividad metabólica de células de *E. coli* bajo las condiciones empleadas en tan solo 130 min de incubación.

8 Conclusión

Se desarrolló una plataforma de microfluídica basada en microgotas para la identificación de agentes bactericidas en disolución acuosa de manera rápida, continua y económica. La fabricación de la plataforma representa gastos diminutos, ya que sin tomar en cuenta el gasto de inversión en el arreglo óptico, la fabricación de los microchips de formación y de análisis, la tubería de incubación y el sistema de calentamiento no supera los 150 pesos mexicanos. Este sistema cuenta con tres módulos de manipulación: el primero permite llevar a cabo la formación de microgotas en microchip de PDMS; el segundo se integra por un capilar para la incubación de las microgotas; y el tercero consiste en un canal sencillo para el análisis de microgotas por fluorescencia. Haciendo uso de este arreglo experimental se logró obtener una señal detectable en 130 min de incubación que corresponde a un tiempo competitivo contra algunos reportes de otros grupos de trabajo internacionales en líneas similares de investigación. Las perspectivas de la plataforma desarrollada representan un gran avance en las técnicas para la identificación de nuevos compuestos bactericidas en productos naturales complejos, ayudando a solucionar uno de los problemas planteados por la OMS en 2014 con respecto a la resistencia microbiana.

9 Perspectivas

Las aplicaciones de la plataforma de microfluídica basada en microgotas aquí desarrollada van más allá que la identificación de extractos naturales crudos en disolución con actividad bactericida. En primera instancia estos sistemas se pueden acoplar una columna cromatográfica e identificar que compuesto o grupo de compuestos (picos cromatográfico) en un extracto natural presentan actividad bactericida.

Si bien el acoplamiento de la columna puede resultar un reto experimental, se puede comenzar acoplando una válvula de seis vías, como las que se usa en el sistema de inyección en equipos HPLC. Ese arreglo permitiría inyectar diferentes compuestos con posible actividad bactericida uno detrás del otro en un mismo experimento. El sistema propuesto se podría automatizar para realizar ensayos masivos con bibliotecas grandes de compuestos previamente purificados.

Cabe mencionar, y como se mostró en la última sección del apartado de resultados, que para lograr lo antes mencionado se debe lograr la homogeneidad de las microgotas con respecto a la cantidad de bacterias encapsuladas por gota durante tiempos prolongados.

Por último, si en las jeringas de inyección donde se guardan las disoluciones que se introducen al microchip, se agregan disoluciones de bacterias junto con el antibiótico, sería posible observar la cinética de dicho antibiótico.

Modificaciones más sofisticadas a esta plataforma serían beneficiosas, tal como una incubación de la microgotas con bacterias y antibióticos, previa a la inyección de Rz. Sin embargo, esto implica un sistema de pico inyección en la microgotas⁶⁰. Tales sistemas ya han sido reportados y aunque parecen muy complejos, su desarrollo no pareciera imposible para las capacidades del laboratorio de trabajo.

10 Anexo 1.

10.1 Código de matlab para la determinación de intensidad de luz en microgotas mediante análisis de video.

```
1>>
2>> a=roipoly();
3>> b=roipoly();
4>> c=roipoly();
5>> d=roipoly();
6>>
7>>%%
8>>
9>> for cuadros=1:#cuadros de video
10>>     disp(cuadros)
11>>     tempImage=double("nombre del video"(:,:,1,cuadros));
12>>     a2=tempImage(a==1);
13>>     a3(cuadros)=mean(a2);
14>>
15>>     b2=tempImage(b==1);
16>>     b3(cuadros)=mean(b2);
17>>
18>>     c2=tempImage(c==1);
19>>     c3(cuadros)=mean(c2);
20>>
21>>     d2=tempImage(d==1);
22>>     d3(cuadros)=mean(d2);

end

%%
figure_1=figure
plot(a3,'r')
hold
plot(b3,'g')
plot(c3,'k')
plot(d3,'m')
Figure_2=figure
subplot(221)
plot(a3)
C_b=b3;
C_c=c3;
C_d=d3;
subplot(222)
plot(b3)
subplot(223)
plot(c3)
subplot(224)
plot(d3)
```

11 Referencias

- (1) WHO. Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. *Bull. World Health Organ.* **2014**, 61 (3), 383–394.
- (2) World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014. *World Heal. Organ.* **2014**, 1–257.
- (3) Chambers, H. F.; Deleo, F. R. NIH Public Access. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 7 (9), 629–641.
- (4) Deleo, F. R.; Deleo, F. R.; Chambers, H. F.; Chambers, H. F. Reemergence of Antibiotic-Resistant. *J. Clin. Invest.* **2009**, 119 (9), 2464–2474.
- (5) Taubes, G. The Bacteria Fight Back. *Science (80)*. **2008**, 321 (5887), 356–361.
- (6) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, 48 (1), 1–12.
- (7) O 'neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations the Review on Antimicrobial Resistance. *Rev. Antimicrob. Resist. WHO* **2016**, 1 (May), 1–5.
- (8) Report, G.; Yewale, V. N. Antimicrobial Resistance. *Bull. World Health Organ.* **2014**, 61 (3), 171–172.
- (9) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79 (3), 629–661.
- (10) Whitesides, G. M. The Origins and the Future of Microfluidics. *Nature* **2006**, 442 (7101), 368–373.
- (11) Price, A. K.; Paegel, B. M. Discovery in Droplets. *Anal. Chem.* **2016**, 88 (1), 339–353.

- (12) Kaminski, T. S.; Scheler, O.; Garstecki, P. Droplet Microfluidics for Microbiology: Techniques, Applications and Challenges. *Lab Chip* **2016**, *16* (12), 2168–2187.
- (13) Berney, M.; Hammes, F.; Bosshard, F.; Weilenmann, H. U.; Egli, T. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (10), 3283–3290.
- (14) Breeuwer, P.; Abee, T. Assessment of Viability of Microorganisms Employing Fluorescence Techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *55* (1-3), 193–200.
- (15) Joux, F.; Lebaron, P. Use of Fluorescent Probes to Assess Physiological Functions of Bacteria at Single-Cell Level. *Microbes Infect.* **2000**, *2* (1), 1523–1535.
- (16) Molecular Probes, I. LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits. *LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bact. Viability Kits* **2004**, 1–8.
- (17) Mckinnon, K. M. Flow Cytometry : An Overview. *Curr. Protoc. Immunol.* **2018**, No. February, 1–11.
- (18) Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. Flow Cytometry: Basic Principles and Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *37* (2), 1–14.
- (19) Stockert, J. C.; Blázquez-castro, A.; Ca, M.; Horobin, R. W. Acta Histochemica MTT Assay for Cell Viability : Intracellular Localization of the Formazan Product Is in Lipid Droplets. *Acta Histochem.* **2012**, *114*, 785–796.
- (20) Fai, P. B.; Grant, A. A Rapid Resazurin Bioassay for Assessing the Toxicity of Fungicides. *Chemosphere* **2009**, *74* (9), 1165–1170.
- (21) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (17), 5421–5426.
- (22) Doneux, T.; Bouffier, L.; Goudeau, B.; Arbault, S. Coupling Electrochemistry with

- Fluorescence Confocal Microscopy to Investigate Electrochemical Reactivity: A Case Study with the Resazurin-Resorufin Fluorogenic Couple. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (12), 6292–6300.
- (23) Bueno, C.; Villegas, M. L.; Bertolotti, S. G.; Previtali, C. M.; Neumann, M. G.; Encinas, M. V. The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction¶. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76* (4), 385–390.
- (24) Porcal, G. V.; Previtali, C. M.; Bertolotti, S. G. Photophysics of the Phenoxazine Dyes Resazurin and Resorufin in Direct and Reverse Micelles. *Dye. Pigment.* **2009**, *80* (2), 206–211.
- (25) Flamigni, L.; Venuti, E.; Camaioni, N.; Barigelletti, F. A Spectroscopic Investigation of the Temperature and Solvent Sensitivities of Resorufin. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1989**, *85* (12), 1935–1943.
- (26) Alejo, C. J. B.; Fasciani, C.; Grenier, M.; Netto-Ferreira, J. C.; Scaiano, J. C. Reduction of Resazurin to Resorufin Catalyzed by Gold Nanoparticles: Dramatic Reaction Acceleration by Laser or LED Plasmon Excitation. *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1* (8), 1506.
- (27) Sanderson, M. J.; Smith, I.; Parker, I.; Bootman, M. D. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* **2016**, *2014* (10), 36.
- (28) Lichtman, J. W.; Conchello, J. A. Fluorescence Microscopy. *Nat. Methods* **2005**, *2* (12), 910–919.
- (29) Haubert, K.; Drier, T.; Beebe, D. PDMS Bonding by Means of a Portable, Low-Cost Corona System. *Lab Chip* **2006**, *6* (12), 1548.
- (30) Corning, D. Electronics Sylgard® 184 Silicone Elastomer. *Prod. Datasheet* **2013**, 1–3.
- (31) Martinez-Duarte, R.; Madou, M. SU-8 Photolithography and Its Impact on

Microfluidics. *Microfluid. Nanofluidics Handb.* **2011**, No. May 2014, 231–268.

- (32) Squires, T. M.; Quake, S. R. Microfluidics: Fluid Physics at the Nanoliter Scale. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77* (3), 977–1026.
- (33) Cai, L. F.; Zhu, Y.; Du, G. S.; Fang, Q. Droplet-Based Microfluidic Flow Injection System with Large-Scale Concentration Gradient by a Single Nanoliter-Scale Injection for Enzyme Inhibition Assay. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (1), 446–452.
- (34) Lee, C. C.; Sui, G.; Elizarov, A.; Shu, C. J.; Shin, Y. S.; Dooley, A. N.; Huang, J.; Daridon, A.; Wyatt, P.; Stout, D.; et al. Multistep Synthesis of a Radiolabeled Imaging Probe Using Integrated Microfluidics. *Science (80)*. **2005**, *310* (5755), 1793–1796.
- (35) Hess, D.; Rane, A.; Demello, A. J.; Stavrakis, S. High-Throughput, Quantitative Enzyme Kinetic Analysis in Microdroplets Using Stroboscopic Epifluorescence Imaging. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (9), 4965–4972.
- (36) Ochoa, A.; Álvarez-Bohórquez, E.; Castellero, E.; Olguin, L. F. Detection of Enzyme Inhibitors in Crude Natural Extracts Using Droplet-Based Microfluidics Coupled to HPLC. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (9), 4889–4896.
- (37) Shim, J. U.; Olguin, L. F.; Whyte, G.; Scott, D.; Babbie, A.; Abell, C.; Huck, W. T. S.; Hollfelder, F. Simultaneous Determination of Gene Expression and Enzymatic Activity in Individual Bacterial Cells in Microdroplet Compartments. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (42), 15251–15256.
- (38) Bo Zheng, Joshua D. Tice, L. Spencer Roach, and R. F. I. NIH Public Access. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43* (19), 2508–2511.
- (39) Xu J.H, LiS.W., Tan J., W. Y. J. L. G. S. Preparation of Highly Monodisperse Droplet in a T-Junction Microfluidic Device. *AIChE* **2006**, *52* (9), 3005–3010.
- (40) Garstecki, P.; Gitlin, I.; Diluzio, W.; Whitesides, G. M.; Kumacheva, E.; Stone, H. A. Formation of Monodisperse Bubbles in a Microfluidic Flow-Focusing Device. *Appl.*

Phys. Lett. **2004**, *85* (13), 2649–2651.

- (41) Zinchenko, A.; Devenish, S. R. A.; Kintses, B.; Colin, P. Y.; Fischlechner, M.; Hollfelder, F. One in a Million: Flow Cytometric Sorting of Single Cell-Lysate Assays in Monodisperse Picolitre Double Emulsion Droplets for Directed Evolution. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (5), 2526–2533.
- (42) Skhiri, Y.; Gruner, P.; Semin, B.; Brosseau, Q.; Pekin, D.; Mazutis, L.; Goust, V.; Kleinschmidt, F.; El Harrak, A.; Hutchison, J. B.; et al. Dynamics of Molecular Transport by Surfactants in Emulsions. *Soft Matter* **2012**, *8* (41), 10618–10627.
- (43) Dejournalte, C. J.; Kim, J.; Medlen, H.; Li, X.; Vincent, L. J.; Easley, C. J. Creating Biocompatible Oil-Water Interfaces without Synthesis: Direct Interactions between Primary Amines and Carboxylated Perfluorocarbon Surfactants. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (21), 10556–10564.
- (44) Baroud, C. N.; Gallaire, F.; Danga, R. Dynamics of Microfluidic Droplets. *Lab Chip* **2010**, *10* (16), 2032.
- (45) Hodges, S. R.; Jensen, O. E.; Rallison, J. M. The Motion of a Viscous Drop through a Cylindrical Tube. *J. Fluid Mech.* **2004**, *501* (501), 279–301.
- (46) Song, H.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. A Microfluidic System for Controlling Reaction Networks in Time. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (7), 768–772.
- (47) Dressler, O. J.; Maceiczky, R. M.; Chang, S. I.; Demello, A. J. Droplet-Based Microfluidics: Enabling Impact on Drug Discovery. *J. Biomol. Screen.* **2014**, *19* (4), 483–496.
- (48) Collins, D. J.; Neild, A.; deMello, A.; Liu, A.-Q.; Ai, Y. The Poisson Distribution and beyond: Methods for Microfluidic Droplet Production and Single Cell Encapsulation. *Lab Chip* **2015**, *15* (17), 3439–3459.
- (49) Brouzes, E.; Medkova, M.; Savenelli, N.; Marran, D.; Twardowski, M.; Hutchison, J.

- B.; Rothberg, J. M.; Link, D. R.; Perrimon, N.; Samuels, M. L. Droplet Microfluidic Technology for Single-Cell High-Throughput Screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (34), 14195–14200.
- (50) Baret, J.-C.; Miller, O. J.; Taly, V.; Ryckelynck, M.; El-Harrak, A.; Frenz, L.; Rick, C.; Samuels, M. L.; Hutchison, J. B.; Agresti, J. J.; et al. Fluorescence-Activated Droplet Sorting (FADS): Efficient Microfluidic Cell Sorting Based on Enzymatic Activity. *Lab Chip* **2009**, *9* (13), 1850.
- (51) Beneyton, T.; Wijaya, I. P. M.; Postros, P.; Najah, M.; Leblond, P.; Couvent, A.; Mayot, E.; Griffiths, A. D.; Drevelle, A. High-Throughput Screening of Filamentous Fungi Using Nanoliter-Range Droplet-Based Microfluidics. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (May), 1–10.
- (52) Boitard, L.; Cottinet, D.; Bremond, N.; Baudry, J.; Bibette, J. Growing Microbes in Millifluidic Droplets. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15* (3), 318–326.
- (53) Schmitz, C. H. J.; Rowat, A. C.; Köster, S.; Weitz, D. A. Dropspots: A Picoliter Array in a Microfluidic Device. *Lab Chip* **2009**, *9* (1), 44–49.
- (54) Kaushik, A. M.; Hsieh, K.; Chen, L.; Shin, D. J.; Liao, J. C.; Wang, T. H. Accelerating Bacterial Growth Detection and Antimicrobial Susceptibility Assessment in Integrated Picoliter Droplet Platform. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *97* (June), 260–266.
- (55) Churski, K.; Kaminski, T. S.; Jakiela, S.; Kamysz, W.; Baranska-Rybak, W.; Weibel, D. B.; Garstecki, P. Rapid Screening of Antibiotic Toxicity in an Automated Microdroplet System. *Lab Chip* **2012**, *12* (9), 1629.
- (56) Scanlon, T. C.; Dostal, S. M.; Griswold, K. E. A High-Throughput Screen for Antibiotic Drug Discovery. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111* (2), 232–243.
- (57) Liu, X.; Painter, R. E.; Enesa, K.; Holmes, D.; Whyte, G.; Garlisi, C. G.; Monsma, F. J.; Rehak, M.; Craig, F. F.; Smith, C. A. High-Throughput Screening of Antibiotic-

- Resistant Bacteria in Picodroplets. *Lab Chip* **2016**, *16* (9), 1636–1643.
- (58) McDonald, J. C.; Duffy, D. C.; Anderson, J. R.; Chiu, D. T.; Wu, H.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M. Fabrication of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* **2000**, *21* (1), 27–40.
- (59) Dai, J.; Kim, H. S.; Guzman, A. R.; Shim, W.-B.; Han, A. A Large-Scale on-Chip Droplet Incubation Chamber Enables Equal Microbial Culture Time. *RSC Adv.* **2016**, *6* (25), 20516–20519.
- (60) Lyu, F.; Pan, M.; Patil, S.; Wang, J.-H.; Matin, A. C.; Andrews, J. R.; Tang, S. K. Y. Phenotyping Antibiotic Resistance with Single-Cell Resolution for the Detection of Heteroresistance. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, *270* (May), 396–404.
- (61) Jr, E. P. Circles packed in a circle.
<http://demonstrations.wolfram.com/CirclesPackedInACircle/> (accessed Sep 24, 2018).
- (62) Pan, M.; Rosenfeld, L.; Kim, M.; Xu, M.; Lin, E.; Derda, R.; Tang, S. K. Y. Fluorinated Pickering Emulsions Impede Interfacial Transport and Form Rigid Interface for the Growth of Anchorage-Dependent Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (23), 21446–21453.
- (63) Scheler, O.; Kaminski, T. S.; Ruszczak, A.; Garstecki, P. Dodecylresorufin (C12R) Outperforms Resorufin in Microdroplet Bacterial Assays. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (18), 11318–11325.
- (64) Motulsky, H.; Christopoulos, A. *Fitting Models To Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression*, First; Oxford, 2004.
- (65) Moyo, M.; Van Staden, J. Medicinal Properties and Conservation of Pelargonium Sidoides DC. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *152* (2), 243–255.
- (66) Uslu, H.; Yörük, Ö.; Ayyıldız, A.; Aktan, B. Antibacterial Spectrum of Umckaloabo

(pelargonium Sidoides) on Upper Airway Infection Agents. *Eur. J. Gen. Med.* **2009**, *6* (4), 245–248.

- (67) Besant, J. D.; Sargent, E. H.; Kelley, S. O. Rapid Electrochemical Phenotypic Profiling of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Lab Chip* **2015**, *15* (13), 2799–2807.
- (68) Avesar, J.; Rosenfeld, D.; Truman-Rosentsvit, M.; Ben-Arye, T.; Geffen, Y.; Bercovici, M.; Levenberg, S. Rapid Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Nanoliter Arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (29), E5787–E5795.