



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EXTRACCIÓN EN LÍNEA DE METANOL DE MICROGOTAS PRODUCIDAS EN
UN DISPOSITIVO DE MICROFLUÍDICA ACOPLADO A UN EQUIPO DE HPLC
PARA FACILITAR LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS EN
EXTRACTOS NATURALES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
SARAH LAUREL FLEMING

TUTOR PRINCIPAL:
DR. LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS
[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. GEORGINA GARZA RAMOS
[Facultad de Medicina](#)

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. agosto, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Fleming Sarah Laurel

Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas

P r e s e n t e

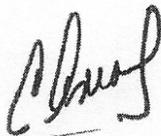
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de mayo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis “**Extracción en línea de metanol de microgotas producidas en un dispositivo de microfluídica acoplado a un equipo de HPLC para facilitar la búsqueda de inhibidores enzimáticos en extractos naturales**”, dirigida por el/la Dr(a). **Olguín Contreras Luis Fernando**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Bustos Jaimes Ismael
VOCAL	Navarro Ocaña Arturo
VOCAL	Cañizares Macías María del Pilar
VOCAL	Hautefeuille Mathieu Christian
SECRETARIO	Sosa Peinado Alejandro

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de mayo de 2019.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del Proyecto 284240 con el que se apoyó el trabajo experimental de esta tesis, y por el otorgamiento de la beca con el CVU 859866 durante mis estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM (PAIP 5000-9023) con el que se financió parte de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo para ir al congreso “Natural Products in Drug Discovery and Human Health, 2019.”

A mi asesor, el Dr. Luis Olguín, por su apoyo, consejo y paciencia durante el desarrollo del proyecto y la elaboración de este documento.

A mis compañeros del Laboratorio 326 por su apoyo y amistad.

DEDICATORIA

A mis abuelos.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-MU	4-metilumberiferona
4-MUNANA	ácido 2-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico
ACN	acetonitrilo
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CL	Cromatografía Líquida
DMC	dimetil carbonato
FC-40	Fluorinert® FC-40
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
MBTH	clorhidrato de la hidrazona del 3-metil-2-benzotiazolinona
PDMS	polidimetilsiloxano
PTFE	politetrafluoroetileno
RFU	Unidades relativas de fluorescencia
UPLC	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>

RESUMEN

El crecimiento global de resistencia bacteriana y viral contra los medicamentos es un gran problema para la población humana, y es un proceso muy largo y costoso buscar nuevos compuestos con actividad antibacteriana o antiviral. Los productos naturales representan una fuente rica e importante de nuevos compuestos con actividad biológica, pero su separación y posterior ensayo para identificar los más útiles entre miles de ellos requiere grandes esfuerzos económicos y de tiempo.

El desarrollo de sistemas microfluídicos es una alternativa a los métodos tradicionales en macroescala que permite la automatización y miniaturización del análisis de compuestos con recursos mínimos. Las reacciones en dispositivos de microfluídica requieren pequeñas cantidades de reactivos (en la escala de nano- a femtolitros), y se pueden integrar varias técnicas analíticas y procesos de separación y mezclado de compuestos en un solo dispositivo con materiales relativamente baratos.

El acoplamiento de un equipo de HPLC a un dispositivo microfluídico permite la separación rápida de compuestos y la detección de su actividad en una reacción analizada en un canal microfluídico de manera *en línea* sin la necesidad de tener una biblioteca de compuestos aislados y probar su actividad en reactores separados. El problema de realizar la separación y detección de la reacción en el mismo sistema es que los disolventes orgánicos usados comúnmente en el HPLC fase reversa (metanol o acetonitrilo) no siempre son compatibles con reacciones biológicas.

En este trabajo se propone un microchip el cual utilice aplicación de vacío para facilitar la evaporación rápida de metanol de microgotas en aceite fluorinado, reteniendo a los compuestos naturales en el agua, ya que la presión de vapor de metanol es más alta que la de agua y el PDMS es más afín al metanol que al agua.

Se estudiaron varias factores (temperatura, presión, flujo, composición de membrana, porcentaje de tensoactivos y porcentaje inicial de metanol) para la reducción del volumen de microgotas de metanol y agua en el aceite fluorinado FC-40, y se encontró que los factores más importantes son la temperatura, la presión y el flujo (que determina el tiempo de residencia dentro de un microcanal). Además, se encontró que se puede disminuir la cantidad de metanol en microgotas de metanol y agua, en un flujo continuo de aceite fluorinado FC-40, de 45.5 % a 30.9 % y de 21.2 % a 12.5 % MeOH con la aplicación de vacío junto con el calentamiento del microchip a 55 °C. Esta extracción de metanol facilitará el acoplamiento del HPLC a un ensayo de inhibición enzimática en microgotas con compuestos separados en la columna del HPLC.

CONTENIDO

1. Introducción.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Justificación.....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1. Microfluídica de gotas.....	5
2.2. PDMS.....	10
2.3. Cromatografía y microfluídica.....	12
2.4. Manipulación del contenido de las microgotas.....	18
2.5. Pervaporación.....	21
2.6. Fusión controlada de gotas.....	23
2.7. La fase continua.....	25
2.8. Neuraminidasas.....	26
2.9. Inhibición de las neuraminidasas.....	28
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivos.....	30
5. Metodología.....	31
5.1. Los dispositivos de microfluídica.....	31
5.2. Disminución de la cantidad de metanol.....	39
5.3. Fusión de gotas para la introducción de la enzima.....	44
5.4. HPLC.....	45
5.5. Ensayos enzimáticos.....	47
6. Resultados y Discusión.....	49
6.1. Caracterización de los microchips.....	49
6.2. Aplicación de vacío.....	50
6.3. Disminución de gotas con metanol y agua (microchip 1).....	51
6.4. Disminución de gotas con metanol y agua (microchip 2).....	56
6.5. Ensayo colorimétrico de metanol.....	65
6.6. Fusión de gotas para la introducción de la enzima (microchip 4).....	69
6.7. Ensayos en microgotas (microchip 3).....	75

6.8. Ensayos en microgotas (microchip 4).....	81
7. Conclusiones.....	83
8. Perspectivas.....	84
9. Anexo.....	86
9.1. Anexo 1.....	86
9.2. Anexo 2.....	87
10. Referencias.....	88

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la búsqueda de nuevos fármacos para combatir las infecciones bacterianas y virales es importante contar con métodos rápidos y económicos para el análisis de los candidatos potenciales. Una técnica atractiva es utilizar microgotas formadas en dispositivos de microfluídica, ya que en cada microgota se puede realizar una reacción única con pequeñas cantidades de reactivos que van del orden de los nano hasta los femtolitros.

Los extractos naturales representan una fuente importante de posibles candidatos para compuestos con actividad antiviral o antibacteriana, y la diversidad estructural de los compuestos presentes en extractos naturales es más amplia que la que se puede alcanzar en bibliotecas de compuestos sintéticos (Potterat y Hamburger, 2013). Entre los años 1981 y 2014, el 26% de los nuevos fármacos aprobados por la FDA provinieron directamente de fuentes naturales (Newman y Cragg, 2016). Sin embargo, la separación y caracterización de los compuestos presentes en extractos es normalmente un proceso largo y complejo, y representa un inconveniente para los métodos de escrutinio de alta eficiencia. Una solución a este problema es utilizar la cromatografía de líquidos ya que es un método eficaz para la separación inicial de los compuestos (Potterat y Hamburger, 2013).

En nuestro laboratorio usamos un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) acoplado a dispositivos de microfluídica para realizar ensayos de inhibición de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* con los compuestos provenientes de extractos naturales que se separan en una columna de HPLC fase reversa (Ochoa et al., 2017).

Sin embargo, el HPLC introduce nuevos problemas. El HPLC fase reversa utiliza un gradiente de disolventes polares y orgánicos, iniciando con porcentajes altos de agua y

terminando el gradiente con porcentajes altos de metanol o acetonitrilo para separar los compuestos de un extracto natural. Los picos que tienen mayor tiempo de retención en la columna del HPLC corresponden a los compuestos menos polares y contienen una mayor concentración de disolventes orgánicos. Estos disolventes presentan un problema para los ensayos de inhibición enzimática ya que las enzimas actúan normalmente en un ambiente acuoso.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El porcentaje de metanol en el eluato es un factor limitante para el acoplamiento de separaciones de extractos naturales por HPLC con los ensayos enzimáticos en microgotas. En este trabajo, se busca un método para eliminar, o disminuir a un nivel aceptable, la cantidad de disolventes orgánicos en gotas que provienen del HPLC para poder realizar ensayos enzimáticos con ellas. Esto permitiría probar la actividad inhibitoria de cada uno de los compuestos orgánicos presentes en los extractos de manera eficiente en un sistema en línea.

Varios estudios han demostrado la posibilidad de cambiar los porcentajes de disolventes dentro de las microgotas (He et al., 2004; Ji et al., 2013, Shim et al., 2011), pero en estos estudios se trabajó con compuestos polares dentro de las microgotas (péptidos por ejemplo). Según nuestros conocimientos, aún no existe un método para eliminar disolventes orgánicos en microgotas en flujo continuo y mantener los solutos orgánicos no polares dentro de ellas.

El polidimetilsiloxano (PDMS) es un material muy común para la construcción de dispositivos de microfluídica, y la permeabilidad del PDMS a moléculas pequeñas y gases ha sido estudiada y reportada. Shim et al. (2011) mostraron una manera de aumentar la concentración de etanol en microgotas usando dispositivos fabricados en PDMS con una reserva de etanol en una segunda capa de PDMS. Este estudio demostró la posibilidad del cambio de disolventes entre microgotas acuosas en una fase de aceite y una fuente de etanol mediante una membrana de PDMS, sin cambiar la cantidad de solutos contenidos en las microgotas. Se quiere aprovechar esa permeabilidad de PDMS para realizar el proceso opuesto y facilitar el movimiento de disolventes desde las microgotas hacia el PDMS.

Gnyawali et al. (2017) aprovecharon la permeabilidad de PDMS para disminuir el tamaño de microburbujas de aire. En ese estudio usaron un dispositivo de microfluídica de PDMS con canales de vacío adyacentes a canales de microburbujas en una fase

continua orgánica para demostrar la posibilidad de la extracción del aire desde las burbujas hacia los canales del vacío (Figura 1).

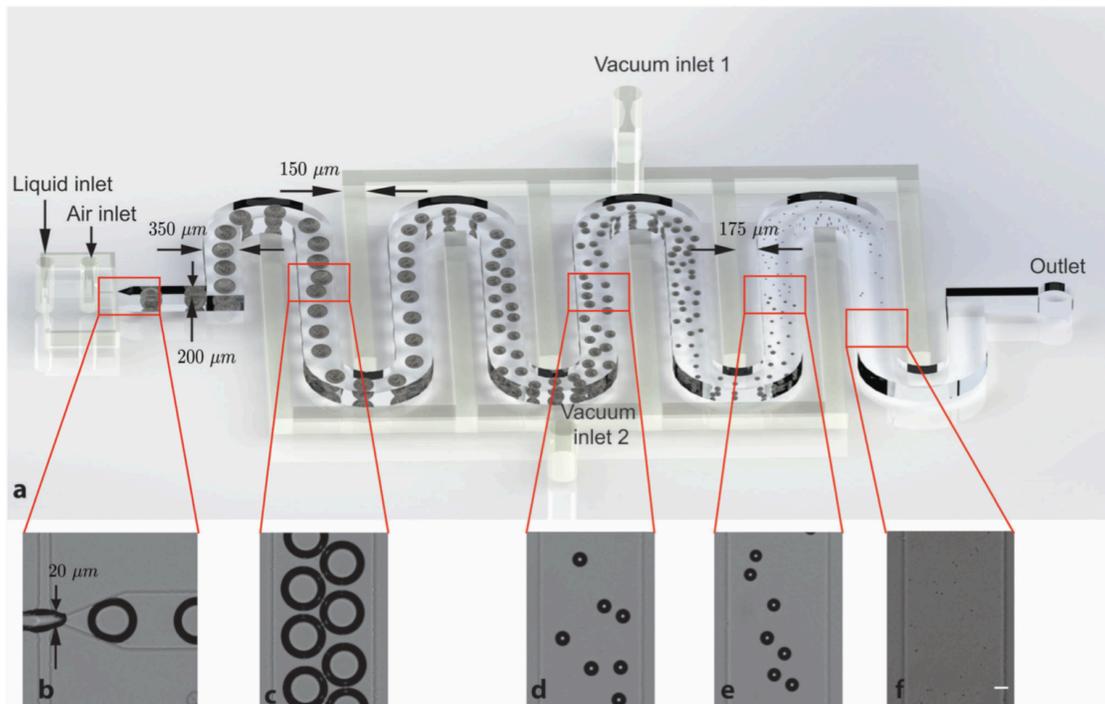


Figura 1. Diseño del microchip de Gnyawali et al. (2017) donde se muestra la disolución de burbujas de aire en un microcanal serpentinado hacia un canal adyacente con presión de vacío.

En este proyecto se propone modificar el diseño reportado por Gnyawali et al. (2017) para la extracción de metanol de microgotas en aceite para facilitar ensayos biológicos con compuestos que se eluyen del HPLC con una gran cantidad de metanol.

El método propuesto en este trabajo aumentará la eficiencia de la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica, específicamente la búsqueda de nuevos inhibidores de las neuraminidasas.

2. ANTECEDENTES

2.1 MICROFLUÍDICA DE GOTAS

Los métodos tradicionales para analizar grandes cantidades de compuestos tienen límites importantes en la eficiencia que pueden lograr. Las bibliotecas de compuestos en placas multipozos tienen un máximo de diversidad de 10^6 compuestos y requieren más de 10 litros de reactivos para realizar todos los ensayos. Además, las bibliotecas grandes en placas multipozos requieren tecnología robótica para procesarlas, la cual es muy compleja y costosa. Una alternativa son las gotas formadas en dispositivos de microfluídica, ya que los ensayos realizados en microgotas usan volúmenes de reactivos de los picolitros hasta los nanolitros, sin límite del número de compuestos que pueden ser analizados (Price y Paegel, 2016).

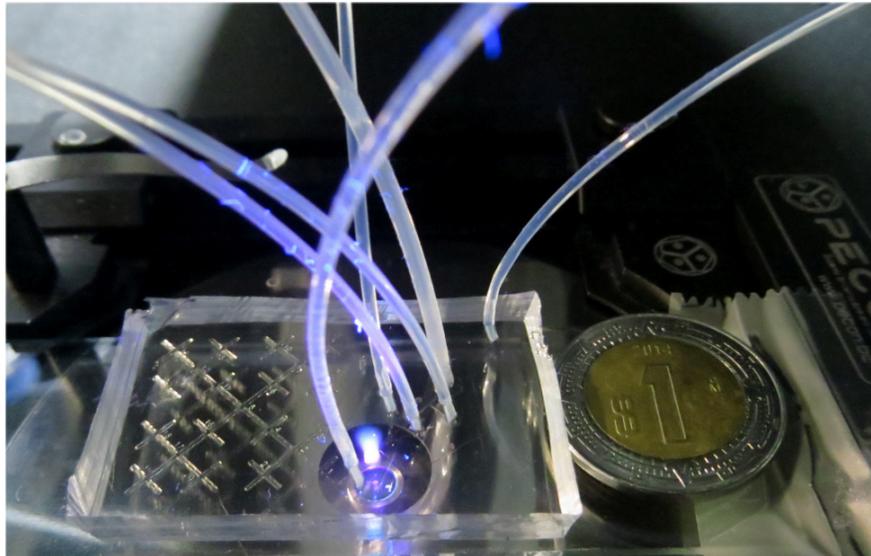


Figura 2. Microchip fabricado en PDMS con entradas perforadas para la inyección de soluciones de reactivos al microcanal. Foto: Abraham Ochoa

La formación de microgotas se realiza de manera activa o pasiva. Los métodos activos utilizan válvulas o campos eléctricos para formar las gotas, y en los métodos pasivos se utiliza presión continua de al menos dos líquidos inmiscibles y la geometría de los canales (Shembekar et al, 2016). De los métodos pasivos, las geometrías comunes son la unión en T y la unión *flow focusing*. En las uniones de *flow focusing*, la fase acuosa se corta en dos direcciones por la fase orgánica (Figura 3).

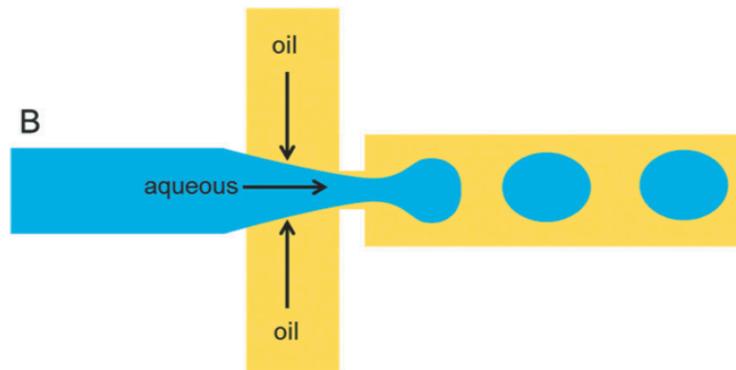


Figura 3. Geometría de uniones *flow focusing* para la formación de microgotas de agua en una fase continua de aceite en canales de microfluídica (Shembekar et al., 2016).

El tamaño de gotas formadas en una unión en T o *flow focusing* depende de la relación entre los flujos de las dos fases y también del flujo total. Con una relación mayor de flujo en la fase continua se forman gotas más pequeñas. Pero también cuando se aumenta el flujo total con una relación constante entre los fluidos inmiscibles, el tamaño promedio de las gotas disminuye y la homogeneidad de ellas aumenta. Con menor flujo total, el tamaño promedio de las gotas formadas aumenta y la homogeneidad disminuye (Basilio et al., 2019).

Las gotas confinadas tienen formas distintas a las gotas libres. Si el diámetro de la gota es más ancho que la pared la gota se deforma a una forma parecida a un elipsoide (Figura 4).

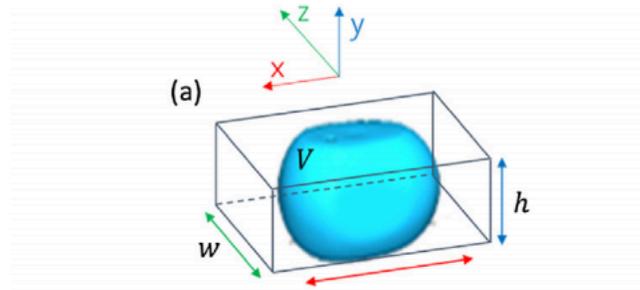


Figura 4. Geometría de una gota confinada en un microcanal (Santos et al., 2018)

Hay ciertas dificultades que presentan las microgotas de agua, las cuales son importantes de resolver. En las gotas no hay paredes impermeables como en las placas de pozos para guardar los reactivos dentro, porque la interfase agua-aceite de la microgota es permeable y permite la difusión de materia. Los reactivos polares son menos solubles en la fase orgánica y quedan adentro de las microgotas, pero moléculas pequeñas e hidrofóbicas pueden disolverse en la fase orgánica. La cantidad de moléculas que salen depende de su coeficiente de reparto entre el agua y el aceite, y de la presencia y concentración de tensoactivos en la fase continua así como el tiempo de residencia de las gotas dentro de los canales. Los tensoactivos voluminosos estabilizan la interfase entre el agua de las gotas y la fase continua, y pueden disminuir la cantidad de moléculas que salgan fuera de la gota. Sin embargo, altas concentraciones de tensoactivo libre en la fase continua puede provocar la formación de micelas reversas que pueden llevar solutos entre las gotas (Courtois et al., 2009). Mayores tiempos de residencia permiten más intercambio de material entre las gotas y la fase continua (aceite). Los aceites fluorinados en la fase continua disminuyen considerablemente el intercambio de moléculas pequeñas entre las dos fases por su baja miscibilidad con compuestos hidrogenados (Figura 5), aunque también son volátiles y dejan el paso de gases como oxígeno y dióxido de carbono (Gruner et al., 2015)

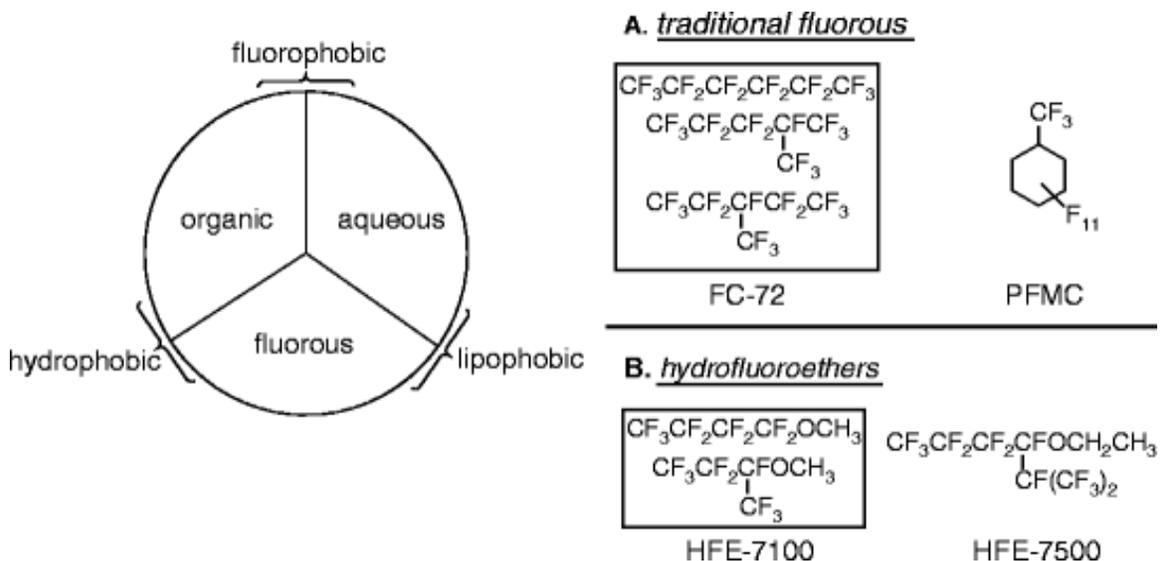


Figura 5. Ejemplos de aceites fluorinados. Los compuestos fluorinados son hidrofóbicos y lipofóbicos (Gladysz y Jurisch, 2011).

Una ventaja de hacer ensayos químicos o biológicos dentro de las microgotas contra flujo continuo en un microcanal es que en microgotas los reactivos se mezclan rápidamente por el flujo convectivo y no hay dispersión de los reactivos a lo largo del microcanal (Song et al., 2003), (Figura 6A y 6B). Además, el uso de volúmenes de reacción muy pequeños concentra los productos de la reacción, lo que genera una señal relativa más alta, aumentando la sensibilidad del ensayo (Rhaman y Rebrov, 2014; T. Wu et al., 2012), (Figura 6C y 6D).

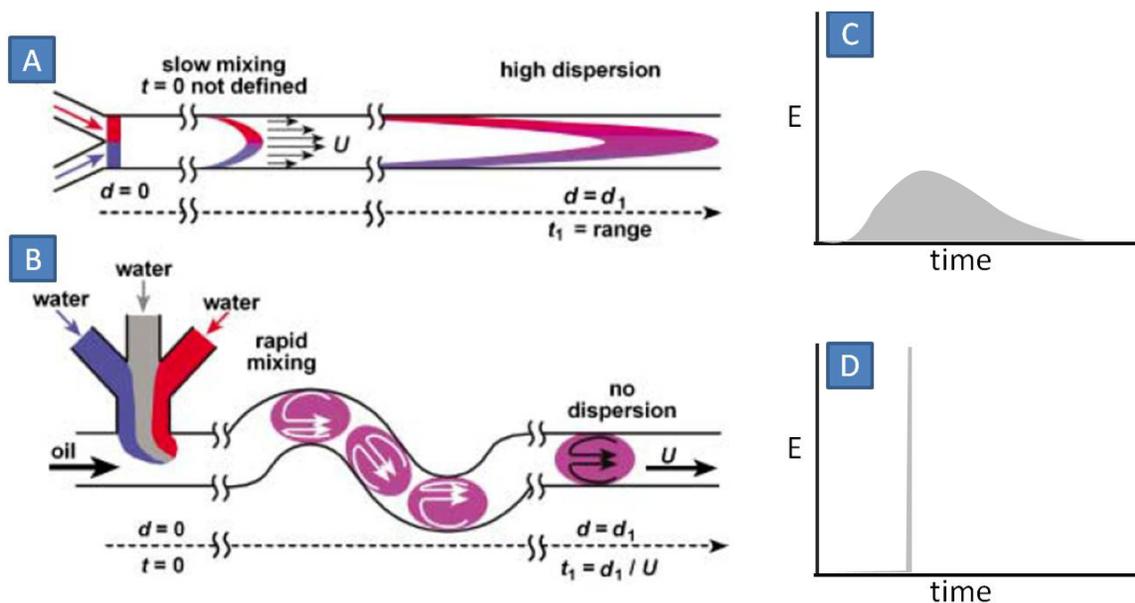


Figura 6. Esquema de la mezcla de reactivos en flujo laminar (A) y en microgotas (B). En flujo continuo la señal de la reacción se dispersa (C) y en microgotas los reactivos no se dispersan a lo largo del canal y la señal de la reacción es más intensa (D). Esquema modificado de Rhaman y Rebrov (2014) y T. Wu et al. (2012).

Otra ventaja de usar microgotas como microreactores es la posibilidad de hacer reacciones únicas en cada microgota, sin límite del número de reactores ya que se pueden generar de manera continua. Dentro de las gotas, los reactivos se mezclan rápidamente, y se ha demostrado la posibilidad de usar series de microgotas para determinar, por ejemplo, la cinética de Michaelis-Menten de muchas enzimas (Kaminski et al., 2017).

Una limitante significativa de los ensayos en microgotas es la dificultad de introducir reactivos diferentes en cada microgota. Se puede utilizar un muestreo automático de una biblioteca de compuestos contenidos en placas multipozos que vaya introduciendo de manera secuencial los compuestos (J. Wu et al., 2012), pero ese método tiene todas las mismas desventajas y limitaciones que los ensayos tradicionales que utilizan este tipo de placas. Una respuesta a este problema es el acoplamiento de métodos de separación de compuestos de interés directamente a los dispositivos de microfluídica para probar diferentes compuestos de manera continua.

2.2 PDMS

El polidimetilsiloxano (PDMS) es uno de los materiales más utilizados para la fabricación de los dispositivos de microfluídica. Es un elastómero poroso, transparente, no fluorescente, flexible, hidrofóbico, y permeable a gases y moléculas pequeñas.

Para fabricarlo se mezcla un compuesto pre-polímero líquido con un agente entrecruzante que promueve la formación de enlaces entre las moléculas y la creación de una matriz flexible. La fracción de volumen libre en esa matriz determina la permeabilidad de la membrana, y esta fracción depende de la concentración del agente entrecruzante y la temperatura utilizada en el paso de entrecruzado (Berean et al., 2014). Berean et al. encontraron que la temperatura óptima de este paso para la mayor permeabilidad final de la membrana es 75 °C.

El PDMS permite la difusión de vapores y ha sido utilizado en micro-extracciones para eliminar pequeñas cantidades de compuestos orgánicos de mezclas acuosas (Toepke y Beebe, 2006). A mayores temperaturas, las cadenas del polímero se mueven con mayor frecuencia y el PDMS muestra mayor permeabilidad (Mohammadi et al., 2005, Bakhshi et al., 2006).

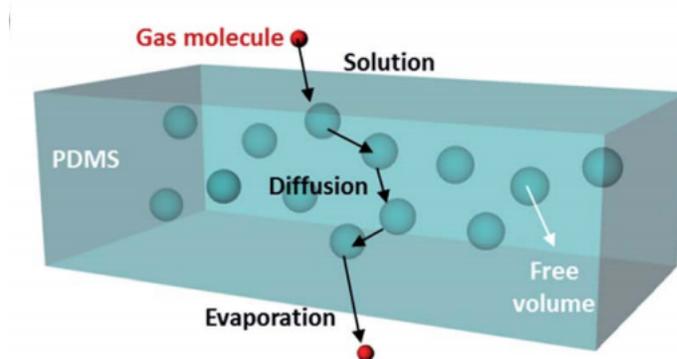


Figura 14. Esquema de la difusión y evaporación de moléculas a través de una membrana de PDMS (Lamberti et al., 2014).

Con el movimiento de las cadenas, se forman y desaparecen espacios libres que permiten la difusión de moléculas pequeñas (Figura 14), y se ha mostrado que con menos agente entrecruzante, la membrana de PDMS es más permeable por el aumento de la cantidad de espacios libres entre cadenas (Lamberti et al., 2014).

La presión también afecta la permeabilidad de PDMS, y el flujo de moléculas a través de la membrana es proporcional al gradiente de presión (Xu et al., 2015).

2.3 CROMATOGRAFÍA Y MICROFLUÍDICA

La cromatografía líquida (CL) es un método que puede servir para separar mezclas complejas de compuestos de productos naturales para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica, pero los métodos estándares requieren grandes cantidades de reactivos y mucho tiempo para la colección y análisis de las fracciones eluidas. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más utilizados para la separación de extractos naturales. El HPLC fase reversa utiliza una columna llena de resina no polar. Los compuestos polares forman asociaciones débiles con la resina, y los no polares se asocian con mayor afinidad con la resina. Los compuestos se eluyen de la columna con una mezcla de solventes polares y orgánicos en la fase móvil, y su tiempo de residencia en la columna depende en su relación de afinidad entre la columna y los solventes utilizados.

Utilizar CL acoplada a un método de detección de actividad biológica en línea elimina algunos pasos y es más eficiente. Un problema con esto es el flujo relativamente alto utilizado en un equipo HPLC (en la escala de mL/min) en comparación al flujo manejado en microfluídica ($\mu\text{L/h}$). Heus et al. diseñaron un método de acoplar nano-CL con un dispositivo de microfluídica con un sistema de detección de fluorescencia para encontrar ligandos afines al receptor de acetilcolina. El sistema trabajaba con flujos muy bajos y con pequeñas cantidades de reactivos (Heus et al 2010). En ese estudio, no se usaron microgotas sino flujo laminar dentro de los canales. La desventaja de eso es que la mezcla de los reactivos es lenta y la interacción de las fases líquidas con las paredes del canal provoca que la velocidad en el centro del canal sea mayor que la velocidad cerca de las paredes, ocasionando una dispersión de los reactivos y productos.

Theberge et al. usaron un equipo de *Ultra Pressure Liquid Chromotography* (UPLC) para separar mezclas de compuestos químicos que se fraccionaron en gotas dentro de microcanales. Los equipos UPLC utilizan columnas más pequeñas y flujos más bajos que los de HPLC tradicional. La cromatografía produce un gradiente de concentración del eluato que normalmente causa dificultades para la colección de un compuesto, pero en

microgotas se puede aprovechar esta propiedad para realizar curvas de respuestas dependientes de la dosis de diferentes compuestos para analizar no solo el efecto de un compuesto sino el efecto de su concentración (Theberge et al., 2010), (Figura 7).

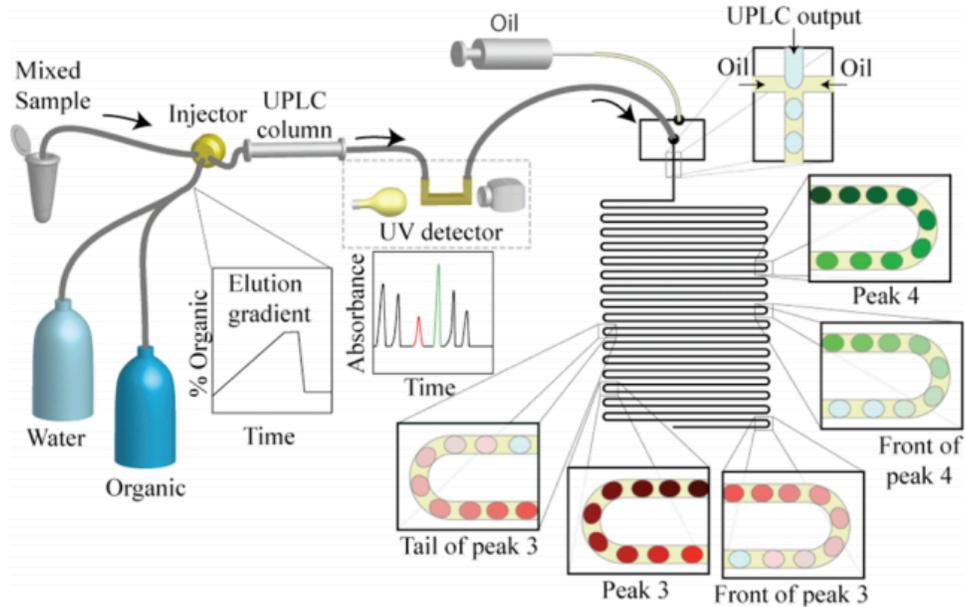


Figura 7. Esquema del acoplamiento del UPLC a un microchip realizado por Theberge et al. Los picos eluidos de la columna entran al microchip donde se forman gotas con un gradiente de concentración de los compuestos separados (Theberge et al., 2010).

Otra manera de acoplar la cromatografía con la microfluídica para el escrutinio de compuestos naturales es utilizar HPLC acoplado a un dispositivo de microfluídica que tenga un canal de purga para bajar el flujo del eluato al nivel a que pueda entrar en los micro-canales. Con este método, Ochoa et al. demostraron la posibilidad de hacer ensayos de inhibición enzimática en microgotas producidas en un dispositivo de microfluídica con compuestos que salieron de una columna de HPLC, y encontraron inhibidores de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* en la raíz de la planta *Pelargonium sidoides* (Ochoa et al., 2017) (Figura 8).

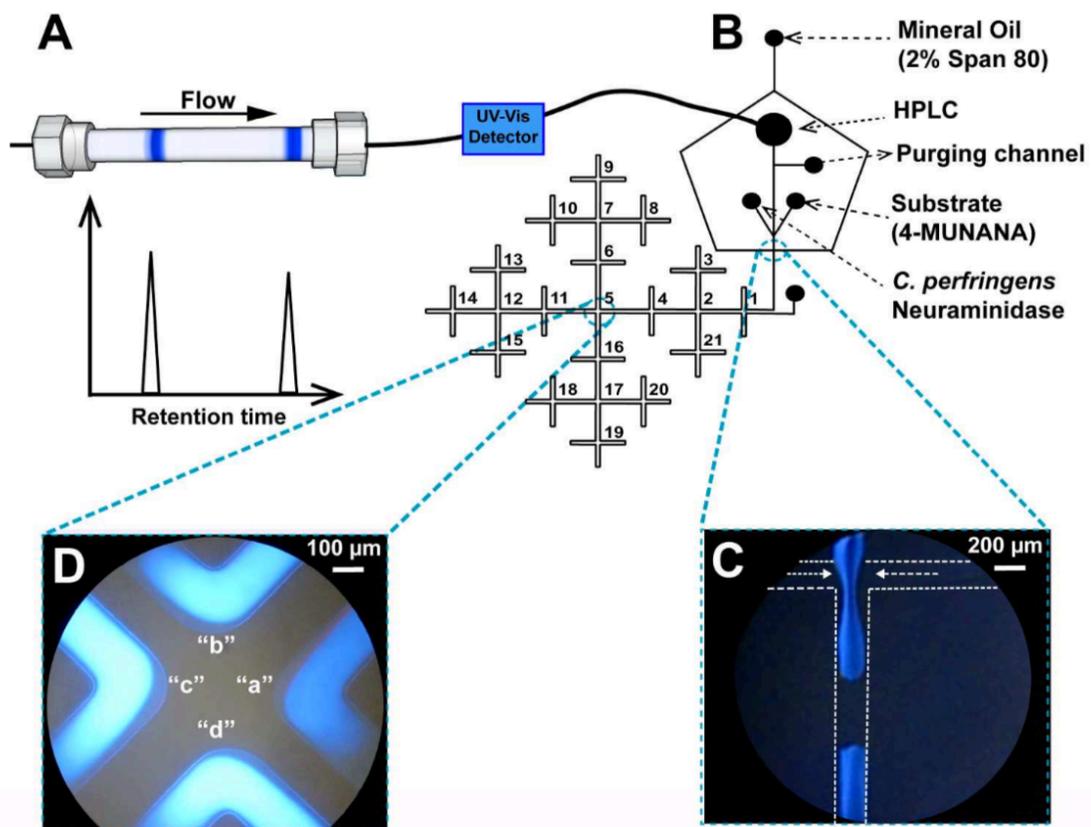


Figura 8. Sistema microfluídico para la detección de inhibidores enzimáticos de Ochoa et al. (2017). Se separa un extracto por HPLC (A) y el eluato entra al microchip (B). Se forman gotas conteniendo la enzima, su sustrato y el eluato en una unión *flow-focusing* con un flujo de aceite (C). El producto de la reacción es fluorescente y se detecta el aumento de intensidad de fluorescencia a lo largo del canal fractal (D).

En ese estudio se utilizó un flujo isocrático de 85% agua y 15% metanol en la columna del HPLC para separar los compuestos del extracto natural (Figura 9). Pero con este método, sólo se puede probar compuestos muy polares, los cuales salen de la columna del HPLC con una mezcla de disolventes con un gran porcentaje de agua. La razón de utilizar poco contenido de disolventes orgánicos es debido a que estos inhiben a las enzimas, y con una gran cantidad de disolventes orgánicos los ensayos enzimáticos no funcionarían. Además, altas concentraciones de metanol interrumpen la formación de gotas en los canales de PDMS por la alta afinidad entre metanol y el PDMS.

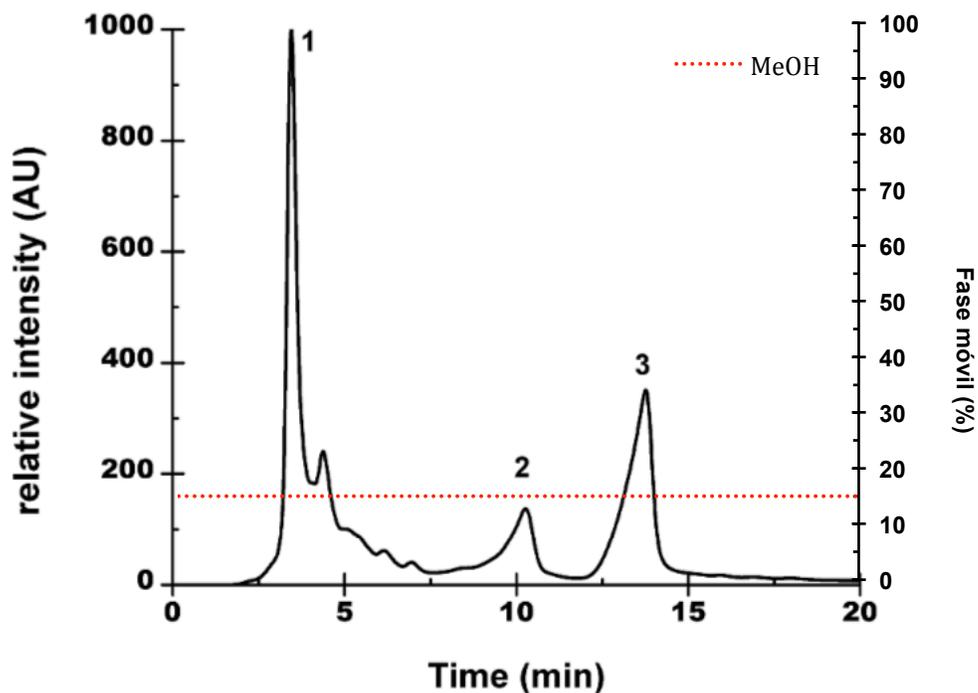


Figura 9. Cromatograma de un extracto de *P. sidoides* separado en el HPLC con un flujo isocrático de 15 % MeOH y 85 % H₂O. Figura modificada de Ochoa et al. (2017).

Los cambios de viscosidad de la mezcla de metanol y agua a diferentes proporciones provocan cambios en la presión y la velocidad del flujo total en el sistema que pueden influir negativamente en la formación homogénea de microgotas y en la detección de los productos de las reacciones en el sistema. La viscosidad de una mezcla de metanol y agua como función del porcentaje de agua se muestra en la Figura 10 (Thompson et al., 2006).

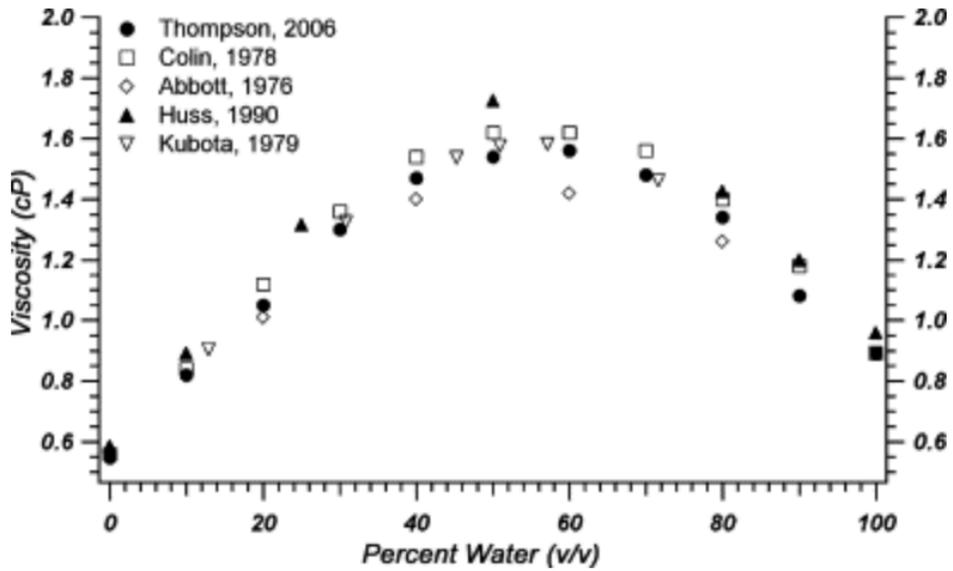


Figura 10. Viscosidad de la mezcla de agua y metanol como función del porcentaje de agua (Thompson et al, 2006).

En nuestro laboratorio se ha logrado separar varios extractos naturales en un equipo HPLC con gradientes de agua y metanol, pero no se ha podido analizar la actividad inhibitoria de los picos separados a altas concentraciones de metanol de estos compuestos en microgotas por las complicaciones provocadas por el solvente (pérdida de estabilidad de gotas y desnaturalización de la enzima). La Figura 11 muestra cromatogramas obtenidas de dos extractos naturales con dos gradientes diferentes en la fase móvil. Cada pico representa un compuesto o un grupo de compuestos parecidos.

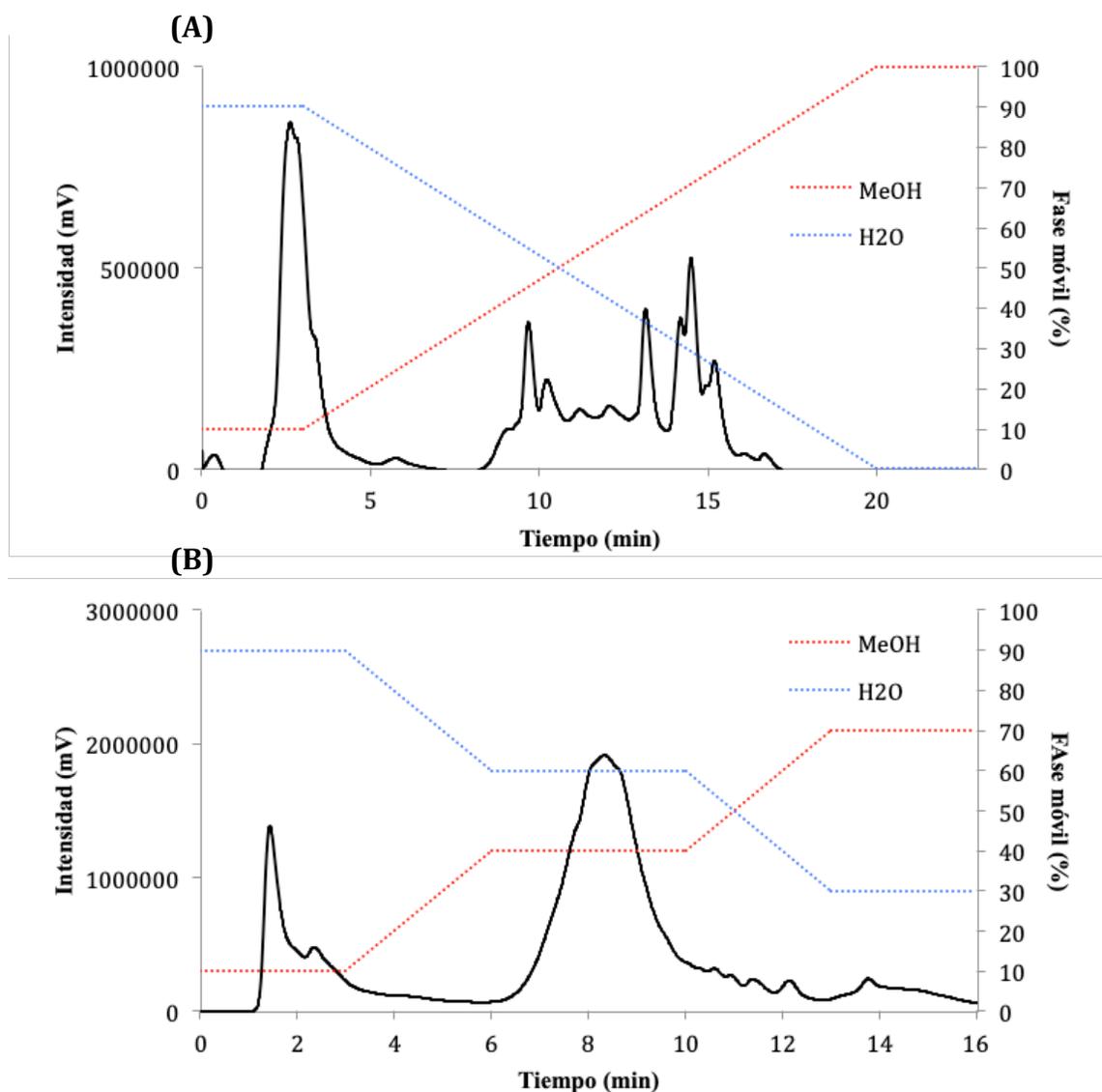


Figura 11. Cromatogramas de dos extractos naturales separados con un gradiente de metanol y agua en el HPLC. (A) Hierbabuena (*Mentha x piperita*) separado con un gradiente de 10 % a 100 % MeOH. (B) Tila (*Ternstroemia lineata*) separado con una serie de gradientes con porcentaje final de MeOH a 70 %. Separaciones realizadas por Laura Cuevas Lomas (resultados no publicados)

2.4 MANIPULACIÓN DEL CONTENIDO DE LAS MICROGOTAS

Hay varias maneras de manipular y cambiar el contenido y los disolventes en las microgotas dentro de los canales, pero la mayoría de estos métodos tratan con gotas estáticas y llenas de solutos polares (como péptidos), los cuales se quedan bien retenidos en la fase acuosa.

En 2004, He et al. demostraron la concentración pasiva de solutos polares en microgotas acuosas. En una fase orgánica de aceite mineral sin tensoactivo, el área de la superficie de las gotas de agua pura disminuyó de manera lineal parecido a la evaporación de gotas de agua en aire, y eventualmente las gotas se disolvieron completamente en el aceite. Sin embargo, en gotas con solutos iónicos, las gotas alcanzaron un tamaño final sin llegar a disolverse (He et al., 2004).

Ji et al., hicieron una concentración similar de solutos con péptidos separados por HPLC (2013). El disolvente orgánico usado en el HPLC fue acetonitrilo (ACN) y la fase orgánica en los canales de microfluídica fue dimetil carbonato (DMC), que tiene alta miscibilidad con ACN, disuelto en agua. El ACN y un volumen pequeño de agua se disolvieron en la fase orgánica, concentrando los péptidos polares (Ji et al., 2013). Realizar este tipo de concentraciones y extracciones líquido-líquido representan una posibilidad para el intercambio de disolventes entre dos fases.

T. Wu et al. (2012) realizaron una disminución de gotas de agua en aceite aprovechando la difusión de agua hacia la fase oleosa. El proceso de difusión depende del tipo de aceite, la concentración del tensoactivo y la presencia de solutos en las gotas. Encontraron que las gotas llegaron a un volumen final y estable dependiendo también de las dichas condiciones. Además encontraron que volúmenes pequeños iniciales y concentraciones bajas de solutos resultaron en disminución más rápida del volumen.

En varios trabajos se ha demostrado que un aumento de la temperatura tiene un efecto benéfico al concentrar solutos de gotas de agua. Esto se debe a que la solubilidad del

agua en algunas fases orgánicas aumenta con la temperatura y se obtienen gotas más pequeñas al llegar al equilibrio (Baipayee et al., 2010; Eslami y Elliot, 2013).

La extracción de líquidos de las microgotas depende de la difusión de las moléculas y es más eficiente en microgotas que en flujos laminares, ya que la dinámica de recirculación al interior de las gotas favorece la mezcla rápida de disolventes dentro de ellas (Xu y Xie, 2017).

En 2011, Shim et al., propusieron un método diferente para manipular el contenido de microgotas mediante una capa de PDMS. Aprovechando la permeabilidad de ese material, diseñaron un dispositivo con un canal que contenía una fuente de disolventes debajo de microgotas atrapadas en pozos en otro nivel del microchip fabricado con PDMS. Usaron gotas acuosas con proteínas en una fase orgánica de aceite fluorinado y tensoactivos. La fuente suministró moléculas pequeñas y disolventes orgánicos a las gotas a través de la membrana de PDMS para cambiar las concentraciones dentro de las gotas sin cambiar su volumen (Shim et al., 2011), (Figura 12). Los cambios que observaron ocurrieron en la escala de minutos.

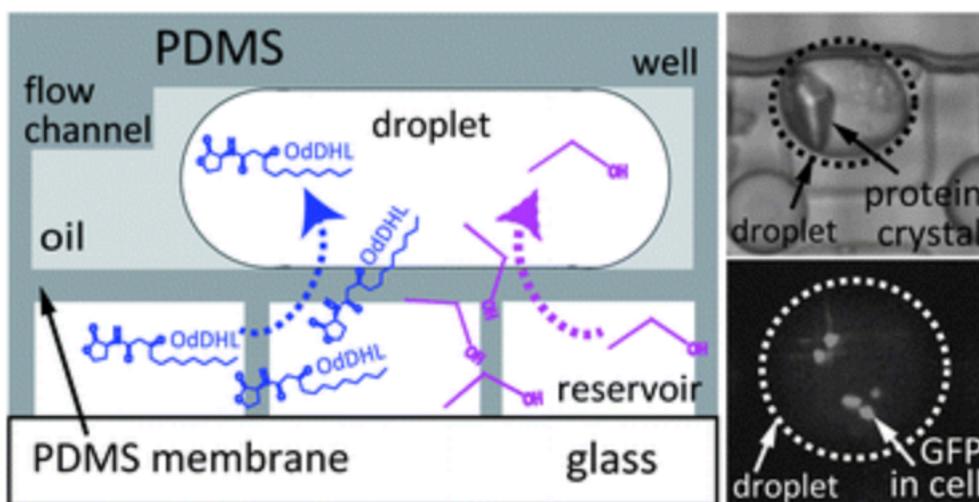


Figura 12. Microchip de dos capas diseñado por Shim et al. (2012) para la difusión controlada de moléculas entre microgotas y micro-pozos a través de una membrana de PDMS. Utilizaron el microchip para extraer e introducir etanol para la cristalización de proteínas, y para introducir el compuesto *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL) en una microgota para inducir una respuesta bacteriana. Imagen de Shim et al. (2012)

Jeffries et al. mostraron la posibilidad de realizar una disminución de volumen reversible con gotas de agua en una fase orgánica de decanol o acetofenona (2007). Utilizaron un láser para calentar sólo una gota y, con un aumento de un Kelvin provocado por el láser, el volumen de la gota disminuyó. Cuando apagaron el láser, la gota empezó a crecer de nuevo por la supersaturación de agua en la fase orgánica alrededor de la gota. Reportaron que la disolución completa de la gota no ocurrió porque cuando la gota disminuye, la relación entre área superficial y volumen aumenta lo que mejora la conductividad de calor y la temperatura de la gota baja un poco, disminuyendo la velocidad de disminución de volumen (Jeffries et al., 2007).

Se ha caracterizado la velocidad de la concentración de un soluto por difusión en una gota como proporcional a la quinta potencia de la relación entre el área superficial y el volumen de la gota (He et al., 2004). El hecho de trabajar en micro- y nano- escala aumenta esta relación y hace posible la técnica de concentración por difusión. He et al. (2004) también mostraron que el volumen de las gotas de agua en aceite moviéndose en un microcanal disminuye más rápido que el de gotas libres, debido al movimiento rápido de la fase oleosa.

2.5 PERVAPORACIÓN

La pervaporación (Figura 15) es una técnica reportada para la separación de líquidos con puntos de ebullición parecidos y para la eliminación de bajas concentraciones de disolventes orgánicos de disoluciones acuosas. Ocurre por la absorción y difusión preferencial de un compuesto en una membrana densa (Villegas et al., 2015). El PDMS, al ser una membrana hidrofóbica, es una opción común para la separación de alcoholes de soluciones acuosas, a través de la desorción del compuesto de la membrana saturada con presión de vacío (Mohammadi et al., 2005). La separación de metanol y agua presenta un problema difícil porque hay poca diferencia entre sus tamaños y afinidades, y una desventaja del PDMS y algunas otras membranas orgánicas es la pérdida de selectividad a altas concentraciones de metanol (Mohammadi et al, 2005, Villegas et al., 2015). Una vez que los poros de la membrana están expuestos a moléculas de metanol, se empiezan a absorber moléculas de agua y metanol con un menor factor de separación. Villegas et al. encontraron que el factor de separación de metanol y agua aumenta con la temperatura, pero en ese estudio trabajaron con una membrana de poli(3-hidroxibutirato) en vez de PDMS (2005).

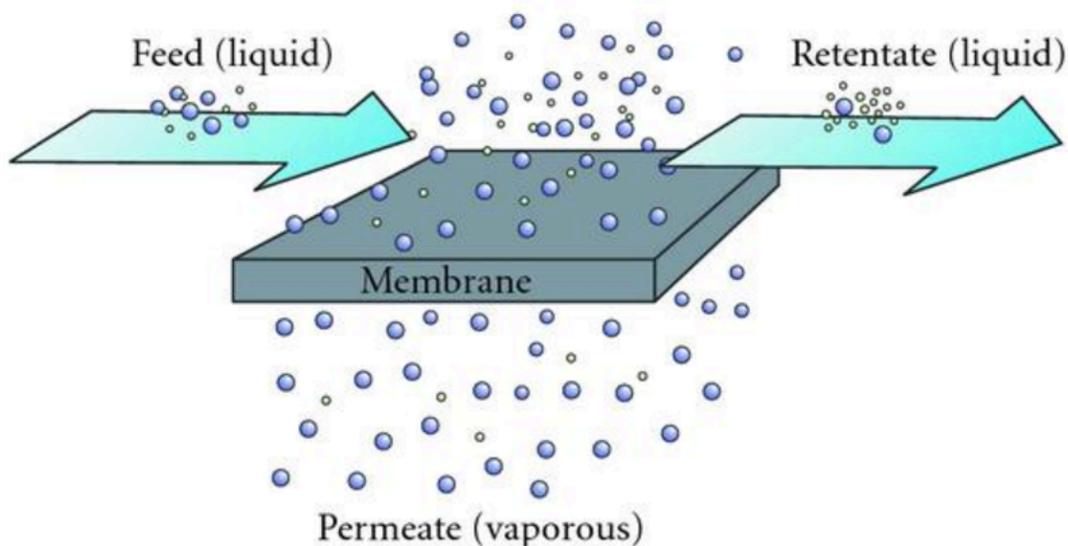


Figura 15. Esquema de una pervaporación. Un tipo de molécula se absorbe de manera preferencial en la membrana y se evapora más rápido. El líquido sale del sistema con una cantidad menor de uno de sus componentes (Mixa y Staudt, 2008)

La selectividad y permeabilidad de una membrana son factores importantes para la pervaporación de un disolvente, y generalmente hay una pérdida de selectividad con un aumento de permeabilidad (Liu et al., 2015). Cuando los poros de la membrana son más grandes (mayor permeabilidad), la afinidad preferencial de una molécula para la membrana tiene menos efecto en la cantidad e identidad de moléculas que pasan por la membrana, y esto provoca la pérdida de selectividad. Para combatir eso y optimizar ambos factores, Liu et al. mezclaron oligómeros de silsesquioxano polihédrico (POSS) con PDMS para crear membranas mixtas con mejor selectividad y permeabilidad para butanol (2015). El diseño de membranas mixtas con selectividad específica representa una vía posible para la optimización de separación de disolventes.

Zeitoun et al. (2011) utilizaron un flujo de nitrógeno seco en un canal adyacente de un canal con gotas de etanol y agua en aceite fluorinado FMS-121 para promover la difusión, absorción y evaporación de los dos líquidos a través de una membrana de PDMS y reportaron que un aumento de temperatura tiene un efecto exponencial en la velocidad de evaporación en el sistema.

2.6 FUSIÓN CONTROLADA DE GOTAS

Para algunas reacciones es necesario inyectar nuevos reactivos a gotas ya existentes. En nuestro caso, una vez que el metanol se haya extraído de las gotas, sería necesario inyectarle la enzima. Esto puede ocurrir por fusión pasiva con gotas o flujos nuevos, o por fusión activa en la presencia de un campo eléctrico o láser (Abate et al., 2010, Gu et al., 2011, Li et al., 2007, Mazutis et al., 2009). En la fusión activa, el componente eléctrico desestabiliza las gotas en un punto controlado para promover su fusión, y con estos métodos, se puede realizar la fusión de gotas de manera muy controlada y eficaz, pero requieren equipos especializados y costosos.

La fusión pasiva puede ocurrir en una unión T, donde las gotas se fusionan con un flujo acuoso que después se corta con la fase orgánica, o por la fusión de gotas sincronizadas. Una desventaja de la fusión pasiva es que requiere el uso de gotas poco estables y es difícil controlar las fusiones no deseadas. Normalmente las gotas estabilizadas por tensoactivo requieren el uso de un laser o campo eléctrico para poder fusionarse, pero Mazutis et al. (2009) reportaron una técnica de fusionar de manera controlada y reproducible gotas estables con gotas parcialmente estabilizadas usando bajas concentraciones de tensoactivo y una geometría de canal “zig-zag” para promover la fusión entre gotas sincronizadas por coalescencia (Figura 13).

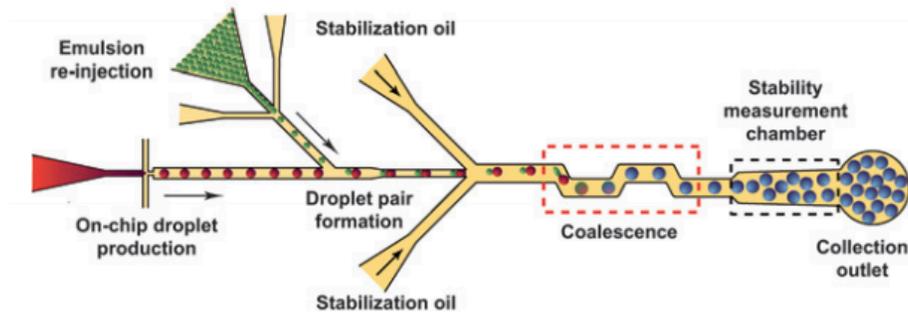


Figura 13. Sistema de fusión pasiva de gotas sincronizadas. La geometría “zig-zag” promueve la coalescencia de las gotas (Mazutis et al., 2009)

Clausell-Thomas et al. también diseñaron un microchip para la fusión pasiva de microgotas en donde gotas con el primer reactivo se quedaron atrapadas por pilares de PDMS en el canal hasta la introducción de una gota grande con el siguiente reactivo cuya coalescencia con las gotas atrapadas forma una gota suficiente grande para salir de la zona de fusión (2010).

2.7 LA FASE CONTINUA

Para promover el intercambio de disolventes y desfavorecer la pérdida de solutos, es importante considerar las propiedades de la fase orgánica.

El aceite mineral es fácil de obtener, económico, y con el tensoactivo apropiado puede formar gotas estables, pero tiene muy baja miscibilidad con el metanol, y solo permite la difusión de metanol a temperaturas muy altas (Ferretti et al., 2015). Además permite la difusión rápida de moléculas pequeñas entre las gotas (Courtois et al., 2009).

Los aceites fluorinados son más costosos, pero tienen baja miscibilidad con moléculas pequeñas y orgánicas, y permiten la difusión de moléculas de gases como oxígeno y dióxido de carbono (Gruner et al., 2015). Además, se ha mostrado que gotas de metanol y agua disminuyen en volumen a lo largo de canales con el aceite fluorinado FC-40 en la fase orgánica, que sugiere que este aceite es miscible a cierto nivel con el metanol (Theberge et al., 2010). Sus propiedades hidrofóbicas y lipofóbicas, por sus cadenas fluorinadas, les hace una opción popular para la microfluídica de gotas. Sin embargo, algunas tintas y reactivos hidrofóbicos son solubles en micelas de tensoactivo (Mazutis et al., 2013). Por esta razón, la cantidad de tensoactivo usado y las propiedades de los reactivos son factores importantes.

Los tensoactivos fluorinados son importantes para detener la fusión descontrolada de gotas acuosas en una fase continua de aceite fluorinado, pero no hay muchas opciones disponibles comercialmente. Los tensoactivos con cadenas fluorinadas cortas no dan suficiente estabilidad a las gotas, y aquellos con cadenas más largas normalmente vienen con un grupo iónico. Para hacer tensoactivos largos y biocompatibles (neutros) para su uso en ensayos con células o proteínas, se necesita modificar el tensoactivo para cubrir y neutralizar el grupo iónico (DeJournette, et al., 2013, Holtze et al., 2008).

2.8 NEURAMINIDASAS

Las neuraminidasas representan un blanco importante en la búsqueda de fármacos nuevos, y los extractos naturales son una fuente rica de posibles inhibidores de estas enzimas. En este trabajo, se enfocó en una neuraminidasa para probar la funcionabilidad de los sistemas microfluídicos diseñados.

Las neuraminidasas, también conocidas como sialidasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis del ácido acetilneuramínico N-terminal (también conocido como ácido siálico o Neu5Ac) de los glicoconjugados en la superficie de la membrana celular. Se encuentran estas enzimas en muchos organismos, incluyendo a bacterias patógenas como *Clostridium perfringens* y virus como el de la influenza. En animales, las neuraminidasas se encuentran presentes en muchos tejidos en donde regulan la cantidad de los ácidos siálicos presentes y tienen un papel en la respuesta inmune de la célula y en la apoptosis (Taylor, 1996).

En infecciones de influenza, la neuraminidasa tiene un papel importante en el proceso de propagación del virus. La superficie del virus tiene dos proteínas, la hemaglutinina y la neuraminidasa. La hemaglutinina forma enlaces con los ácidos siálicos en la superficie de las células, lo que provoca la endocitosis del virus. Cuando el virus entra a la célula, empieza su proceso de replicación, pero al salir de la célula, los virus nacientes quedan atrapados en la membrana por su asociación con los ácidos siálicos. La eliminación del Neu5Ac del receptor celular catalizado por la neuraminidasa del virus libera a los viriones replicados de la célula huésped para seguir el proceso de infección y replicación (von Itzstein, 2007). Sin esta actividad enzimática, el virus no puede infectar a otras células, y la inhibición de dicha enzima representa una manera efectiva de combatir la infectividad del virus.

El papel de las neuraminidasas en infecciones bacterianas es menos conocido, pero hay evidencia que funciona en el metabolismo de varias bacterias y es fundamental para la formación del biofilm en algunas (Lee et al., 2017). Soong et al. encontraron que una

cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria que causa infecciones respiratorias, con una deleción en la secuencia de la neuraminidasa pierde su habilidad de formar el biofilm y colonizar los pulmones de ratones. Además, encontraron que los inhibidores comerciales para la neuraminidasa del virus de la influenza pueden inhibir la formación del biofilm e impedir la infección en ratones (Soong et al., 2006). Por su papel en infecciones virales y bacterianas, los inhibidores de las neuraminidasas representan una fuente importante para el desarrollo de medicamentos nuevos (Lee et al., 2017).

La bacteria *C. perfringens* causa gangrena gaseosa e intoxicación alimentaria, y produce tres neuraminidasas, NanH, NanI, y NanJ, las cuales tienen un papel en la nutrición y patogénesis de la bacteria (Lee et al., 2017).

Todas las neuraminidasas comparten un plegamiento tipo beta propela de seis láminas, que sirve como el dominio catalítico, y tienen siete residuos catalíticos conservados: tres argininas, dos ácidos glutámicos, un ácido aspártico, y una tirosina (Newstead et al., 2008, Langedijk et al., 1997). Las secuencias de las neuraminidasas bacterianas tienen 30% de similitud (Taylor, 1996) y entre uno y cinco repeticiones de cajas Asp en posiciones idénticas en la estructura, pero fuera del sitio activo, con funciones desconocidos (Newstead et al., 2008).

2.9 INHIBICIÓN DE LAS NEURAMINIDASAS

Existen dos antivirales comerciales comunes que actúan contra la influenza inhibiendo la función enzimática de su neuraminidasa: zanamivir y oseltamivir. Ellos actúan como imitadores del sustrato ácido y se unen al sitio catalítico de la enzima, pero ya existen cepas de la influenza resistentes a oseltamivir que retienen susceptibilidad a zanamivir (Kim et al., 2013, Richter et al., 2015). Con el crecimiento de la resistencia bacteriana y viral a medicamentos conocidos, es muy importante buscar nuevos compuestos que puedan ser eficaces en inhibir la función de las neuraminidasas. Entre las neuraminidasas bacterianas y virales sólo se conserva 15% de la secuencia, sin embargo, la topología y los residuos catalíticos del sitio activo son bien conservados (Taylor, 1996), y es probable que inhibidores de una neuraminidasa bacteriana también inhiban a sialidasas de otras especies.

Los inhibidores virales comerciales muestran poca inhibición contra las neuraminidasas de *C. perfringens* y *Vibrio cholerae*, y con métodos tradicionales, la inhibición de la neuraminidasa de *C. perfringens* por zanamivir no es medible (Richter et al., 2015). Con microfluídica de gotas se alcanza medir la constante de inhibición de la neuraminidasa de *C. perfringens* con zanamivir para poder compararlo con nuevos inhibidores (Ochoa et al., 2017).

Se escogió la neuraminidasa de *C. perfringens* como la neuraminidasa modelo para este estudio por su disponibilidad comercial. Pero resulta un buen modelo ya que los residuos catalíticos de las neuraminidasas están conservados. Con la sensibilidad del sistema microfluídica, es posible que se pueda encontrar inhibidores débiles de esta neuraminidasa bacteriana que puedan servir como inhibidores más eficientes de neuraminidasas virales.

Además, la neuraminidasa de *C. perfringens* es relativamente resistente al metanol y tiene actividad normal en soluciones hasta 40 % en volumen de metanol (Hernández Raya, 2012). Por esta razón, es un buen candidato para ensayos enzimáticos acoplados a un

equipo HPLC y para pruebas de la funcionabilidad del acoplamiento de ensayos enzimáticos al sistema propuesto para la extracción de metanol.

3. HIPÓTESIS

Si se aplica vacío a un canal adyacente a un canal con un flujo de microgotas con una mezcla de agua-metanol, aumentará la pervaporación (evaporación a través de una membrana) de metanol absorbido en la membrana de PDMS (Figura 16). Esta reducción de la concentración de metanol en las microgotas facilitará la realización de ensayos de inhibición enzimática en línea utilizando compuestos químicos separados en un equipo de HPLC acoplado.

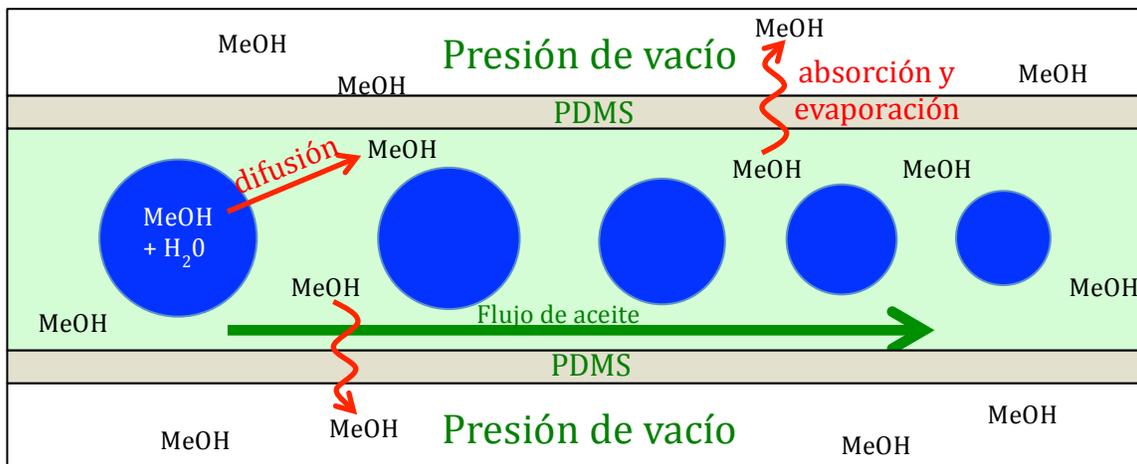


Figura 16. Esquema de la hipótesis. Hay difusión de solutos y disolventes hacia la fase continua hasta el punto de equilibrio entre las dos fases. El PDMS absorbe moléculas orgánicas, como el metanol, y la presión de vacío aumenta la evaporación del metanol en la membrana, liberando espacio en el PDMS y favoreciendo la difusión de más metanol hacia la fase continua.

4. OBJETIVOS

Diseñar un método para la extracción en línea de metanol de microgotas formadas en un canal de microfluídica que facilite el acoplamiento de un equipo de HPLC al sistema microfluídico para ensayos enzimáticos.

Probar la funcionalidad del acoplamiento de HPLC al sistema microfluídico propuesto.

5. METODOLOGÍA

5.1 LOS DISPOSITIVOS DE MICROFLUÍDICA

Diseño del microchip

El diseño de los dispositivos se realizó con el programa Adobe Illustrator C56 y se imprimió en un acetato en negativo (Gráficos Denver) que sirvió como máscara para hacer un molde mediante el método de fotolitografía.

La impresión tiene menos precisión que el archivo de Adobe Illustrator, lo que resultó en que los canales en el negativo estuvieran menos anchos que los canales del diseño. Por eso, para lograr canales de 350 μm en el dispositivo, se tiene que diseñar los canales en Adobe Illustrator de 380 μm .

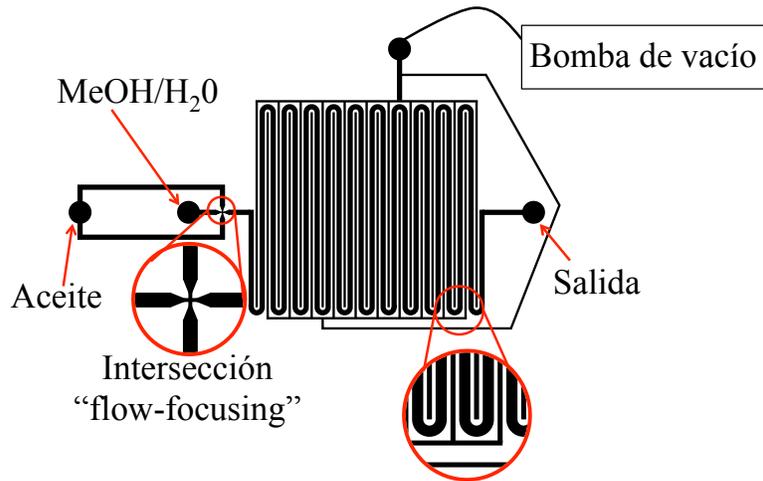
Se diseñaron y se fabricaron cuatro microchips para probar los sistemas de evaporación de metanol y detección del ensayo enzimático.

El primer diseño (Figura 17A) consiste en una unión de *flow focusing* para la formación de gotas con una anchura de 100 μm , un canal serpentin de 380 μm de ancho y 325 mm de largo y canales adyacentes con una anchura de 170 μm . Estos últimos canales se conectan en una entrada para una bomba de vacío. La distancia entre los canales del vacío y el canal serpentin en el archivo de Adobe Illustrator es 125 μm , y la altura de todos los canales es 80 μm . Este diseño fue adaptado del diseño que fue utilizado por Gnyawali et al. para disminuir el tamaño de microburbujas de aire (Gnyawali et al. 2017).

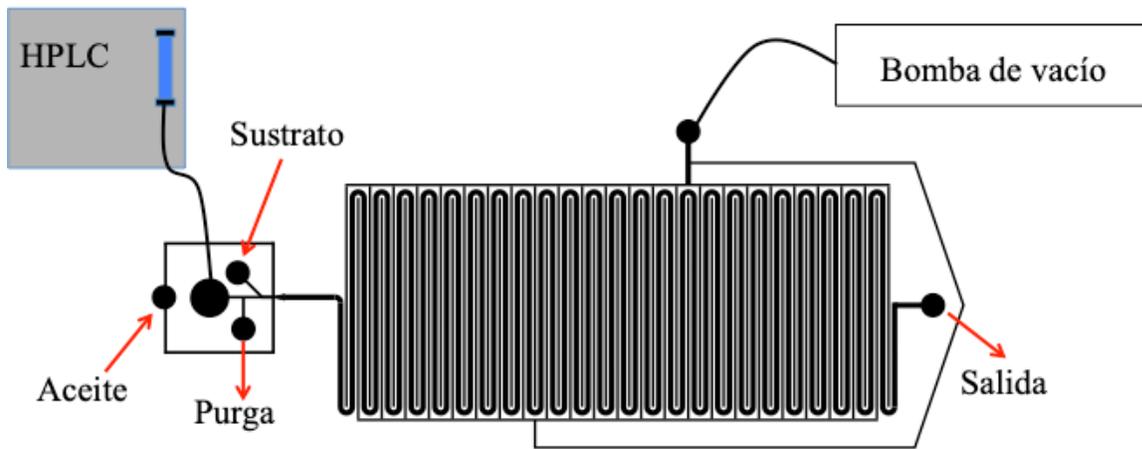
El segundo diseño (Figura 17B) es una modificación del primer microchip. Se diseñó la zona de entrada para facilitar el acoplamiento a un equipo de HPLC y tiene tres entradas, una para el aceite, otra para el sustrato de la reacción enzimática, y otra para el flujo que viene del HPLC. Además tiene una salida río arriba de la formación de gotas para la

purga del flujo en exceso del HPLC. Al final del canal de serpentín hay una salida del chip para las gotas. En este diseño, como en el microchip 1, los canales de vacío entre las curvas del serpentín se conectan por una entrada para la conexión de una bomba de vacío. El canal serpentín tiene una anchura de 380 μm y una longitud de 727 mm. La anchura de los canales de vacío es 170 μm y la distancia entre el canal serpentín y los canales de vacío es 125 μm . La altura de los canales en este chip es 100 μm . La longitud y la altura de los canales fueron modificados del primer diseño para aumentar el tiempo de residencia en el canal y la superficie de contacto entre los canales y el PDMS entre ellos.

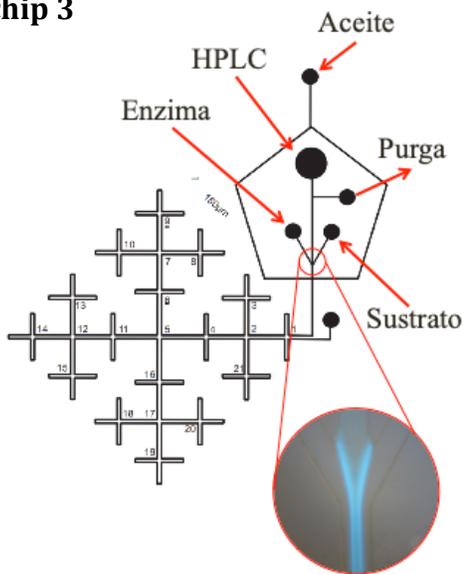
(A) Microchip 1



(B) Microchip 2



(C) Microchip 3



(D) Microchip 4

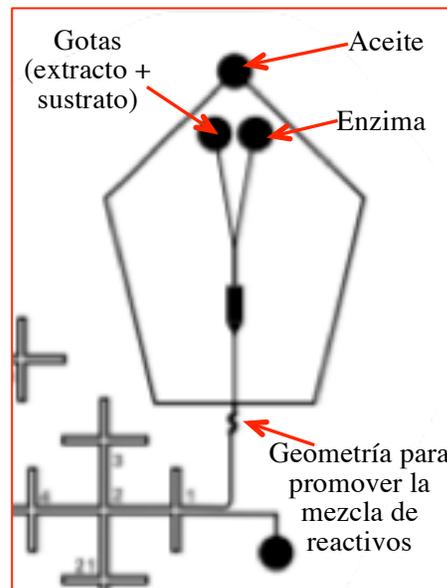


Figura 17. Diseño de los microchips (A) Microchip 1 de extracción de metanol, (B) Microchip 2 de extracción con una entrada diseñada para el acoplamiento del HPLC, (C) Microchip 3 para ensayos enzimáticos acoplados al HPLC, (D) Microchip 4 para ensayos enzimáticos acoplados al microchip 2 de extracción con una entrada diseñada para la introducción de la enzima.

El tercer diseño (Figura 17C) se ha utilizado en un trabajo previo para los ensayos enzimáticos (Ochoa et al., 2017). En este diseño el flujo conteniendo el eluato del HPLC se baja por la purga y río abajo se mezcla con un flujo conteniendo la enzima y otro flujo con su sustrato. Un flujo de aceite corta el flujo acuoso y se forman gotas conteniendo los tres reactivos. El canal consiste en un patrón fractal en que cada cruz representa diferentes tiempos de residencia de las gotas en el chip. El canal tiene la anchura de 150 μm , una altura de 100 μm y una longitud de 28 cm. La detección de la concentración del producto acumulado en la microgota se realiza por fluorescencia en cualquier parte del canal. Sin embargo, en la cruz central del fractal es donde hay mayor diferencia de tiempo de reacción entre las gotas de las cuatro curvas (15, 40, 65, 90 % tiempo de residencia en el microcanal) (Ochoa et al., 2017). Los detalles de la cruz central (cruz 5) se muestran en la Figura 18.

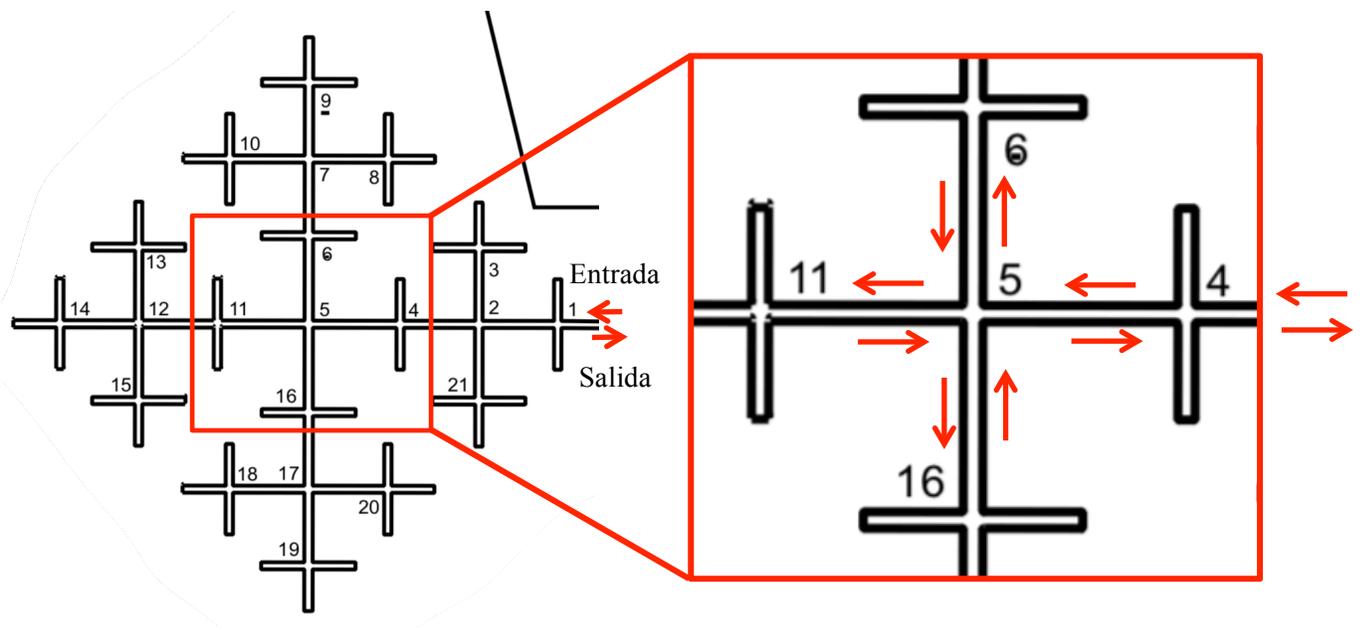


Figura 18. Detalles de la cruz central del fractal en los microchips 3 y 4. El canal donde recorren las microgotas se representa con la línea negra. En la cruz 5 se puede detectar cuatro gotas con cuatro diferentes tiempos de residencia en el canal. Las flechas indican la dirección del flujo.

El microchip 4 (Figura 17D) tiene el mismo patrón y medidas para el canal fractal en que ocurre la reacción. La entrada nueva se diseñó para la introducción de la enzima a las

microgotas que salen del microchip (1) o (2) que ya contienen el sustrato de la enzima y el eluato del HPLC. En el microchip 4, se introduce un flujo continuo conteniendo la enzima, que se junta con el flujo de microgotas en aceite que provienen del microchip (1) o (2), al juntar estos dos flujos, se forman gotas de enzima que mas adelante pueden fusionarse con las del microchip (1) o (2). Las gotas pasan por una zona ancha del canal para promover su fusión, y un flujo nuevo de aceite se introduce para controlar el tamaño y el espacio entre las gotas que entran al fractal.

El esquema para el acoplamiento de varios chips se muestra en la Figura 19.

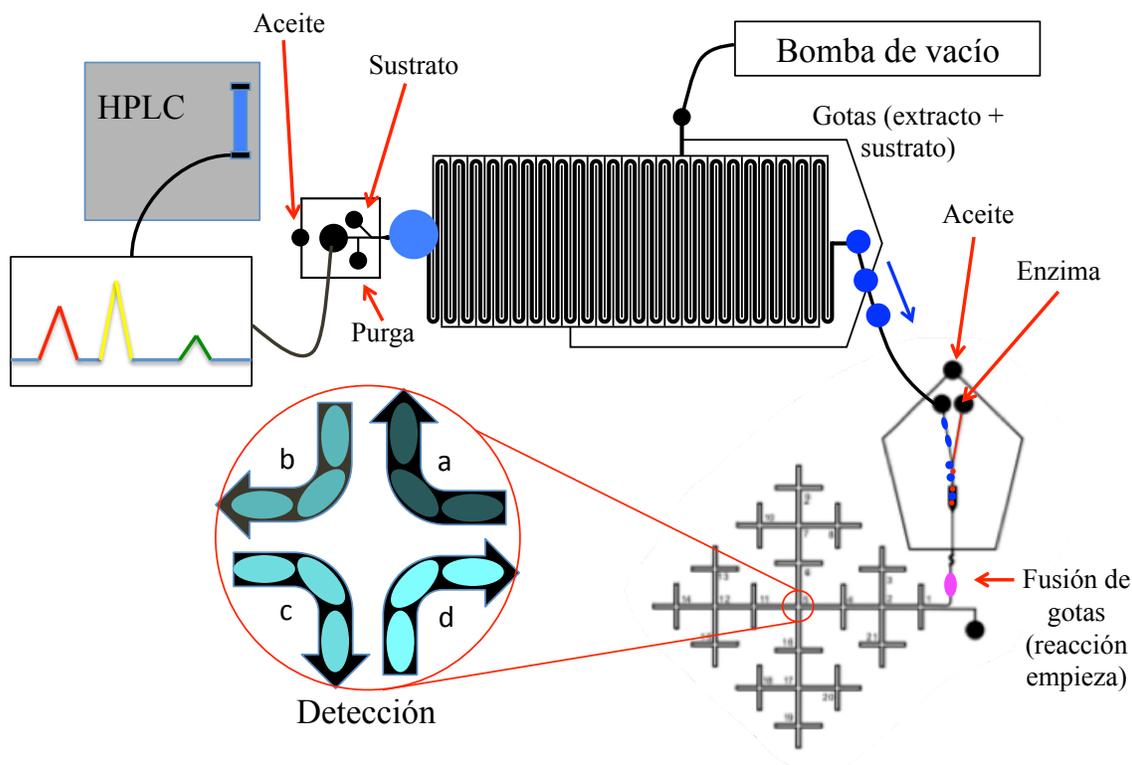


Figura 19. Esquema del diseño experimental. El flujo del HPLC con los extractos separados entra en el microchip 2. Se mezcla con el sustrato para diluir la proporción de metanol en un 50 %. La cantidad de metanol y el volumen total de las gotas formadas disminuye a lo largo del canal. Las gotas concentradas salen del microchip 2 y se fusionan con gotas que contienen la neuramindasa de *C. perfringens* y la reacción empieza. Las gotas se estabilizan con la adición de aceite con tensoactivo, y la reacción se monitorea grabando videos en las cruces del fractal.

Fabricación del microchip

La fotolitografía (Figura 20) es un método muy utilizado para hacer moldes para dispositivos de microfluídica. En este trabajo se utilizó la resina fotosensible SU-8 para realizar este paso del proceso. Una oblea de silicio se limpió con isopropanol seguido por agua destilada, y se calentó sobre una parilla a 200 °C por 5 min para eliminar residuos líquidos. Se colocó la oblea en el centro de un spin coater (Laurell®, WS-650MZ-23NPPB) y se pegó a la superficie mediante presión de vacío. Se añadieron aproximadamente 2 mL de la resina fotosensible SU-8 3035 (MicroChem) en la oblea y se empezó un programa de revolución de 10 s a 500 rpm y 30 s a 1000 rpm con una aceleración de 100 rpm/s para obtener una altura de la resina de 80 µm. Se movió la oblea a una parilla a 65 °C durante 8 min y después a 95 °C por 25 min para un calentamiento suave (*soft bake*). Para obtener una altura de 100 µm se formaron dos capas de la resina de 50 µm utilizando un programa de 500 rpm por 10 s y 2000 rpm por 30 s y repitiendo el paso de *soft bake* después de cada capa. Se colocó la máscara de acetato sobre la resina y la oblea, y se expuso la oblea bajo una lámpara UV (Blak-Ray®, B100AP) por 33 s. La resina se polimerizó donde la máscara permitió el paso de la luz UV. Después de la exposición, la oblea se colocó en una parilla a 65 °C por 1 min y a 95 °C por 10 min para terminar el proceso de polimerización. Se sumergió la oblea en el revelador 1-meti-2-propanol-acetato (Sigma) por 12 min para eliminar los residuos de la resina no polimerizados y se lavó la oblea con isopropanol. Se inspeccionó el molde bajo un microscopio digital (Dinolite AM4515ZTL) para buscar defectos en el canal. Después de la limpieza e inspección, se colocó la oblea con el molde una vez más en una parilla a 150 °C por 5 min para el endurecimiento final.

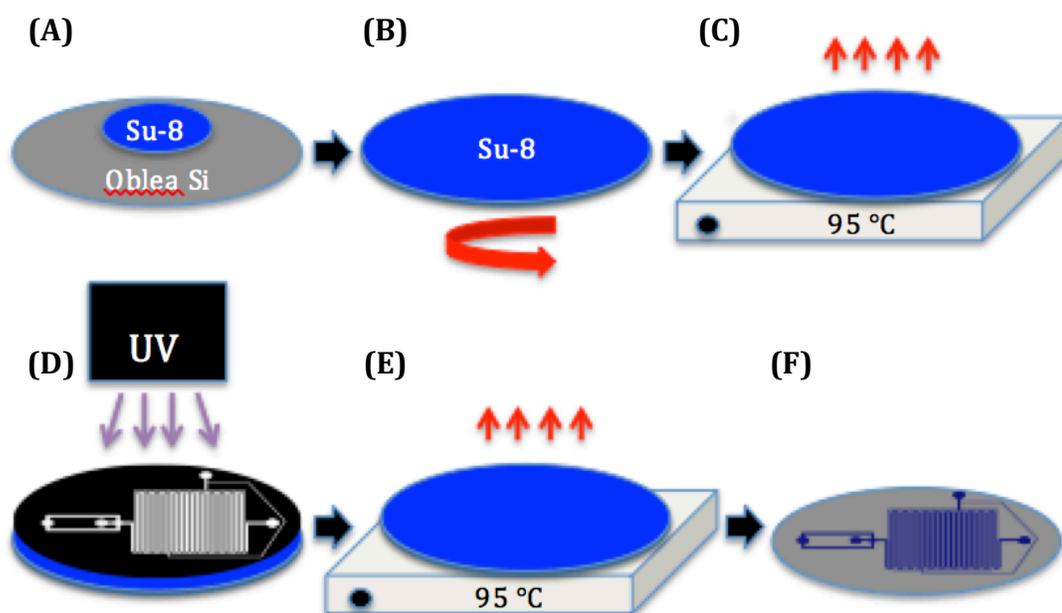


Figura 20. Fotolitografía. (A) 2 mL de la resina Su-8 en una oblea limpia de silicio, (B) Revoluciones en un spin coater para crear una capa uniforme de la resina, (C) *Soft bake*, (D) Colocación de la máscara y exposición a luz UV, (E) Calentamiento para terminar el proceso de polimerización, (F) Revelado del molde del microchip con 1-meti-2-propanol-acetato.

Se utilizó polidimetilsiloxano (PDMS) para la fabricación del dispositivo mediante litografía suave. Se mezcló la base de PDMS (Sylgard 184 Silicone Elastomer) con el agente entrecruzante (Sylgard 184 Elastomer curing agent) en tres diferentes relaciones por peso (10:1, 15:1 y 20:1) para probar membranas de diferentes permeabilidades. Se utilizó 7.5 g de la mezcla para los diseños grandes y 5 g para los más pequeños para controlar el espesor de los microchips. Se puso la mezcla sobre el molde en la oblea en una caja de Petri y se colocó en una campana de vacío durante 20 min para eliminar las burbujas del aire atrapadas en el PDMS. Se calentó durante la noche en un horno a 60 °C para realizar la polimerización completa del PDMS.

Se cortó y removió el PDMS polimerizado de la oblea con una espátula. Las salidas y entradas para las dos fases líquidos y para la presión de vacío se hicieron con un punzón (Rapid-Core, Electron Microscopy Sciences) con un diámetro de 0.75 mm para las

entradas de la fase orgánica y la fase acuosa inyectada directamente al microchip, y con un diámetro de 1.5 mm para la entrada del flujo del HPLC.

Para completar el proceso de la fabricación del dispositivo, el PDMS polimerizado se pegó a un portaobjetos de vidrio de manera irreversible aplicando un minuto de plasma de oxígeno a ambas superficies (Corona Treater, BD-20AC, Electro-technic Products). El dispositivo pegado se colocó en un horno a 60 °C durante la noche para formar enlaces covalentes entre el PDMS y el vidrio.

Caracterización del microchip

La máscara de acetato se caracterizó bajo el microscopio Leica DMI3000 B con la cámara DinoEye Eyepiece Camara (C-mount 0.55x) y el programa Dino-Lite, calibrado para medir imágenes.

Se cortaron secciones transversales de una replica en PDMS en vez de unirlo al vidrio para caracterizar la altura de los canales.

5.2 DISMINUCIÓN DE LA CANTIDAD DE METANOL

Preparación de disoluciones

Para pruebas con aceite mineral como fase orgánica, se usó una mezcla de aceite mineral (Reproquifin) con una gravedad específica de 0.845-0.905 y una viscosidad a 40 °C de 34.5 CTS con el tensoactivo Span 80 (Sigma) al 1.8 % en peso.

Para probar la funcionalidad del microchip se utilizó una mezcla parecida a la usada por Gnyawali et al. (2017). La mezcla contiene proporciones 1:1:1 en volumen de a) una solución salina con 1.5 mg aceite vegetal/mL, b) glicerol, y c) una solución de Pluronic F-127 en agua (0.2g/mL).

Los aceites fluorinados, Flourinert® FC-40 (Sigma) y HFE 7500 (Synquest Laboratories), se utilizaron sin tensoactivo, o se prepararon con 0.1 %, 0.5 %, 3 % o 5 % en peso de un tensoactivo fluorinado y biocompatible sintetizado en nuestro grupo de trabajo de acuerdo a Holtze et al. (2008). El punto de ebullición del aceite FC-40 está entre 158.0 y 173.0 °C y el del HFE 7500 es 130 °C.

En los experimentos de disminución de gotas la fase acuosa se hizo a diferentes concentraciones de agua destilada y metanol puro (LiChrosoly) con colorantes artificiales para alimentos (Azul Brillante FCF, McCormick).

Inyección de disoluciones

La inyección de disoluciones al sistema de microfluídica se realizó con bombas de infusión (NE-1000, New Era) y con jeringas de 1mL (BD). Un extremo de un tubo flexible de politetrafluoroetileno (PTFE) con diámetro externo de 1.19 mm e interno de 0.508 mm (Cole Parmer) se conectó a la aguja de la jeringa (22G) y el otro extremo se unió al dispositivo mediante las entradas cortadas en el PDMS del microchip con diámetros de 0.75 mm.

Calentamiento de los microchips

Se colocaron los microchips de extracción sobre una parrilla para aumentar la temperatura. Midiendo la temperatura del PDMS sobre la parrilla se encontró que la temperatura leída de la parrilla era distinta a la del PDMS. La temperatura programada de 65 °C correspondió a 55 +/- 3 °C en el microchip. Esta diferencia y rango fueron medidos en cada experimento con calentamiento, y para simplicidad, en el resto de este trabajo se reporta la temperatura de calentamiento en el microchip como 55 °C.

Acoplamiento de la bomba de vacío

La bomba de vacío (ILMVAC, $p < 1 \times 10^{-2}$ mbar) se conectó al dispositivo de microfluídica mediante dos tipos de tubería, un tubo grande de látex y un tubo flexible de PTFE como el que se utilizó para conectar las jeringas. La unión de los dos tubos se realizó con una válvula de 4 vías y una conexión luer para tubería con diámetro de 1/16 pulgadas (World Precision Instruments). El extremo de la tubería mayor se selló con parafilm y la entrada de la conexión luer para el tubo de PTFE se selló de manera irreversible con resina epóxica. Para algunos experimentos se utilizó otra bomba de vacío (Dryfast Ultra®, Welch).

Hay una pérdida significativa de presión a lo largo de la tubería de látex que conecta la bomba de vacío al dispositivo, sin embargo una presión de vacío apreciable llegó al microchip. La presión absoluta que marcó la bomba de vacío sin tubería conectada fue 3.1×10^{-2} mbar. La presión mínima alcanzada con el acoplamiento de la tubería de látex con la salida sellada fue 0.17 mbar, y la presión en el sistema completo, con todos los tubos conectados al dispositivo de microfluídica y las entradas y salidas del dispositivo sellados, fue 0.16 mbar.

La presión de vacío fluctuó por problemas en la bomba o en las conexiones. En varios experimentos, sólo se logró una presión 3.0 mbar. Por esta razón, siempre se anota la presión medida en cada experimento. Con la bomba usada, no se pudo programar la

presión para comparar entre dos presiones, pero abriendo la válvula de lastre de gas se notó un aumento ligero en la presión. Con eso se pudo comparar entre presiones diferentes. Con el sistema microfluídico conectado y la válvula de lastre de gas cerrada normalmente se logró una presión de 0.16 mbar y con la válvula abierta llegó a una presión de 0.30 mbar.

Grabación y Análisis de videos

Se grabaron videos de las gotas y burbujas en el dispositivo con una cámara digital (Canon, PowerShot SX260 HS) montada sobre el ocular del microscopio. Se midieron las áreas transversales las burbujas en pixeles y se convirtieron las medidas a las reales usando un factor de escala basado en la anchura promedio medida de los canales. Se calculó su volumen, asumiendo burbujas esféricas.

Para los experimentos en los cuales el chip se montó sobre una parilla para calentarlo, se grabaron videos de las gotas con la cámara del microscopio portátil (Dinolite AM4515ZTL). Se analizó los videos con el programa ImageJ, utilizando la anchura conocida de los canales. Se midió el área de cada gota (Figura 21) y se estimó el volumen

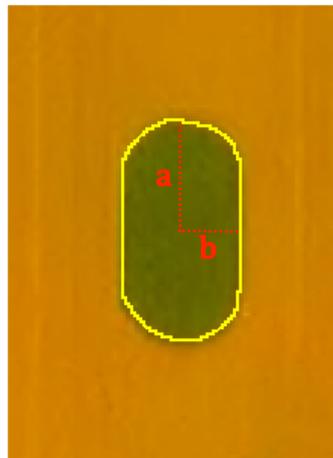


Figura 21. Imagen de una gota en ImageJ con dos de los radios del elipsoide (a , b) marcados. El eje c tiene la longitud de la mitad de la altura del canal.

de la gota, asumiendo gotas elipsoidales para simplicidad. El volumen de un elipsoide es igual a $(4/3)\pi abc$. Se asumió que el área medida es el área de un elipse igual a πab . Para calcular el volumen de una gota se multiplicó el área por $4/3$ y la mitad de la altura conocida del canal (el radio c de la forma elipsoide).

Cuantificación del porcentaje de metanol en las microgotas

Para medir la cantidad de metanol final en las gotas se realizó un ensayo colorimétrico con un protocolo adaptado de Anthon y Barret (2004) que consiste en dos partes (Figura 22). En la primera parte del ensayo, la enzima alcohol oxidasa (*Pichia pastoris*) convierte el metanol a formaldehído el cual reacciona en la segunda parte con el reactivo clorhidrato de la hidrazona del 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) para producir un color azul. La segunda parte del ensayo requiere la presencia iones libres de hierro III, y por este razón se utilizó un amortiguador de Tris en vez de un amortiguador de fosfatos.

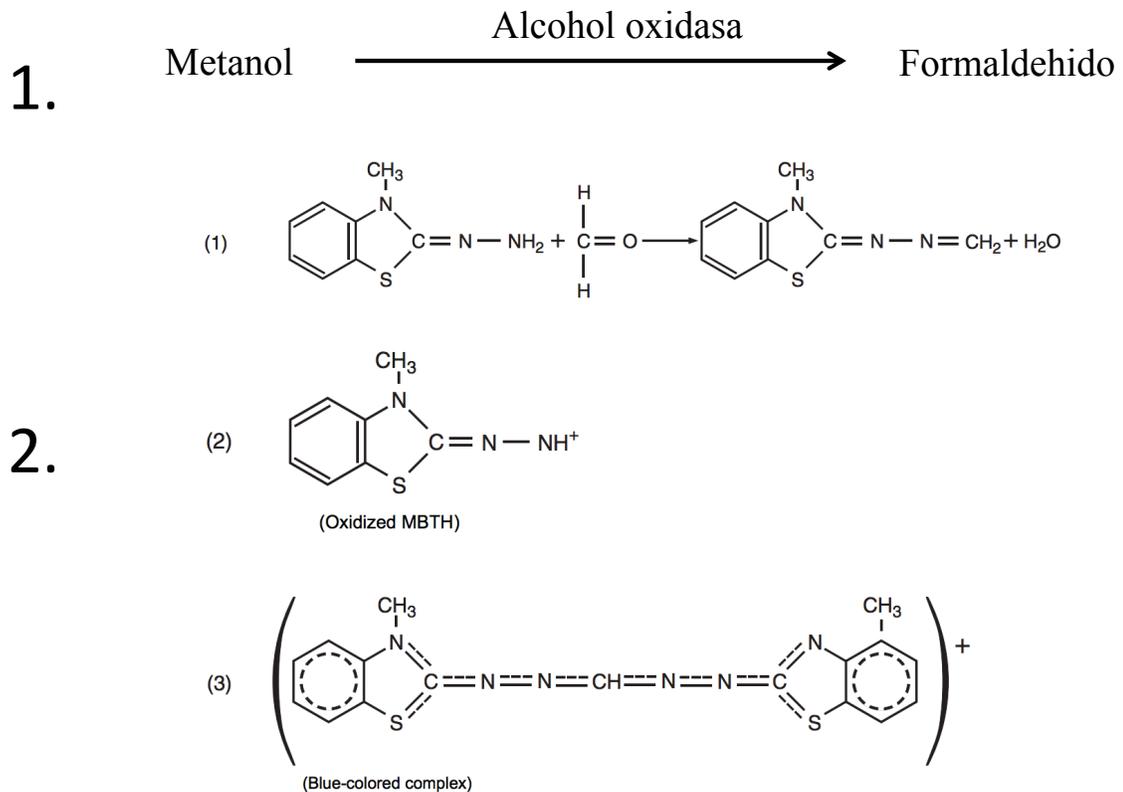


Figura 22. Pasos del ensayo colorimétrico para la determinación de la concentración de metanol. (1) La enzima alcohol oxidasa convierte el metanol en formaldehído. (2) El MBTH oxidado forma un complejo con el formaldehído que tiene color azul. Adaptado de Hach®.

Todos los reactivos se compraron de Sigma. Se mezcló 1 μL de la muestra de metanol con 14 μL de 100mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 μL de 3 mg/mL MBTH y 1 μL de la enzima alcohol oxidasa a 0.01 U/mL. Se incubó esta solución a 30 °C por 20 min. Después se añadieron 20 μL de una solución de sulfato de férrico y ácido sulfámico a 5 mg/mL de cada uno con 60 μL de H_2O para un volumen final de 100 μL , y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 700 nm con un espectrofotómetro (Varian Cary 50). Se prepararon cinco soluciones para la curva de calibración en el rango de 1.23 – 3.70 mM MeOH en agua que es el equivalente de 10 – 30 % V/V MeOH en agua diluido 2000 veces.

Se colectaron gotas saliendo del microchip 2 y se centrifugaron a 15,000 rpm por 15 min para romperlas. El aceite fluorinado FC-40 tiene una densidad de 1855 kg/m^3 y el metanol tiene una densidad de 792 kg/m^3 . Las dos fases se separaron quedando la mezcla de metanol y agua arriba del aceite fluorinado.

5.3 FUSIÓN DE GOTAS PARA LA INTRODUCCIÓN DE LA ENZIMA

Pruebas de fusión controlada

Se realizó una prueba preliminar utilizando el microchip 4 para intentar fusionar gotas de agua y colorante azul formadas y disminuidas en el microchip 2 y un flujo continuo introducido en el microchip 4 con agua y colorante rojo. Se inyectó la solución azul en el microchip 2 y se formaron gotas en FC-40 con 3 % de tensoactivo con el flujo de las dos fases en 120 $\mu\text{L}/\text{h}$. Se colocó el microchip 2 sobre una parrilla y se calentó a 55 °C. Se conectó la salida del microchip 2 a una entrada del microchip 4 con un tubo PTFE con diámetro externo de 1.19 mm e interno de 0.508 mm. En la entrada de la enzima se inyectó agua con colorante a 100 $\mu\text{L}/\text{h}$. En la entrada del aceite del microchip 4, se inyectó aceite FC-40 sin tensoactivo a 200 $\mu\text{L}/\text{h}$.

5.4 HPLC

El acoplamiento del HPLC (LC-20AB, Shimadzu) al microchip (2) o (3) se realizó conectando el tubo de salida del HPLC a una entrada grande (1.5 mm) en el microchip. En una salida río arriba de la formación de gotas se conectó otra bomba (NE-1000, New Era) con una jeringa de 20 mL (BL) para purgar el flujo alto del HPLC, jalando con un flujo de 5940 $\mu\text{L/h}$ para bajar el flujo en el microchip de 6000 $\mu\text{L/h}$ hasta 60 $\mu\text{L/h}$. En los experimentos con el microchip 2 y el microchip 4 acoplados al HPLC se dejó el flujo de la purga en 5500 $\mu\text{L/h}$.

Se utilizó una columna fase reversa C18 (Raptor ARC-18, 2.7 μm , 50 x 2.1 mm, Restek) con una fase móvil de H_2O (A) y MeOH (B). Para los experimentos sin el chip de extracción (microchip 2) se utilizó un gradiente de 10 % - 50 % B. Para los experimentos con el microchip de extracción se utilizó un gradiente de 10 % - 100 % B.

Acoplamiento del sistema completo

Se colocó el microchip 2 sobre una parrilla y se calentó a 55 $^{\circ}\text{C}$ y se introdujo vacío a los canales de vacío. Se conectó la salida del HPLC a la entrada central en el microchip 2, y se inyectó un amortiguador de fosfatos con colorante azul con o sin el sustrato 4-MUNANA en la entrada para el sustrato. Se conectó la bomba de la purga en la salida de la purga con un flujo de 5500 $\mu\text{L/h}$. Se utilizó el aceite FC-40 con 3 % tensoactivo a 120 $\mu\text{L/h}$ como la fase continua. En la salida del serpentín se colocó un tubo PTFE con diámetro externo de 1.19 mm e interno de 0.31 mm que conectó a una de las entradas para la fase acuosa del microchip 4 colocada en el microscopio Leica DMI3000 B. En la otra entrada para la fase acuosa se inyectó el amortiguador de fosfatos con o sin la neuraminidasa de *C. perfringens* con un flujo de 120 $\mu\text{L/h}$. En la entrada para aceite del microchip 4 se inyectó el aceite FC-40 con 3 % tensoactivo a 200 $\mu\text{L/h}$.

Por la diferencia de densidades entre el aceite y las microgotas, no se mantiene el espacio entre ellas a lo largo de la tubería entre los dos chips. Las microgotas tienen menor

densidad y se juntan en el ápice del arco de tubería. Una vez que se acumulan varias microgotas empiezan a mover otra vez y llegan al segundo chip en grupos. Entre estos grupos llega puro aceite al segundo chip. Para evitar este problema y hacer el flujo de gotas más constante se montó el microchip de fusión en una posición más alta que la del microchip 2 para promover el flujo de microgotas hacia el nuevo chip.

5.5 ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Preparación de disoluciones y reactivos

La enzima y el sustrato se disolvieron en un amortiguador de fosfatos (50 mM fosfatos, 150 mM KCl, 0.2 % BSA) a pH 7.0. Se preparó el sustrato ácido 2-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA) a 300 μ M y la neuraminidasa a 2 U/ μ L. La neuraminidasa de *Clostridium perfringens* se compró de Sigma Aldrich.

El zanamivir para el control positivo de inhibición se preparó de un medicamento comercial Relenza®, y una dosis de 25 mg corresponde a 5 mg de zanamivir. Se disolvió un dosis en 250 μ L de agua destilada para una disolución final de 20 mg/mL de zanamivir. Se filtró la disolución para inyectar al HPLC con un filtro para jeringas con poro de 0.20 μ m (Millex® syringe filter units, Sigma-Aldrich).

Ensayos enzimáticos seguidos por fluorescencia

El compuesto 4-metilumbeliferona (4-MU) es un producto fluorescente de la reacción enzimática de la neuraminidasa con el sustrato 4-MUNANA. El máximo de absorción de 4-MU es a los 360 nm, y su máximo de emisión es a los 450 nm. Para inducir la fluorescencia en las gotas, se colocó el microchip en un microscopio de fluorescencia (Leica, DMI3000-B) y se proyectó luz en el rango de 350 a 400 nm. La luz llegó al microscopio desde una lámpara (PhotoFluor II, Chroma, 89 North) que produce un rango amplio de longitudes de onda. La luz producida entró en el microscopio por un cable de fibra óptica y pasó por un cubo de fluorescencia DAPI-50LP-A (Semrock, Inc.) que incluye un filtro de excitación (FF01-377/50), un filtro de emisión (FF409-DI03) y un espejo dicróico (FF02-409/LP).

Grabación y análisis de videos

Para obtener videos de las gotas para análisis de su fluorescencia, se utilizó una cámara de alta velocidad (Phantom, Miro M110, AMETEK) acoplada al microscopio que tiene la capacidad de capturar hasta 5000 cuadros por segundo. Se utilizó el software PCC 2.2 para grabar los videos. Los parámetros de los videos fueron resolución (512 x 384 pixeles), velocidad de captura (24 cuadros por segundo) y tiempo de exposición (39583 μ s)

Para analizar los videos se utilizó el software MatLab con un programa desarrollado para medir las magnitudes de fluorescencia en las gotas. Se seleccionaron cuatro puntos en la pantalla los cuales correspondieron a las cuatro curvas de una cruz del fractal de canales, y el programa midió la magnitud de luz en cada cuadro del video en estos puntos. Los datos obtenidos en este programa se pasaron a un programa del software Mathematica (Wolfram) para sacar los máximos de las señales de fluorescencia y quitar los mínimos (que corresponden a espacios entre gotas o a gotas parciales), (Ochoa, 2016, Tesis Licenciatura UNAM).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROCHIPS

Se determinaron el ancho y altura de los canales de los dispositivos a partir de imágenes tomadas con una cámara digital (DinoEye Eyepiece, C-mount 0.55x) bajo un microscopio invertido con un objetivo 4X y utilizando el programa DinoLite (Figura 23). En el microchip 1 el canal serpentin de las dos fases midió $348.5 \mu\text{m} \pm 2.1$. Los canales para el vacío midieron $143 \mu\text{m} \pm 2.2$ y la distancia entre los canales en PDMS midió $145 \mu\text{m} \pm 1.4$. Se cortaron y analizaron secciones transversales del dispositivo de PDMS para determinar la altura de los canales que era de $79 \mu\text{m}$.

El canal serpentin del microchip 2 midió $385.6 \mu\text{m} \pm 7.56$ de ancho. Los canales de vacío midieron $172 \mu\text{m} \pm 6.3$ y la distancia entre los canales en PDMS midió $107.6 \mu\text{m} \pm 4.5$. Todos los canales midieron $96.4 \mu\text{m} \pm 4.95$ de altura. El microchip 4, el canal de fractal midió $151 \mu\text{m} \pm 4.3$ de ancho. La zona ancha del canal antes de la unión *flow focusing* midió $777 \mu\text{m} \pm 4.6$ y la zona inmediatamente después de la zona ancha midió $79.3 \mu\text{m} \pm 2.5$. Todos los canales midieron $108 \mu\text{m} \pm 4.2$.

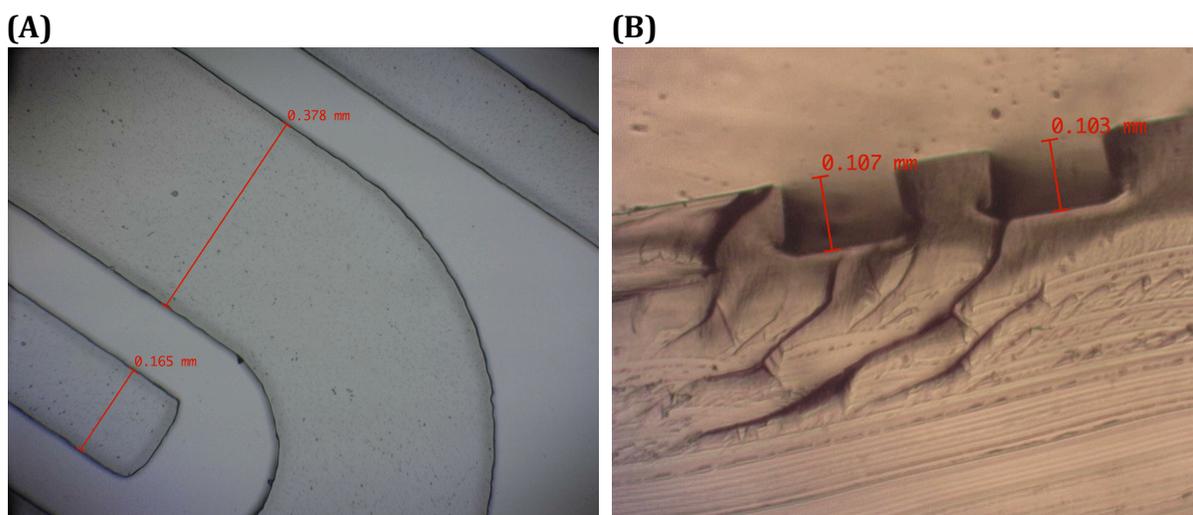


Figura 23. Caracterización de los microchips. (A) Canal serpentin y canal de vacío del microchip 2. (B) Corte transversal del microchip 4 que muestra la altura de los canales.

6.2 APLICACIÓN DE VACÍO

Para comprobar la permeabilidad del PDMS y observar el efecto del vacío en el sistema se realizó una adaptación del experimento de Gnyawali et al. (2017) utilizando el microchip 1. Se formó un flujo constante de burbujas de aire en un fluido formado por una mezcla homogénea de 1:1:1 por volumen de aceite vegetal en una solución salina, glicerol y una solución de Pluronic F-68 en agua. El tamaño de las burbujas fue muy variable, pero cuando se aplicó vacío en los canales adyacentes al flujo se observó una reducción rápida del tamaño de las burbujas lo cual indicó la salida del aire a través el PDMS hacia los canales del vacío (Figura 24A). La fase continua se cambió por aceite mineral, ya que este es más fácil de obtener que la mezcla utilizada por Gnyawali et al. (2017). El experimento se repitió con aire en aceite mineral con y sin presión de vacío para medir el efecto del vacío en la disminución de las burbujas (Figura 24B). Se observó una diferencia significativa en la velocidad de la disminución del tamaño de una burbuja con y sin vacío, observándose un cambio mayor con presión vacuométrica en los canales adyacentes. Se observó que las burbujas más pequeñas se movían con menor velocidad, y ocurrieron fusiones de burbujas cuando las más grandes alcanzaron a las menores.

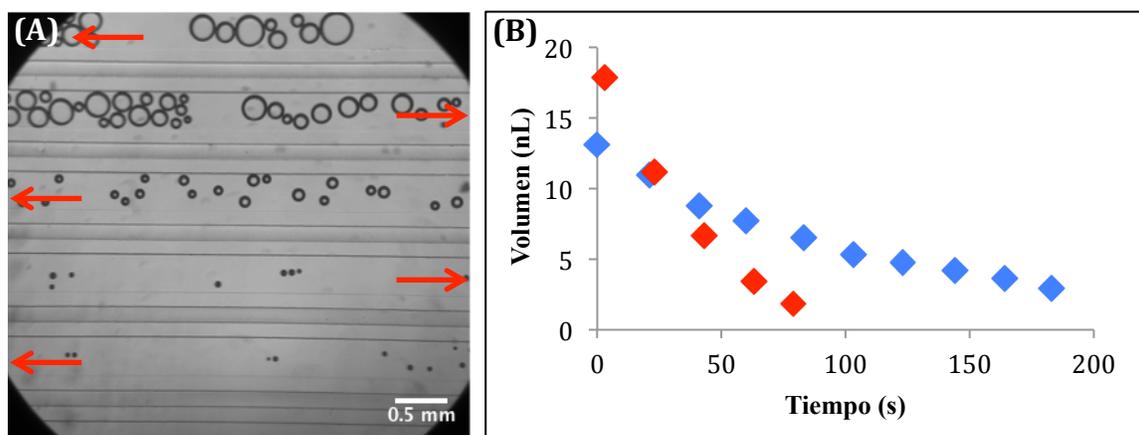


Figura 24. (A) Disminución del volumen de burbujas en un flujo continuo con vacío aplicado en el microchip 1, y utilizando como la fase continua una mezcla 1:1:1 por volumen de aceite vegetal en una solución salina, glicerol y una solución de Pluronic F-68 en agua. Las flechas indican la dirección del flujo en el canal serpentin. (B) Disminución del volumen de una burbuja en el microchip 1 como función del tiempo de residencia en el canal a presión atmosférica (azul) y presión de vacío (rojo). La fase continua en este experimento fue aceite mineral sin tensoactivo. Cuando se prendió la bomba de vacío las burbujas en flujo disminuyen su volumen hasta desaparecer por completo antes de llegar a la salida del chip.

6.3 DISMINUCIÓN DE GOTAS CON METANOL Y AGUA (microchip 1)

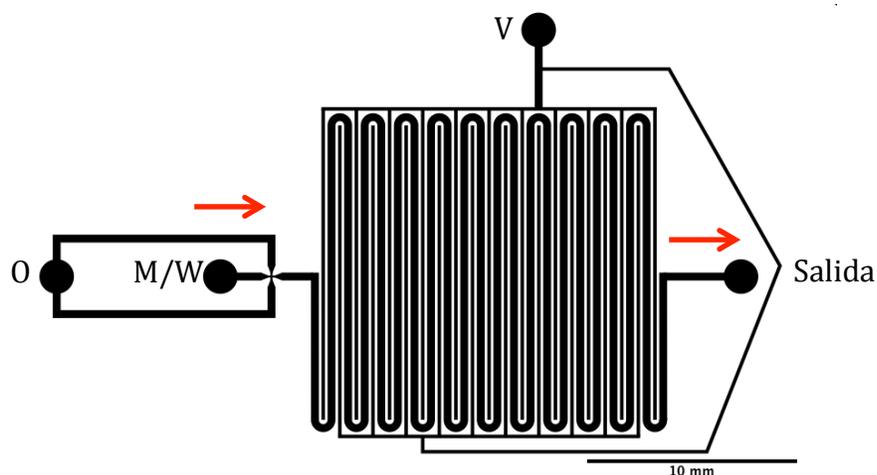


Figura 25. Diseño del microchip 1 para la extracción de metanol con las entradas para el aceite (O), la mezcla 1:1 metanol:agua (M/W), y para la conexión de la bomba de vacío (V). El serpentina de este chip tiene una longitud de 325 mm.

Se encontró que gotas de puro metanol no se forman en el aceite fluorinado porque el metanol se asocia con la membrana de PDMS. Por tal razón, se utilizó un flujo constante de gotas de metanol y agua (1:1 en volumen) con colorante azul en aceite fluorinado (FC-40) sin tensoactivo como la fase continua en el microchip 1 (Figura 25, 26).

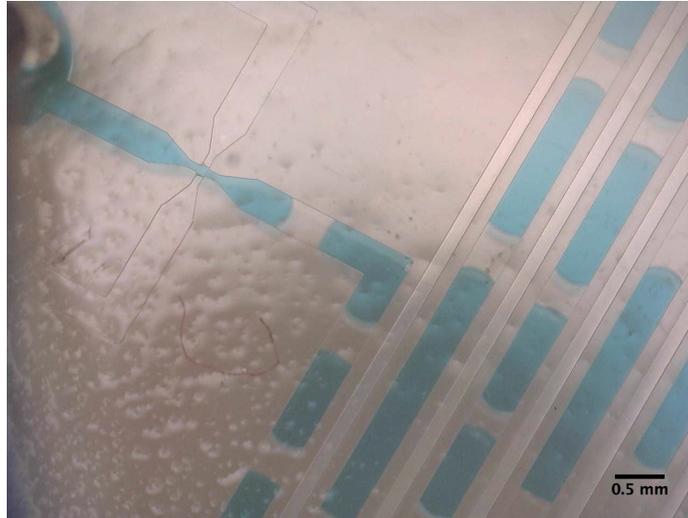


Figura 26. Formación de gotas de 50 % metanol y agua v/v (flujo = 20 $\mu\text{L/h}$) en el aceite fluorinado FC-40 sin tensoactivo (50 $\mu\text{L/h}$).

Para medir la disminución del volumen de las microgotas a través de su viaje por el serpentín del dispositivo, se grabó un video del movimiento de una gota a lo largo del canal bajo varias condiciones. Después, se analizaron con detalle las imágenes de la gota en cada curva del serpentín en un lado del microchip y se midió su área transversal. Las gotas formadas sin usar tensoactivo tienen formas rectangulares más que elipsoidales y para estos experimentos se estimó el volumen de las gotas multiplicando el área transversal por la altura del canal, asumiendo que las gotas llenaron el canal. Se estudiaron cuatro condiciones iniciales: a) temperatura ambiente (23 °C) y presión atmosférica (780 mbar en la Ciudad de México); b) temperatura ambiente (23 °C) y vacío (0.88 mbar); c) temperatura alta (55 °C) y presión atmosférica (780 mbar); y finalmente d) temperatura alta (55 °C) y vacío (0.88 mbar).

En la Figura 27 se muestra la disminución del volumen de una gota en función de la distancia recorrida bajo las diferentes condiciones mencionadas anteriormente. Cuando la microgota viaja a temperatura y presión ambiental se observó una ligera disminución (11 %) de su volumen de 14.9 a 13.3 nL (línea azul). Lo que sugiere que el agua y/o el metanol son ligeramente solubles en el aceite FC-40. La disminución del volumen de la microgota cuando se mantuvo la temperatura en 23 °C y se aplicó vacío (10 %, 15.7 – 14.2 nL, línea verde) fue muy parecida a la observada a presión atmosférica. El aumento de la temperatura de 23 °C a 55 °C a presión atmosférica sí provocó un cambio significativo en la disminución (25 %) del volumen de una gota de 12.4 a 9.3 nL (línea roja). Finalmente, cuando se utilizó una temperatura de 55°C y vacío, hubo una disminución de 39 % en tan solo la primera mitad del microchip (línea negra). En este caso, la gota se fusionó con otra por lo que se ve un aumento del volumen en la segunda

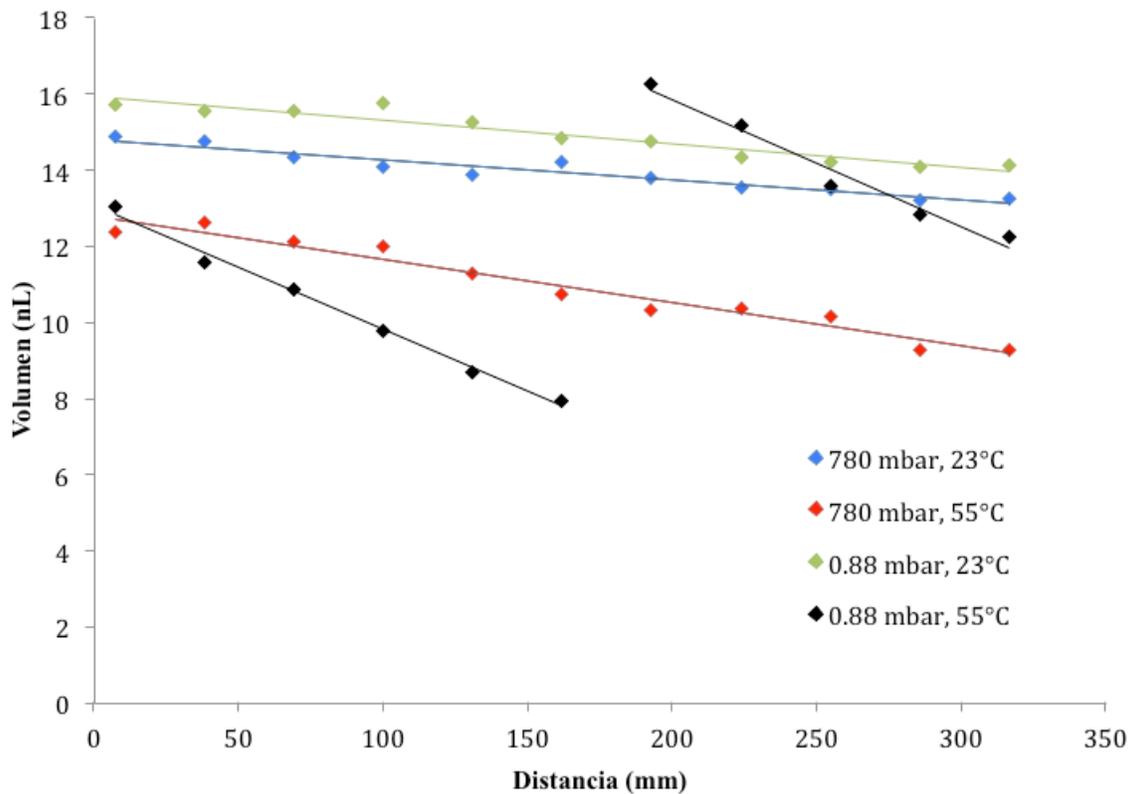


Figura 27. Disminución del volumen de una gota de metanol y agua (1:1 en volumen) a lo largo del canal de microchip 1 a dos diferentes presiones y temperaturas. El flujo del aceite fue 50 $\mu\text{L/h}$ y el de la mezcla de metanol y agua fue 20 $\mu\text{L/h}$. La velocidad de las gotas fue 0.56 mm/s \pm 0.085. La gota seguida a 55 °C y 0.88 mbar (línea negra) se fusionó con otra gota después de recorrer la primera mitad del serpentín por lo que su volumen se duplicó abruptamente. En la segunda mitad se siguió la nueva gota grande formada.

mitad del chip. Se intentó calentar el microchip a mayores temperaturas, pero arriba de 60 °C, todos los fluidos, incluyendo el aceite, empezaron a evaporarse rápidamente. Además, el PDMS se volvió más flexible y no se pudo mantener el sello necesario con las mangueras de PTFE en las entradas del microcanal e inclusive se salieron.

Una medida para comparar la velocidad de evaporación de las gotas es el cambio de los nanolitros de la gota entre los milímetros avanzados por la gota (la magnitud de las pendientes de la Figura 27). Para comparar entre las cuatro condiciones utilizadas se promediaron las pendientes de entre dos y cuatro experimentos independientes en los que se siguió una gota en cada uno.

La Figura 28 muestra los promedios de las magnitudes de las pendientes (velocidad de evaporación, nL/mm) bajo las cuatro condiciones (23 °C, 780 mbar; 23 °C, 0.88 mbar; 55 °C, 780 mbar; y 55 °C, 0.88 mbar) las cuales fueron 0.006, 0.01, 0.02 y 0.05 respectivamente. El promedio de la magnitud de la pendiente de disminución del volumen a temperatura ambiente con vacío aplicado, sí fue distinto y mayor (67 %) que el a presión atmosférica (una diferencia no observada en la Figura 27). Pero aún esta diferencia fue menor que la que se provocó por un aumento de la temperatura con la presión constante a 780 mbar (Figura 28) que fue un aumento de 233 % en la magnitud. La aplicación de vacío a la membrana de PDMS promueve la evaporación de moléculas absorbidas en la membrana y libera espacio en la membrana para promover la absorción de moléculas nuevas. Pero el hecho de que el calentamiento es necesario para ver un cambio significativo en la disminución del tamaño de gotas, sugiere que la solubilidad de metanol y agua en el aceite fluorinado es un factor limitante importante y que esa solubilidad aumenta con temperatura. La combinación de calentamiento y vacío (55 °C y 0.88 mbar) tiene un efecto sinérgico (733 % de aumento en la magnitud de la pendiente de disminución de volumen con respecto a 23 °C y 780 mbar), probablemente porque a mayores temperaturas una mayor cantidad de moléculas de metanol y/o agua se difunden en el aceite y llegan a tener contacto con la membrana de PDMS por el aumento de solubilidad en el aceite. El vacío libera espacio libre en la membrana, promoviendo la

absorción rápida de las moléculas disueltas en el aceite y aumentando el gradiente de concentración de metanol y/o agua en el aceite.

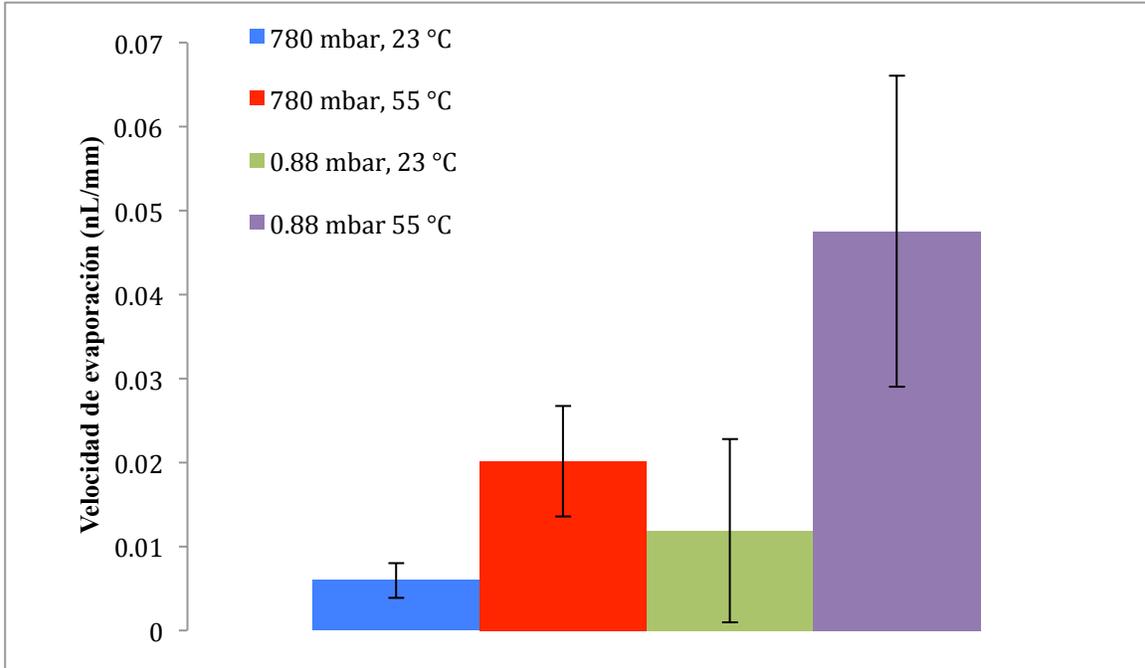


Figura 28. Promedios de las magnitudes de las pendientes de disminución (nL/mm) de gotas de metanol y agua (1:1 en volumen a inyección) bajo varias condiciones. Para los experimentos a 55 °C se promediaron cuatro resultados y dos a temperatura ambiente.

El tiempo de residencia de una gota en el canal es un factor muy importante en la difusión, y se escogieron flujos muy bajos para estos experimentos en el microchip 1 para maximizar el tiempo de residencia y poder identificar otros factores importantes. Las pruebas en el microchip 1 indicaron que, a los flujos utilizados, el factor más importante para la evaporación de metanol de las gotas es la temperatura, y que a mayores temperaturas la presión tiene mayor efecto. Pero los flujos manejados en los experimentos en el microchip 1 eran más bajos de los que normalmente se puede utilizar con el acoplamiento de HPLC. Para medir la evaporación de metanol bajo condiciones reales con flujos alcanzables para el acoplamiento de HPLC, se diseñó el microchip 2.

6.4 DISMINUCIÓN DE GOTAS CON METANOL Y AGUA (microchip 2)

Se diseñó un segundo microdispositivo con una entrada para acoplar la salida del HPLC y con un serpentín con el doble de largo que el del microchip 1 (727 mm y 325 mm, respectivamente) para aumentar el tiempo de residencia de las gotas en el canal. Además, se cambiaron varias condiciones para acercar las condiciones esperadas con los acoplamientos del equipo de HPLC y del microchip 3. Se utilizó tensoactivo en la fase continua para evitar los muchos eventos de fusión inesperados. Para la mayoría de los experimentos en el microchip 2 se aumentó el flujo respecto a los primeros experimentos en el microchip 1 para probar la funcionalidad del sistema con un flujo alcanzable con el acoplamiento del HPLC. Los canales más anchos y largos aumentan el tiempo de residencia de las gotas para balancear el efecto de los flujos más altos. Para los experimentos iniciales de disminución del volumen se inyectó una mezcla de metanol y agua sin conectar el HPLC al microchip.

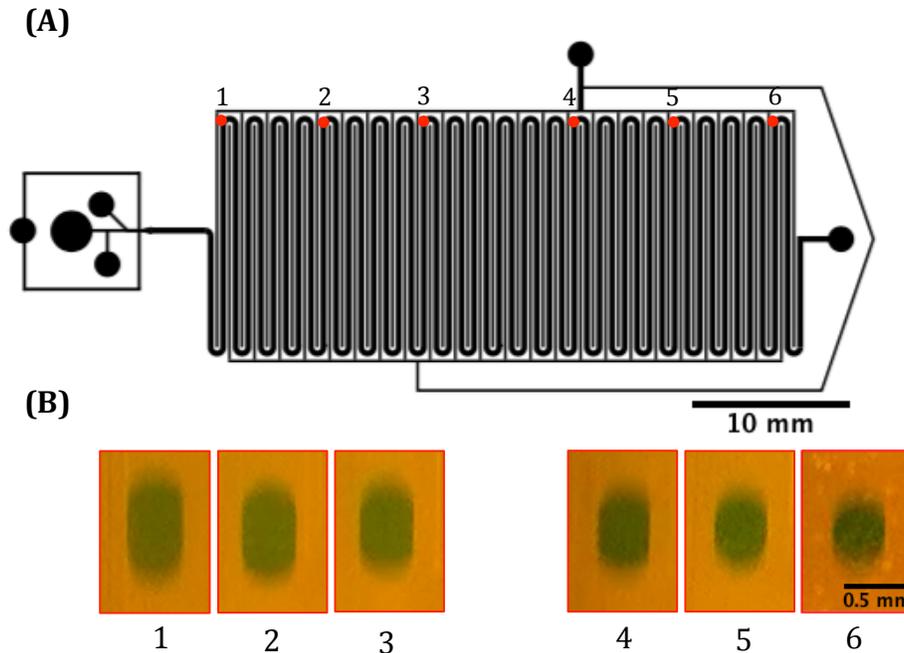


Figura 29. (A) El microchip 2 con los seis puntos de medición indicados. En longitud total del serpentín es 727 mm. (B) Gotas de 50 % MeOH en aceite fluorinado FC-40 con 3 % tensoactivo a 55 °C y 1.7 mbar en los seis puntos de medición en el serpentín del microchip 2.

Para determinar la disminución del volumen de las microgotas se midieron las áreas transversales de 10 gotas en seis puntos distintos en el serpentín del microchip 2 (Figura 29) y se calcularon sus volúmenes correspondientes. El tensoactivo fluorinado aumentó la estabilidad de las gotas y se hizo posible promediar los volúmenes de las 10 gotas cuando pasaron por los seis puntos de medición. Se probaron varias condiciones con el microchip 2 para encontrar las que dieron mayor disminución del volumen (Figura 30).

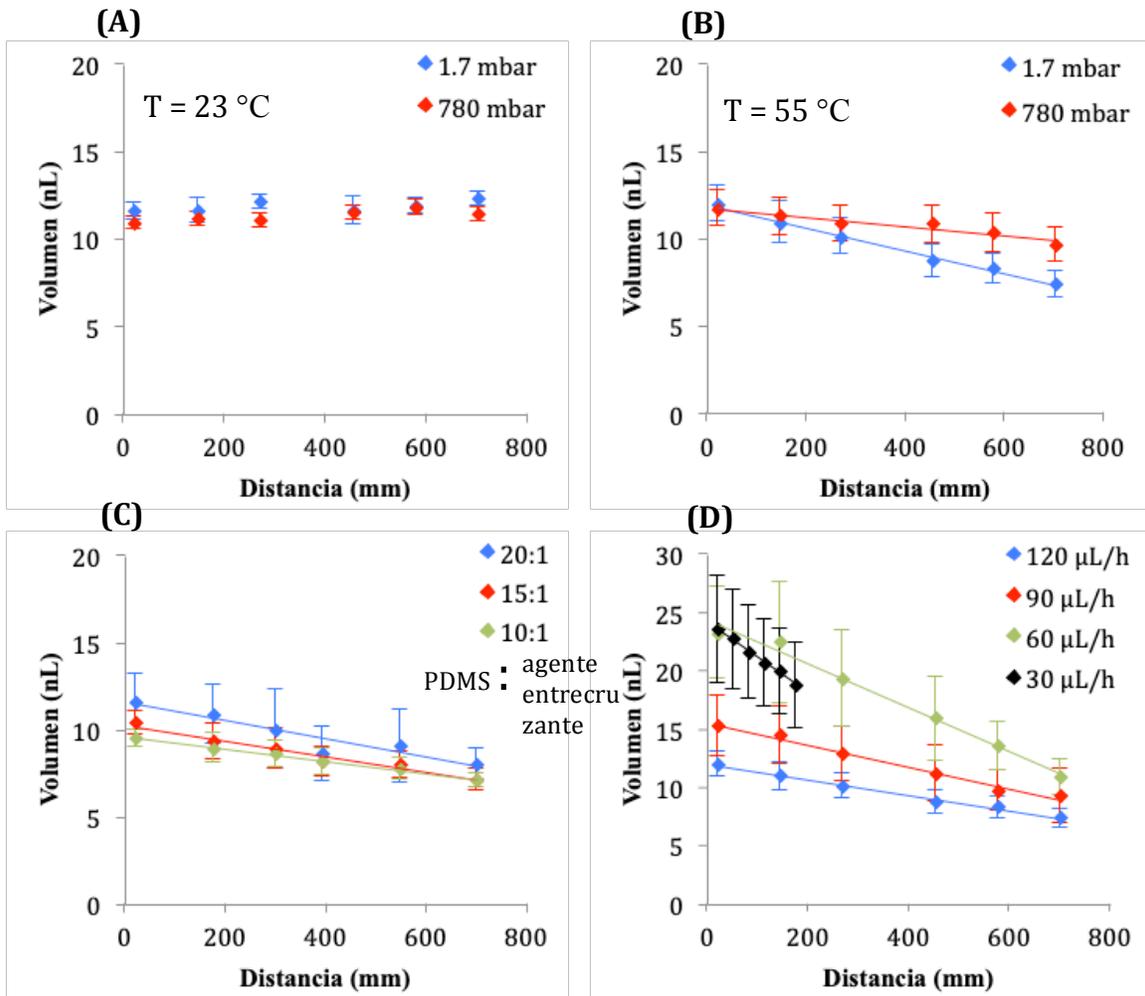


Figura 30. Disminución de gotas de metanol y agua (50 % v/v) en el aceite FC-40 con 3 % de tensoactivo con una relación constante de 1:1 entre los flujos de las dos fases. Los puntos experimentales son el promedio del volumen de 10 gotas en seis puntos del serpentín. (A) Efecto de la presión a temperatura ambiente (23 °C) con el flujo de las dos fases a 120 $\mu\text{L/h}$. (B) Efecto de la presión a 55 °C con el flujo de las dos fases a 120 $\mu\text{L/h}$. (C) Efecto de la relación entre PDMS y agente entrecruzante en la membrana usando tres diferentes microchips a 1.7 mbar y 55 °C. (D) Efecto el flujo de las dos fases a 1.7 mbar y 55 °C. No se midieron gotas en la segunda mitad del chip cuando el flujo estaba en 30 $\mu\text{L/h}$ porque muchas gotas se fusionaron antes de llegar a la salida.

Con los flujos de las dos fases en 120 $\mu\text{L}/\text{h}$, no se observó una disminución del volumen de microgotas a temperatura y presión ambiental (Figura 30A). Además, se observó que la presión de vacío en la membrana de PDMS a temperatura ambiente (23 $^{\circ}\text{C}$) no provocó un cambio en la evaporación de las gotas de metanol y agua (Figura 30A). El calentamiento a 55 $^{\circ}\text{C}$ sí provocó una disminución del volumen (17 %) de 11.7 a 9.7 nL (línea roja en Figura 30B); y la combinación del calentamiento y presión baja provocó un cambio mayor (38 %) que el del calentamiento solo (línea azul en la Figura 30B) de 12.0 a 7.4 nL.

El PDMS se forma a partir de una base líquida y un agente entrecruzante, y la relación entre estos dos componentes determina la densidad de enlaces en la matriz de la membrana. Se ha reportado que una menor cantidad de agente entrecruzante aumenta la permeabilidad del PDMS (Lamberti et al., 2014). Con menos agente entrecruzante, hay más espacio libre en la membrana porque hay menos enlaces entre las cadenas de PDMS. Un resultado no esperado fue que las pendientes de disminución del volumen en los microchips con diferentes cantidades de agente entrecruzante en la membrana fueron muy parecidas (Figura 30C). Hay una ligera tendencia hacia pendientes de mayor disminución con menos agente entrecruzante. Se obtuvo una pendiente de -0.0035 nL/mm en el microchip fabricado con una relación de PDMS:agente entrecruzante en 10:1; -0.0045 nL/mm en el microchip de 15:1; y -0.0052 nL/mm en el microchip de 20:1. Sin embargo, las diferencias están dentro de las barras de error. Estos experimentos con diferentes membranas bajo las mismas condiciones que se muestra en la Figura 30C se repitieron, y otra vez no se observó una diferencia significativa entre las diferentes membranas de PDMS y no se observó ninguna tendencia con respecto a la relación PDMS:agente entrecruzante. Las pendientes de disminución de volumen en microchips fabricados con 10:1, 15:1 y 20:1 PDMS:agente entrecruzante fueron -0.0078, -.0056 y -0.0066 respectivamente (Anexo 1). Una razón de por qué las pendientes son muy similares puede ser que la solubilidad del metanol en el aceite fluorinado sea el factor limitante para la difusión de metanol fuera del chip. Otra hipótesis puede ser que a alta presión de vacío la membrana con menos agente entrecruzante, al ser más flexible se aplasta y se pierde una porción del espacio libre. Es probable que entre todos los factores

(el aceite, la presión, la temperatura, la velocidad de gotas y el tiempo de residencia), el porcentaje de agente entrecruzante en la membrana no es tan importante.

Se probaron varios flujos en el canal para observar el efecto de esta variable en la disminución del volumen de las microgotas. Se mantuvo la relación entre los flujos de las dos fases constantes, pero se disminuyó el flujo total para aumentar el tiempo de residencia de las microgotas en el microcanal, esperando observar un aumento en la velocidad de disminución del volumen. Los flujos reportados son los flujos individuales de las dos fases (120 $\mu\text{L/h}$ se refiere al flujo de la mezcla MeOH/H₂O y 120 $\mu\text{L/h}$ del flujo del aceite, es decir un flujo total = 240 $\mu\text{L/h}$). A flujos bajos (Figura 30D), la disminución de volumen es mayor. Por ejemplo, las pendientes son -0.0066, -0.0096, -0.019 y -0.031 nL/mm para los flujos de 120, 90, 60 y 30 $\mu\text{L/h}$. Sin embargo, hay más eventos de fusión y las gotas se forman más grandes y menos homogéneas. El fenómeno de la dependencia del tamaño de las gotas en el flujo total con una relación constante entre los flujos de las dos fases ha sido reportado (Basilio et al., 2019). Cuando el flujo de las dos fases se bajó a 30 $\mu\text{L/h}$, se escogió un grupo de 10 gotas para seguir y medir en el canal, sin embargo, fue imposible encontrar las gotas en la segunda mitad del chip por muchos eventos de fusión inesperados. La velocidad de las gotas de diferentes tamaños varía ligeramente, y la distancia entre las gotas disminuye a lo largo del canal cuando las gotas más grandes alcanzan las gotas pequeñas en frente de ellas, y el calentamiento del microchip desestabiliza las gotas. Aunque la disminución de la cantidad de metanol es el objetivo, se escogió el flujo de 120 $\mu\text{L/h}$ para los otros experimentos de disminución por la reproducibilidad del tamaño inicial de las gotas y la facilidad de escoger y seguir 10 gotas representativas en el canal para medición. Además, un flujo de 120 $\mu\text{L/h}$ es alcanzable con el acoplamiento del HPLC, y es muy difícil manejar flujos más bajos por los pulsos de las bombas del HPLC tradicional.

La Figura 31 muestra otros tres factores medidos en la disminución de metanol.

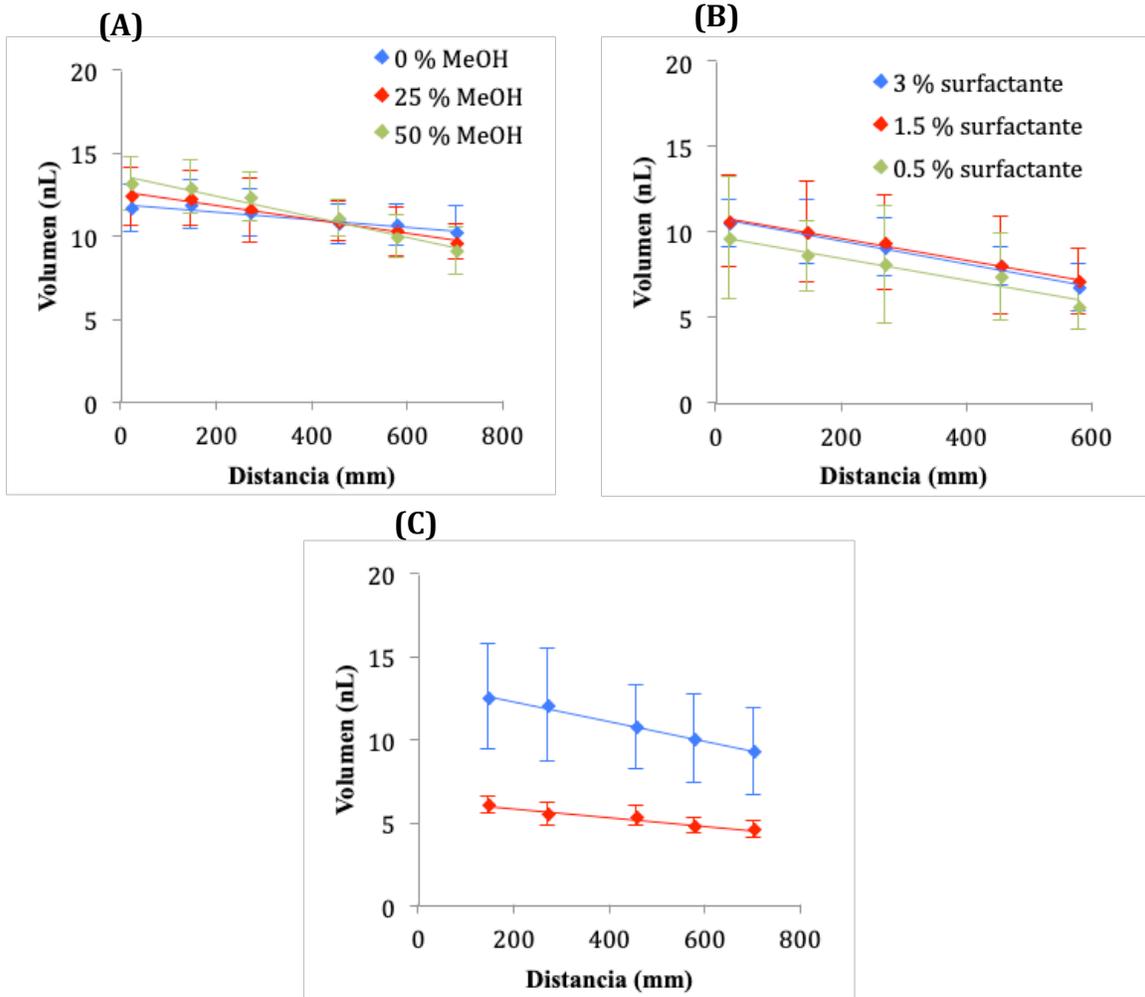


Figura 31. Reducción del volumen de las microgotas a lo largo del microchip tomando como variable: (A) El porcentaje inicial de metanol en la microgotas; (B) la concentración de tensoactivo en la fase continua; y (C) el volumen inicial de la gota. En todas las gráficas el flujo de las dos fases se mantuvo en 120 $\mu\text{L/h}$, y la temperatura y presión se mantuvieron a 55 $^{\circ}\text{C}$ y 0.17 mbar respectivamente. Cada punto experimental representa el promedio del volumen de 10 gotas. El % inicial de metanol en (B) y en (C) fue de 50 % y 25 % v/v, respectivamente, mientras que el % de tensoactivo en (A) y en (C) fue de 3 % m/m.

La Figura 31A muestra la disminución del volumen de las gotas con diferentes porcentajes iniciales de metanol. Hay una ligera diferencia entre la disminución a los tres porcentajes probados. Las gotas con un 50 % de metanol inicial tienen una pendiente de disminución de volumen con magnitud 61 % mayor (0.0062 nL/mm) comparado con las de 0 % (pura agua) que tienen una pendiente con la magnitud 0.0024 nL/mm. Lo que

indica que mayores cantidades de metanol se evaporan más rápido, congruente con una mayor presión de vapor al aumentar el % de MeOH. Una normalización de los datos mostrados en la Figura 31A mostraría un cambio claro entre las pendientes. Sin embargo, el tamaño inicial de la microgota también tiene un efecto en la pendiente de disminución, y es importante no descartar esa contribución. Por esta razón no se normalizaron los puntos experimentales y no se puede concluir con certidumbre el efecto del porcentaje inicial de metanol con las condiciones utilizadas. Sí se puede decir que es probable que gotas con mayores cantidades de metanol disminuyen con mayor velocidad en el aceite FC-40 en canales de PDMS.

La Figura 31B muestra la disminución del volumen de gotas con diferentes porcentajes de tensoactivo en la fase continua. Se observó que en el rango probado (0.5 % - 3 % m/m) de tensoactivo, el porcentaje no tuvo un efecto significativo en las pendientes de evaporación de microgotas de metanol y agua (0.0065, 0.0064 y 0.0067 para 0.5 %, 1.5 % y 3 % m/m tensoactivo respectivamente). Las gotas formadas en FC-40 con 0.5 % y 1.5 % tensoactivo se tardaron en estabilizar y tenían menor homogeneidad que gotas formadas en aceite FC-40 con 3 % tensoactivo. Por esta razón, para la mayoría de los experimentos se utilizó 3 % de tensoactivo.

Las gráficas (Figura 30, 31) muestran que un cambio en las condiciones puede provocar un cambio en el tamaño inicial de las gotas. Inclusive, en un mismo experimento se pueden observar gotas de diferentes tamaños después de un cambio de flujo, o simplemente por usar el mismo chip en varios experimentos y que la mezcla de metanol y agua moje el canal de PDMS. La Figura 31C muestra el resultado de medir 10 gotas grandes y 10 gotas más pequeñas bajo las mismas condiciones a lo largo del microcanal, midiendo y calculando su volumen en seis puntos de medición. Se observó que las gotas que empiezan con mayor volumen tienen la tendencia a evaporarse más rápido que las pequeñas (magnitud de pendiente de 0.006 nL/mm vs 0.0026 nL/mm con las condiciones de la Figura 31C). Una explicación probable es que el espesor de la capa de aceite fluorinado que recubre las gotas sea el factor limitante de la disminución del volumen. Las gotas más grandes están deformadas por las paredes del canal porque tienen

diámetros mayores a las dimensiones del canal y tienen una capa de aceite mucho más delgada entre ellas y la membrana de PDMS que las gotas pequeñas (Figura 32).

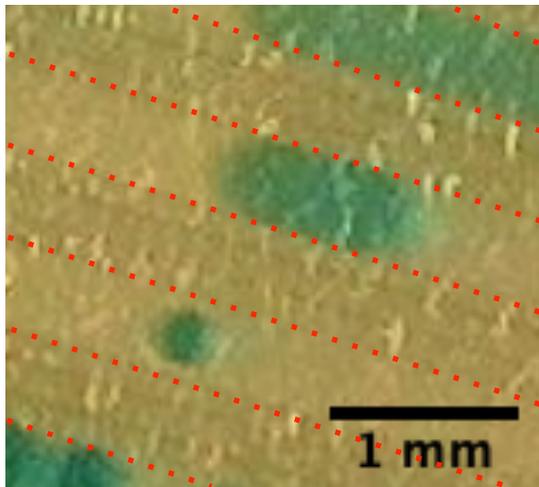


Figura 32. Variación en el tamaño de las microgotas. Las puntas rojas marcan las paredes del canal serpentin.

Las moléculas de metanol y agua solubilizadas en esta capa delgada de aceite se absorben en el PDMS rápidamente provocando un gradiente de difusión mayor en el aceite alrededor de las gotas más grandes. Esta diferencia hace que las gotas más grandes evaporen más rápido.

Se ha reportado que gotas de agua en aceite en condiciones fijas llegan a un volumen final y estable, dependiendo del tipo de aceite y la presencia y tipo de solutos en las gotas (T. Wu et al., 2012). En todos los experimentos en el microchip 2 (longitud de 727 mm) con la temperatura a 55 °C y aplicación de vacío a los canales, el volumen de las microgotas que se observaron tiende a 5 nL de volumen. Aún algunas que empezaron con volúmenes cerca de 5 nL sólo lograron una disminución mínima en su tamaño (Figura 31C). Es posible que el volumen estable de microgotas de metanol y agua con el soluto de la tinta azul (en FC-40 a 55 °C) no sea tan lejano de los 5 nL, y que este fenómeno también contribuya a las diferentes pendientes de disminución de volumen observadas con diferentes volúmenes iniciales de las gotas. Pero como el tiempo de residencia de las

gotas en el microchip 2 no es suficiente para que todas las gotas lleguen al mismo tamaño final, también existe la posibilidad que la limitante del tamaño final sea el tiempo, y que en un canal más largo (con tiempo de residencia mayor) permitiría observar una tendencia hacia microgotas más pequeñas.

Los resultados mostrados hasta ahora indican que los factores más importantes en la disminución del volumen son la combinación de calentamiento y vacío, y el flujo total en el canal. En un esfuerzo de conjuntar todos los resultados se promediaron las magnitudes de las pendientes de disminución (velocidad de evaporación) de cada experimento hecho bajo cuatro condiciones (presión atmosférica y temperatura ambiente, presión atmosférica y 55 °C, presión de vacío y temperatura ambiente, presión de vacío y 55 °C), incluyendo experimentos con diferentes concentraciones de tensoactivo y diferentes porcentajes de agente entrecruzante en la membrana de PDMS ya que el tensoactivo y el porcentaje de agente entrecruzante no tuvieron un efecto significativo sobre las pendientes. Sin embargo se descartaron experimentos con flujos distintos a 120 $\mu\text{L}/\text{h}$ y aquellos con diferentes porcentajes iniciales de metanol debido a que este flujo es necesario para poder acoplar el equipo de HPLC. Los resultados se muestran en la Figura 33. Como se promediaron los resultados de varios experimentos se reporta el rango de presiones medidas con la aplicación de vacío durante todos los experimentos considerados. Los detalles completos de las condiciones y las pendientes de los experimentos incluidos en los promedios se muestran en el Anexo 2.

La Figura 33 muestra una tendencia parecida a que se muestra en la Figura 28, pero con velocidades de evaporación menores debido a los flujos usados en el microchip 2 que resultaron en tiempos de residencia menores. Los promedios de las magnitudes de las pendientes bajo las cuatro condiciones (23 °C, 780 mbar; 23 °C, vacío; 55 °C, 780 mbar; y 55 °C, vacío) fueron 0.00003 +/- 0.001, 0.0004 +/- 0.0004, 0.002 +/- 0.0005 y 0.006 +/- 0.002, respectivamente. Se nota que la aplicación de vacío cuando se mantiene la temperatura a 23 °C aumenta ligeramente las magnitudes de las pendientes de disminución, pero las pendientes de las dos condiciones son menores al error de medición y no se puede concluir acerca del efecto de vacío a temperatura ambiente (Figura 33). Se

observó que el calentamiento es necesario para ver un cambio significativo en la disminución del tamaño de gotas, como se había notado en los experimentos en el microchip 1. Además se corroboró que la combinación de calentamiento y vacío tiene un efecto sinérgico y provoca el mayor cambio en la velocidad de evaporación (67 % mayor que calentamiento solo).

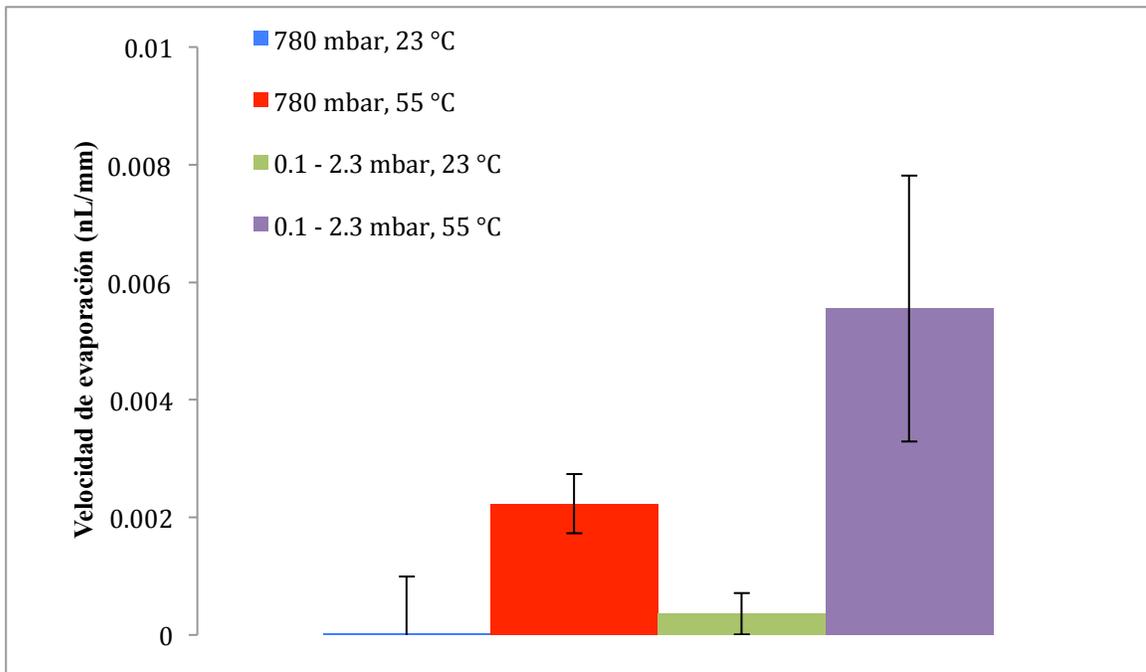


Figura 33. Promedios de las magnitudes de las pendientes de disminución (nL/mm) de gotas de metanol y agua (1:1 en volumen a inyección) bajo cuatro condiciones. Para los experimentos sin vacío se promediaron tres resultados. Se promediaron cinco resultados con vacío a temperatura ambiente y 15 con vacío a 55 °C. Sólo se promediaron las pendientes de experimentos donde el flujo de las dos fases se mantuvo en 120 $\mu\text{L}/\text{h}$. No se incluyeron experimentos con flujos distintos (30, 60 o 90 $\mu\text{L}/\text{h}$) ni con porcentajes iniciales de metanol distintos (menores a 50 % en volumen).

6.5 ENSAYO COLORIMÉTRICO DE METANOL

Para cuantificar el porcentaje final de metanol en las microgotas después de pasar por el serpentín del microchip 2, se realizó un ensayo colorimétrico. Este ensayo fue crucial para comprobar que se puede disminuir el porcentaje de metanol en las gotas en el microchip utilizado y mostrar que realmente se puede evaporar a diferentes velocidades los dos líquidos (metanol y agua).

El ensayo colorimétrico utiliza la enzima alcohol oxidasa y el reactivo MBTH para determinar la presencia de metanol y al ser muy sensible funciona solo en un rango pequeño de concentraciones. En el microchip se trabaja con concentraciones en el rango de 0 % a 50 % de metanol, y para cuantificar la concentración de metanol en las gotas saliendo del chip, se colectaron las gotas y se las diluyeron 2,000 veces. Para realizar la curva de calibración, las soluciones estándares (en el rango de 10 % - 30 % de metanol) se diluyeron 2,000 veces (Tabla 3). Para cuantificar el metanol en muestras con una concentración alrededor de 50 % de metanol, estas se diluyeron 4,000 veces, y se multiplicó por dos el resultado de la concentración.

Tabla 3. Concentraciones de los estándares de metanol. Las muestras se diluyeron 2000 veces.

% MeOH (% V)	Concentración (M)	Concentración diluida 1:2000 (mM)
10	2.47	1.23
15	3.70	1.85
20	4.94	2.47
25	6.17	3.09
30	7.41	3.70

La curva de calibración y algunas muestras representativas de gotas se muestran en la Figura 34. Se colectaron gotas saliendo del microchip 2 durante una hora bajo las siguientes condiciones: PDMS:agente entrecruzante = 10:1, flujo de las dos fases = 120 μ L/h, temperatura = 55 °C, presión = 3 mbar con una concentración inicial de 25 %

metanol. Después de colectar las gotas, se centrifugaron para romperlas. La mezcla de metanol y agua tiene menor densidad que el aceite FC-40 y cuando las dos fases se separaron, la fase acuosa quedó arriba. Se tomó una alícuota de esta mezcla para el ensayo colorimétrico. Como control, también se colectaron microgotas del mismo chip con el mismo flujo sin calentamiento a presión atmosférica y se trataron igual. Además se tomó una alícuota de la solución de metanol al 25 % en agua que estaba en la misma jeringa antes de ser inyectada al microchip para calcular la cantidad de metanol inicial exacta. Los resultados de absorbancia se interpolaron en la curva de calibración para calcular la cantidad de metanol en la mezcla inyectada en el microchip y en las microgotas colectadas después de pasar por el canal serpentin (Figura 34).

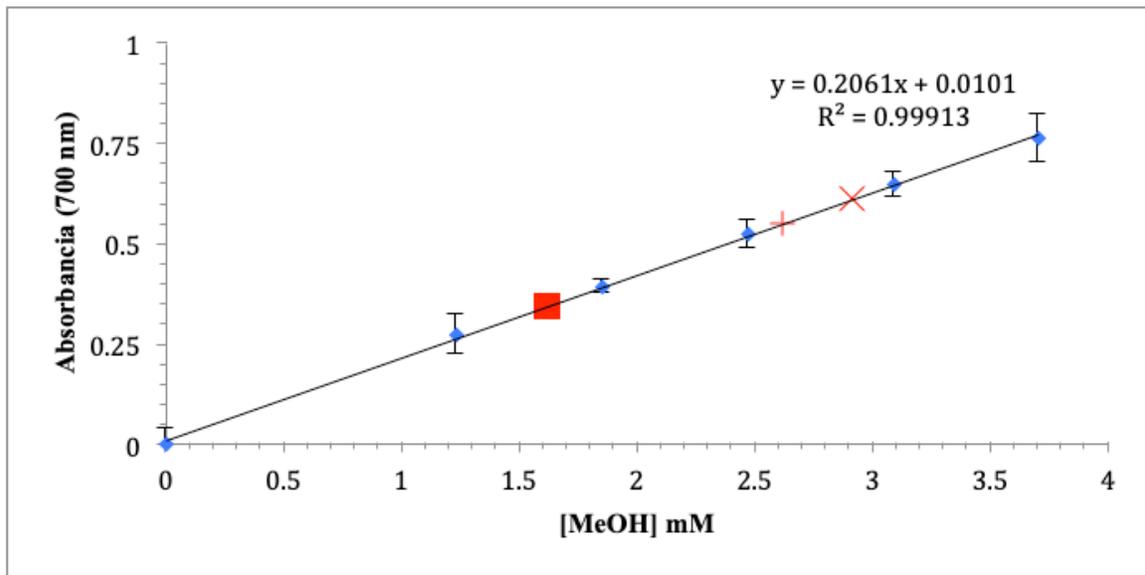


Figura 34. (♦) Curva de calibración de la concentración de metanol obtenida a partir de estándares. Cada punto muestra el promedio de tres repeticiones. Las barras de error representan una desviación estándar. (×) Muestra de la mezcla de metanol y agua en la jeringa antes de inyección al microchip. Se preparó a 25 % en volumen y se diluyó 2000 veces. La concentración calculada por la regresión lineal de la curva de calibración corresponde a 23.6 % antes de dilución. (+) Microgotas colectadas, centrifugadas y diluidas 2000 veces después de recorrer el serpentin del microchip 2 de extracción a temperatura ambiente y presión atmosférica. La concentración final corresponde a 21.2 % antes de dilución. (■) Gotas colectadas, centrifugadas y diluidas 2000 veces después de recorrer el serpentin del microchip 2 a 55 °C y 3 mbar. La concentración final corresponde a 13.1 % antes de dilución. Se utilizó 3 % de tensoactivo en la fase continua en el canal del microchip y se mantuvo el flujo de las dos fases en 120 $\mu\text{L/h}$.

En ausencia de calentamiento y vacío, la concentración de metanol en las microgotas disminuyó de 23.6 % a 21.2 %, y con calentamiento y vacío las microgotas salieron con 13.1 % metanol.

Se hicieron tres repeticiones del experimento partiendo de concentraciones iniciales de 50 % y 25 % de metanol, utilizando calentamiento y vacío (Figura 35). Los resultados muestran una disminución promedio del 45.5 +/- 4.5 % a 30.9 +/- 4.1 % en el primer caso y una disminución del 21.2 +/- 2.8 % a 12.5 +/- 2.2 %. Es decir un 32 % y 41 % de reducción respectivamente.

Se observó más desviación en las mediciones con 50 % inicial, probablemente por la volatilidad de la mezcla y la necesidad de diluirla dos veces más que las otras muestras.

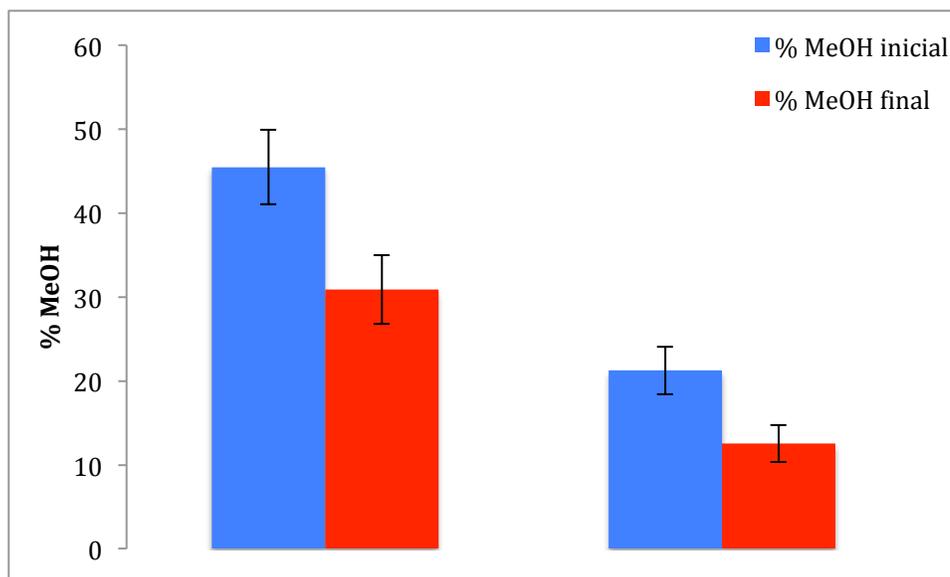


Figura 35. Porcentaje de metanol inicial y final con el flujo de las dos fases en 120 uL/h a 55 °C y 3 mbar con 3 % de tensoactivo en la fase continua. Se midió la cantidad de metanol inicial con una muestra de la solución inyectada al chip y se coleccionaron y se centrifugaron gotas en la salida del chip para medir la cantidad final. Se diluyó cada muestra 2000 veces, se calculó la concentración de las muestras interpolando en la curva de calibración, se multiplicó la concentración calculada por 2000 y se convirtió esa concentración a porcentaje. Se repitió la colección y medición tres veces con dos diferentes porcentajes iniciales de metanol.

Las concentraciones finales de metanol en microgotas en estos experimentos muestran que sería posible realizar ensayos con la neuraminidasa de *C. perfringens*, ya que esta enzima tiene actividad normal en hasta 40 % MeOH (Hernández Raya, 2012, Tesis Licenciatura UNAM). Sin embargo, para enzimas más sensibles que requieren un porcentaje menor de metanol, es probable que se podría lograr mayor disminución del % MeOH aumentando el tiempo de residencia de microgotas en el canal serpentin (alargando el canal o manejando un flujo menor dentro de él).

6.6 FUSIÓN DE MICROGOTAS PARA LA INTRODUCCIÓN DE LA ENZIMA (microchip 4)

Para introducir la enzima a las microgotas que salieron del microchip 2, es importante realizar fusión de microgotas (S) con un flujo acuoso de la enzima (E) introducido en el microchip 4 (Figura 36).

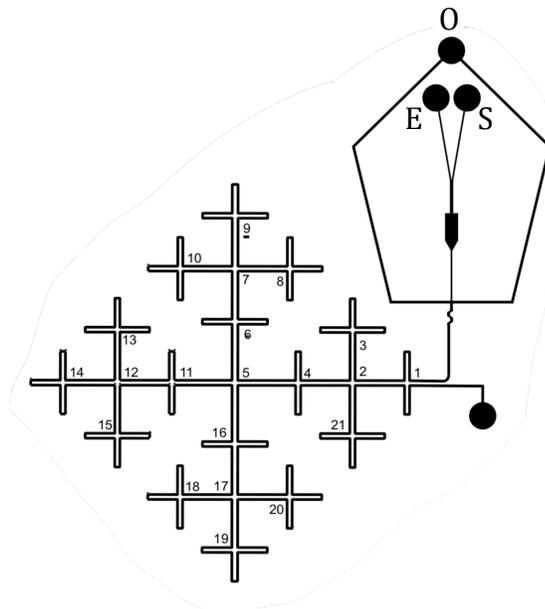


Figura 36. Diseño del microchip 4 para la introducción de la enzima (E), la fusión de microgotas que traen los extractos del HPLC junto con el sustrato (S) y la detección de la reacción enzimática. Tiene una entrada extra para aceite (O).

En una primera prueba, se formaron microgotas de agua pura y colorante azul en el microchip 2 con las mismas condiciones que los experimentos anteriores de disminución y se conectó la salida del serpentín con la entrada S en el microchip 4. Se inyectó un flujo de agua pura con colorante rojo en la entrada E a un flujo de 60 $\mu\text{L}/\text{h}$. En la entrada del aceite (O) se inyectó FC-40 sin tensoactivo a 100 $\mu\text{L}/\text{h}$. Un problema observado es que las microgotas de agua pura son más estables que las gotas de metanol y agua, y aunque en el microchip 2 se observan muchos eventos de fusión debido al calentamiento (55 °C), cuando llegan al microchip 4 regresan a temperatura ambiente y se convierten en gotas más estables. La Figura 37 muestra una imagen de gotas en el chip de fusión que no lograron fusionar.

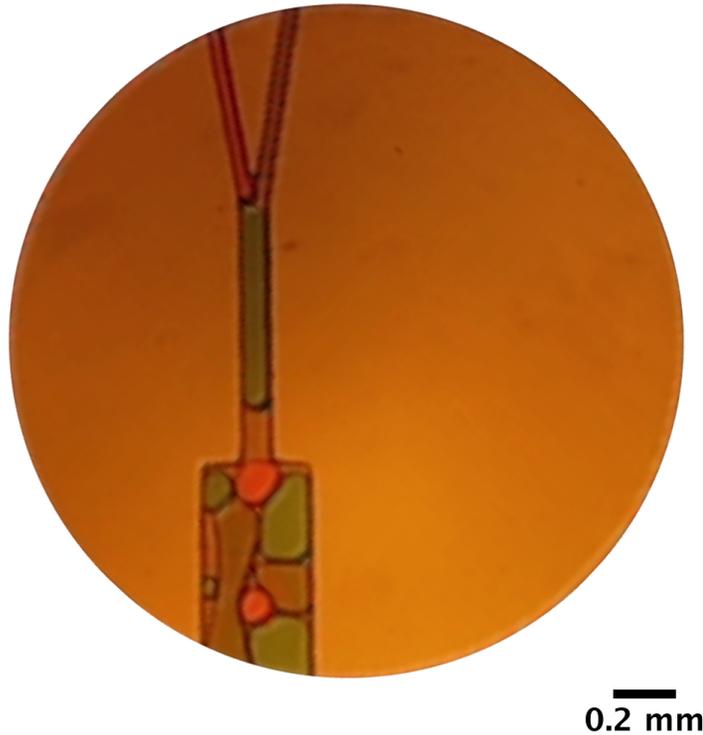


Figura 37. Microgotas de agua y colorante estables en el chip de fusión. Aunque las microgotas se llegan a fusionar al contacto en el microchip 2 debido a la temperatura de 55 °C, cuando llegan al microchip 4 (colocado sobre el microscopio Leica DMI3000 B a temperatura ambiente) se vuelven más estables. Gotas de pura agua o amortiguador de fosfatos no se fusionan con gran frecuencia con 3 % de tensoactivo en la fase continua.

formación de gotas, y por esta razón se bajó el flujo de la purga a 5500 $\mu\text{L/h}$. Se puede estimar el flujo del eluato del HPLC observando la relación entre el eluato transparente y el amortiguador con colorante en el canal antes de la formación de gotas (Figura 39A).

Con la salida del HPLC conectada al microchip 2 y la salida del microchip 2 conectada a la entrada S del microchip 4 se observó mayor fusión en el microchip 4 (Figura 39B). Cuando los pulsos de flujo provocado por las bombas del HPLC llegaron a los canales delgados del microchip 4, las paredes de los canales de entrada se mojaron (no había recubrimiento de aceite) y las gotas se rompieron y fusionaron en contacto con el flujo continuo de amortiguador en la entrada (E). En la unión de *flow focusing* del microchip 4, se formaron gotas de nuevo con un flujo introducido de FC-40 con 3 % de tensoactivo a 200 $\mu\text{L/h}$ (Figura 39C).

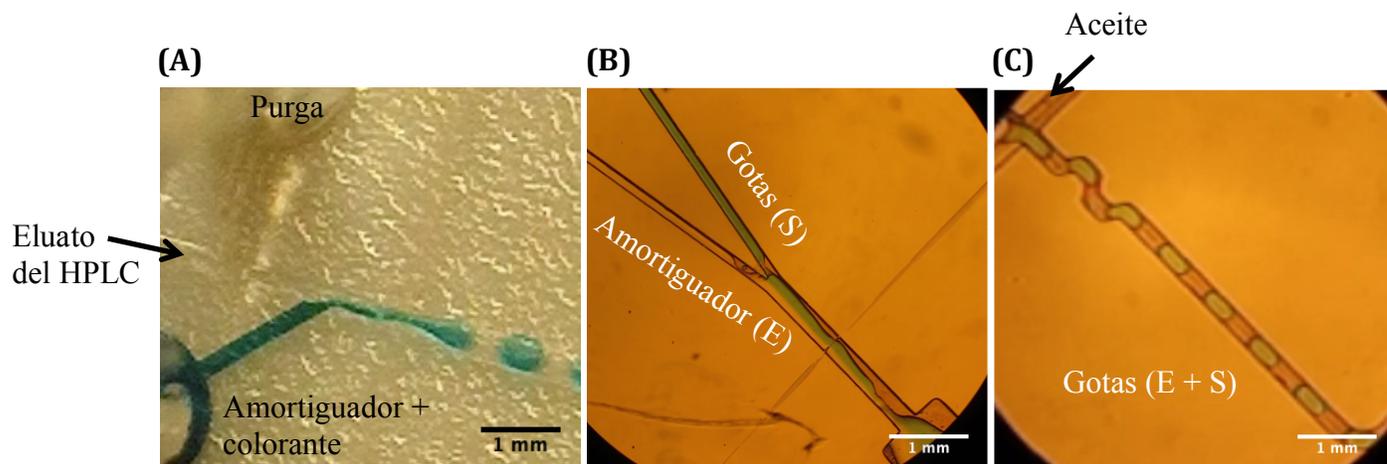


Figura 39. (A) Formación de microgotas en el microchip 2 con el HPLC conectado. Se conectó el HPLC con un gradiente de 10 % - 100 % MeOH, se programó la purga a 5500 $\mu\text{L/h}$ y se inyectó al microchip 2 el amortiguador de fosfatos con colorante azul en la entrada del sustrato a 60 $\mu\text{L/h}$. Se formaron gotas en el aceite FC-40 con 3 % de tensoactivo a 120 $\mu\text{L/h}$. Se calentó el microchip 2 a 55 $^{\circ}\text{C}$ y se conectó la bomba de vacío para lograr una presión de 0.16 mbar en el microchip. (B) Fusión de flujos y (C) re-formación de gotas en el microchip 4. Las gotas salieron del canal serpentin y se reintrodujeron en la entrada (S) del microchip 4. En la otra entrada de la fase acuosa (E), se inyectó el amortiguador de fosfatos a 100 $\mu\text{L/h}$ sin colorante (en lugar de la enzima). Al estar conectado el HPLC, las paredes de PDMS en la zona de fusión se mojaron y las gotas empezaron a fusionar con el flujo del amortiguador. Río abajo un flujo de 200 $\mu\text{L/h}$ del aceite FC-40 con 3 % tensoactivo corta el flujo acuoso para formar gotas de nuevo.

En los experimentos preliminares de fusión (Figura 37) se utilizó un flujo en la entrada (E) de 60 $\mu\text{L/h}$, pero al acoplar el HPLC y los dos microchips era necesario aumentar este flujo. Debido a los pulsos de flujo en el HPLC, a veces las gotas entrando al microchip 4 cortaron el flujo bajo (60 $\mu\text{L/h}$) en la entrada (E) y empezaron a salir por esa entrada, entrando en la tubería llena de amortiguador. Al aumentar el flujo en la entrada (E) a 120 $\mu\text{L/h}$ se resolvió el problema.

Se grabaron gotas en la primera mitad del microchip 2 acoplado al HPLC para medir la disminución del volumen con diferentes porcentajes de metanol en la columna (Figura 40). Se observó una alta variabilidad en el tamaño de las gotas con porcentajes altos de metanol debido a los pulsos de las bombas del HPLC. Sin embargo, las pendientes de disminución de volumen a las cuatro diferentes concentraciones de metanol probadas fueron comparables con las pendientes observadas en los experimentos de disminución sin el HPLC. El promedio de las pendientes de disminución en los experimentos sin HPLC con calentamiento y vacío en el microchip 2 fue -0.0056 ± 0.0023 nL/mm y con el HPLC y las mismas condiciones de presión y temperatura las pendientes variaron entre -0.0031 y -0.014 nL/mm.

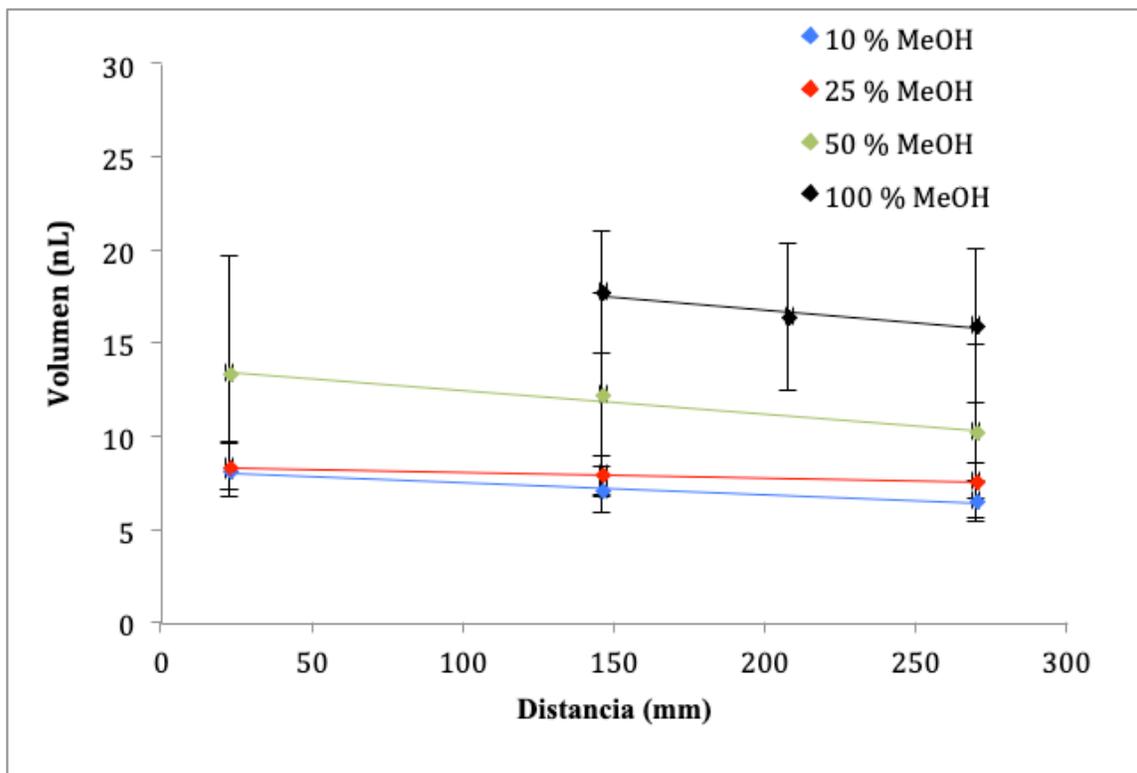


Figura 40. Disminución del volumen de microgotas con diferentes porcentajes de metanol generados con el HPLC conectado al microchip 2. Se muestra el promedio del volumen de 10 microgotas en tres puntos en la primera mitad del serpentín con cuatro diferentes flujos isocráticos en el HPLC (10 %, 25 %, 50 %, 100%) los cuales corresponden a un 5 %, 12.5 %, 25 % y 50 % en las microgotas después de la purga (5500 $\mu\text{L/h}$) y la inyección del amortiguador de fosfatos en la entrada del sustrato a 60 $\mu\text{L/h}$. Se grabaron videos de las microgotas para medición en la primera mitad del microchip y se dejó la cámara fija. Para el experimento con 100 % MeOH, los pulsos del HPLC a veces cortaron el flujo del amortiguador introdujeron metanol puro al serpentín. Las primeras curvas del serpentín se mojaron y las microgotas empezaron a formar río abajo de la unión de *flow focusing*, 150 mm después de entrar en el serpentín.

6.7 ENSAYOS EN MICROGOTAS (microchip 3)

El objetivo principal de este trabajo es la extracción del metanol de las microgotas, pero también se obtuvieron algunos resultados de la funcionabilidad de la plataforma para proyectos futuros.

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se ha probado y caracterizado el uso de un microchip con un patrón fractal (microchip 3, Figura 41) para la detección de reacciones enzimáticas, y se ha mostrado la funcionabilidad de ensayos de inhibición en este chip con la neuraminidasa de *C. perfringens* dentro microgotas con el inhibidor comercial zanamivir después de pasar por la columna del HPLC con un flujo isocrático de 15 % metanol en agua (Ochoa et al., 2017). Es posible que un gradiente creciente de metanol en el HPLC complique la formación de microgotas y aumente el ruido en la señal de la reacción.

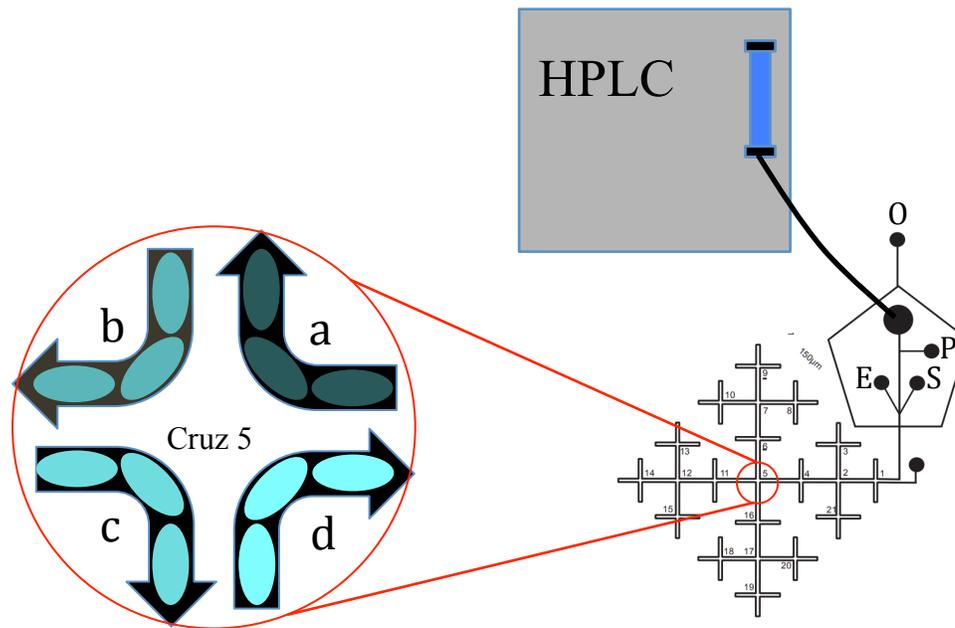


Figura 41. Esquema del microchip 3. El eluato del HPLC entra al chip, y la purga (P, 5940 $\mu\text{L/h}$) baja su flujo de 6000 $\mu\text{L/h}$ a 60 $\mu\text{L/h}$. El eluato se mezcla con flujos conteniendo la enzima (E) y su sustrato (S) en 60 $\mu\text{L/h}$ cada uno, y se forman microgotas acuosas en aceite cuando llegan a tener contacto con la fase oleosa introducida en la entrada (O). Se detecta la fluorescencia del producto de la reacción en las microgotas. Las microgotas llegan a las cuatro curvas de la cruz central (cruz 5) en 7 s (a), 19 s (b), 31 s (c) y 43 s (d).

Con el proceso de pervaporación (microchip 2) no es posible eliminar 100 % del metanol de las microgotas, y era útil comprobar que los cambios afectados por un gradiente no interferiría demasiado con los resultados de detección. En este trabajo, para probar el efecto del gradiente de metanol en los resultados de los ensayos, se realizó el ensayo de inhibición en el microchip 3 con zanamivir eluido de la columna con un gradiente de metanol 10 % - 50 % en 10 min. En estos experimentos se conectó la salida del HPLC directamente la entrada del microchip 3 con el flujo de la purga en 5940 $\mu\text{L/h}$.

El flujo del eluato del HPLC (60 $\mu\text{L/h}$ después de la purga) se mezcló con flujos que contenían la enzima y su sustrato en 60 $\mu\text{L/h}$ cada uno. Se formaron microgotas acuosas con el eluato, la enzima y el sustrato en aceite HFE 7500 con un flujo de 250 $\mu\text{L/h}$. Una vez que se formaron las microgotas los reactivos empezaron a mezclarse rápidamente y la reacción empezó. Las microgotas entraron al canal fractal y la reacción ocurrió a lo largo del canal. Se detectó la acumulación del producto de la reacción por su fluorescencia.

Se grabó la procesión de gotas en la cruz 5 del fractal del microchip 3 (Figura 42). La cruz 5 muestra los cuatro tiempos de residencia con más distancia entre ellos. Las curvas de esta cruz representan los (a) 7, (b) 19, (c) 31 y (d) 43 s de residencia en el microchip con los flujos del HPLC, sustrato, enzima y aceite HFE 7500 en 60 $\mu\text{L/h}$, 60 $\mu\text{L/h}$, 60 $\mu\text{L/h}$ y 250 $\mu\text{L/h}$ en ese orden. Los tiempos de residencia de las gotas correspondan a los tiempos de la reacción, ya que la reacción empieza cuando las gotas se forman. Se obtuvieron dos videos de miles de gotas pasando la cruz 5 durante 10 min. El primer video fue un control en el que las gotas contenían el sustrato, la enzima y el gradiente (10 % - 50 % MeOH) saliendo del HPLC sin ningún analito. Los resultados de este control se muestran en la Figura 42A donde cada punto experimental representa la intensidad de fluorescencia de una microgota pasando una de las curvas de la cruz 5 (a, b, c, d). La fluorescencia corresponde al tiempo de reacción y aumentó en cada curva. El gradiente del HPLC introdujo ruido a la detección de la reacción. Debido a los pulsos de las bombas del HPLC y el cambio de viscosidad de la mezcla con el gradiente, la relación eluato/sustrato/enzima cambió ligeramente con el tiempo. Estos cambios provocaron una

fluctuación en la señal de fluorescencia de las microgotas con los mismos tiempos de residencia en el canal (tiempo de reacción) como función del tiempo del gradiente.

El segundo video fue el control positivo con el inhibidor comercial zanamivir (Relenza®) eluido del HPLC con el mismo gradiente. Se analizaron los videos para sacar los máximos de fluorescencia durante los 10 min (Figura 42B). Aunque el acoplamiento del HPLC con el gradiente introdujo ruido, la inyección de zanamivir en las microgotas grabadas en el intervalo de 1.5 a 3.5 min claramente inhibió la actividad enzimática, lo que se refleja en una disminución de la fluorescencia fuera de las fluctuaciones normales de fluorescencia ocasionadas por el gradiente. El cromatograma de zanamivir saliendo de la columna del HPLC se muestra en la Figura 43. El perfil de elución de zanamivir coincide con el perfil de inhibición de la actividad enzimática (disminución de fluorescencia).

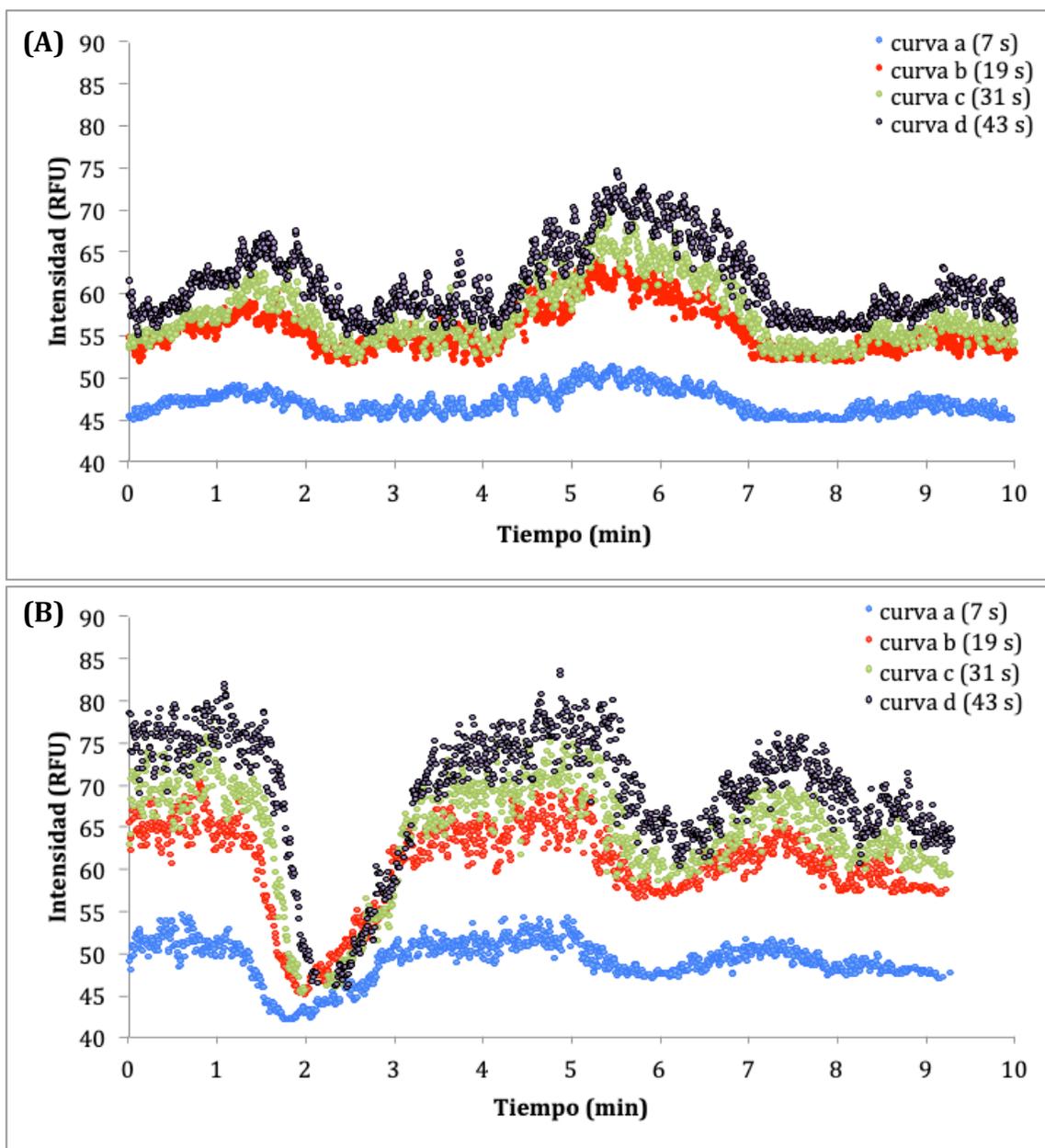


Figura 42. Intensidad de fluorescencia en las microgotas con un gradiente de metanol 10 % - 50 % grabadas en las cuatro curvas del centro del microchip 3 durante 10 min. (A) Microgotas sin inhibidores y (B) microgotas con zanamivir a 20 mg/mL inyectado al HPLC. Las microgotas grabadas entre 1.5 y 3.5 min son las que contienen zanamivir. El eje x representa los min del video

Los tiempos de residencia teóricas se calcularon en un trabajo previo (Ochoa et al., 2017) utilizando la velocidad de las gotas y las medidas del canal. Para comprobar estos tiempos, en este trabajo se revisaron los tiempos de los mínimos de intensidad de fluorescencia durante el experimento con zanamivir (que ocurrieron cuando la microgota con mayor concentración de zanamivir llegó a las cuatro curvas de la cruz central) y se

observó que los mínimos de cada curva salieron con un promedio de 12.4 +/- 1.8 s entre ellos (Figura 42B). Esta medición coincide con los tiempos teóricos calculados previamente (12 s entre las curvas). Por simplicidad se utilizaron los tiempos de residencia teóricos en las gráficas.

El zanamivir no es un buen inhibidor de las neuraminidasas bacterianas (Richter et al., 2015) ya que muestra un constante de inhibición (K_i) de 1.8 +/- 0.1 mM con la neuraminidasa de *C. perfringens* (Ochoa et al., 2017). La posibilidad de mostrar inhibición con un inhibidor débil aún con el ruido que introduce el gradiente muestra la funcionabilidad de los ensayos acoplados al HPLC en este sistema.

Entre el HPLC y el microchip hay un tiempo de retraso en que los compuestos saliendo de la columna llegan a las curvas de interés. En dos experimentos el pico de inhibición por zanamivir en la curva “d” de la cruz 5 salió 90 s después de su inyección en la columna del HPLC (Figura 43, 44). El hecho de que los tiempos de inhibición coinciden es un buen indicador de la reproducibilidad del ensayo y la posibilidad de identificar picos de interés en ensayos con productos naturales en el futuro.

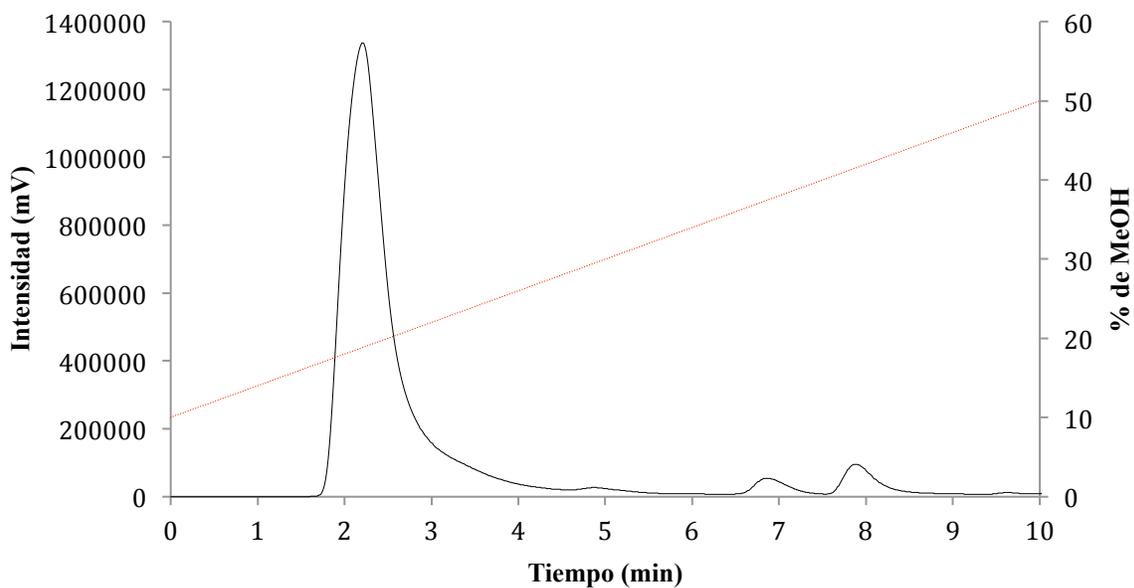


Figura 43. Cromatograma de zanamivir a 270 nm (línea negra) y el gradiente de metanol (roja).

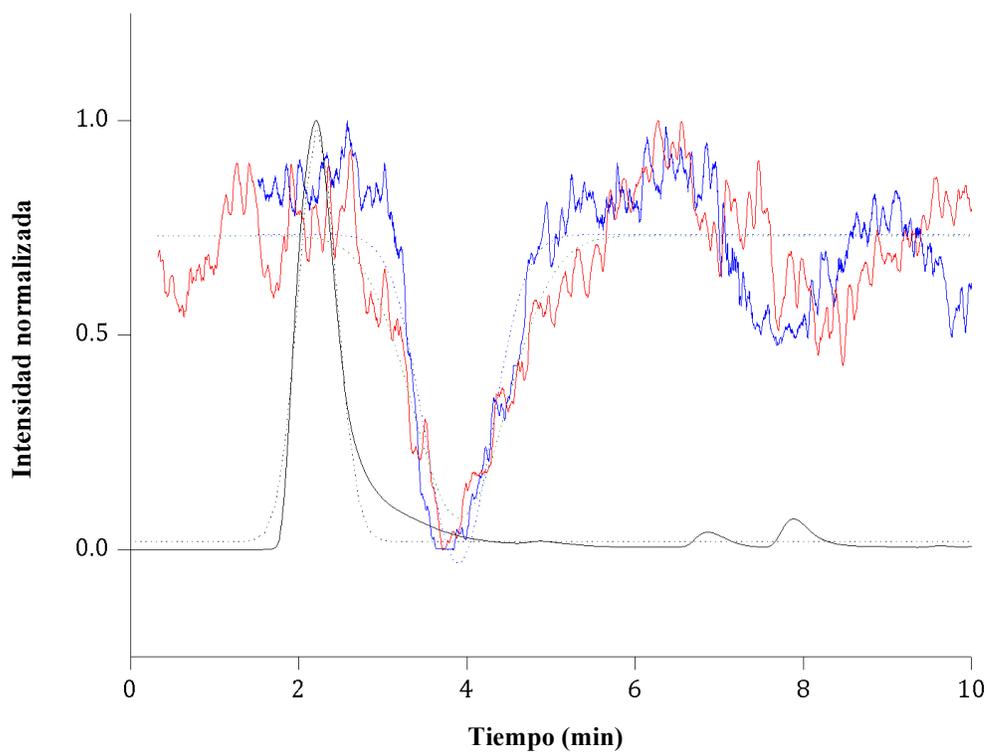


Figura 44. El pico de zanamivir en el HPLC (línea negra), y la señal de fluorescencia en la curva “d” de la cruz 5 (línea azul y línea roja) de dos experimentos independientes. Las líneas de puntos representan el ajuste gaussiano de cada pico.

6.8 ENSAYOS EN MICROGOTAS (microchip 4)

Después de realizar con éxito los ensayos enzimáticos con un gradiente de metanol, se realizó una prueba de todo el sistema completo para detectar la actividad enzimática en el microchip 4 acoplado al microchip 2 de extracción y el HPLC (Figura 45). Se utilizó un gradiente en el HPLC de 10 % - 50 % MeOH en 5 min, y no se inyectó ningún inhibidor al HPLC.

Se formaron gotas del eluato del HPLC y el sustrato 4-MUNANA (300 μM) en el microchip 2 con el flujo de la purga en 5500 $\mu\text{L/h}$, el flujo de inyección del sustrato a 60 $\mu\text{L/h}$ y el flujo del FC-40 con 3 % tensoactivo en 120 μL . Se conectó la salida del microchip 2 a la entrada para el sustrato del microchip 4. Se inyectó la enzima de *C. perfringens* (2 U/ μL) en el microchip 4 a 120 $\mu\text{L/h}$ y se separaron las gotas fusionadas conteniendo la enzima y el sustrato con un flujo del aceite FC-40 con 3 % tensoactivo a 200 $\mu\text{L/h}$.

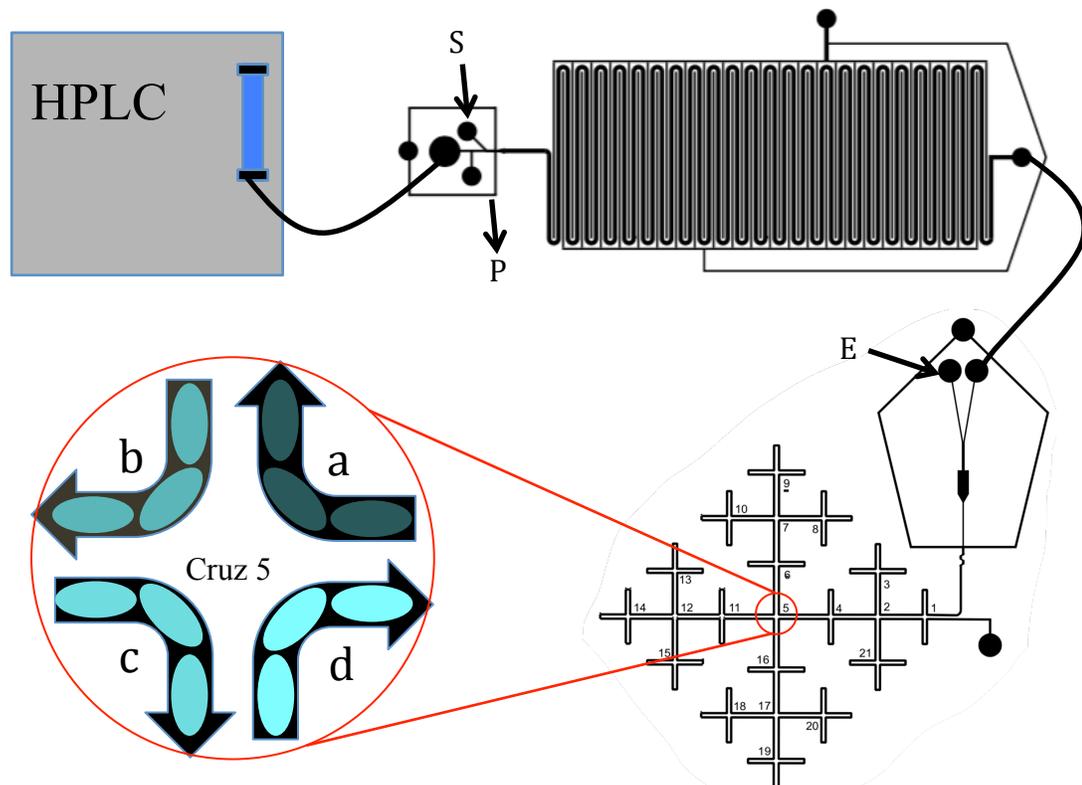


Figura 45. Acoplamiento del sistema completo para detección de la reacción enzimática. Salida de la purga (P), Entrada del sustrato (S), Entrada de la enzima (E).

Se grabó la procesión de gotas en la cruz 5 del fractal del microchip 4 (Figura 46). El acoplamiento de los dos microchips aumentó la presión en el sistema que aumentó el efecto provocado por las fluctuaciones de las bombas del HPLC. Con el canal microfluídico más largo, la presión en el canal aumenta, lo que afecta el comportamiento de los fluidos con la purga y el efecto de los pulsos del HPLC. Esto provocó que llegaron secciones de gotas al microchip 4 con muy poco sustrato y otras con poco eluato del HPLC. No se logró obtener una clara distinción entre las intensidades de fluorescencia de los cuatro tiempos de reacción como en la Figura 42, pero se puede ver un aumento de la intensidad promedio con tiempo, lo que indica que los reactivos se mezclaron y la reacción ocurrió. Aunque falta mucha optimización en el acoplamiento del sistema nuevo con los dos microchips y de las concentraciones de reactivos, creo que es un reto alcanzable para seguir reacciones enzimáticas después de la pervaporación en línea de metanol.

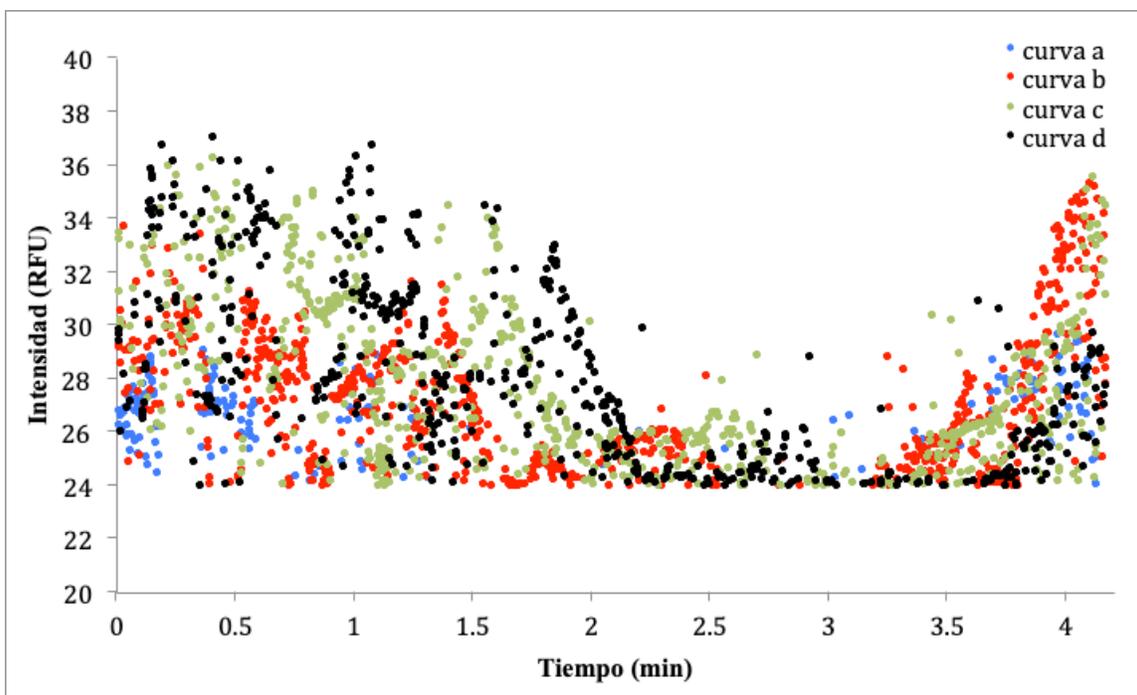


Figura 46. Intensidad de fluorescencia en las gotas con el gradiente de metanol 10 % - 50 % en las cuatro curvas durante 5 min sin inhibidores. El eje representa el tiempo total del video. Las cuatro curvas representan cuatro distintos tiempos de reacción. Se puede observar que la intensidad de fluorescencia de los datos negros (curva “d”) son más grandes que los azules o rojos (curvas “a” y “b”)

7. CONCLUSIONES

Se demostró que se puede utilizar la pervaporación, promovida por calentamiento y presión de vacío, para extraer metanol de microgotas en aceite fluorinado FC-40 que contienen mezclas de metanol y agua a través de una membrana de PDMS.

Para microgotas de 50 % metanol en agua (formadas en el aceite FC-40 con 3 % tensoactivo con el flujo de las dos fases en 120 $\mu\text{L}/\text{h}$ cada fase) la velocidad de reducción del volumen de gotas a temperatura ambiente y presión atmosférica es despreciable, y la aplicación de vacío a temperatura ambiente no produce un aumento significativo en esa velocidad. El aumento de la temperatura de 23 °C a 55 °C tiene mucho mayor efecto que la disminución de presión a temperatura ambiente (400 %). Pero hay un efecto sinérgico al juntar los dos factores, y el promedio de la velocidad de evaporación es 200 % mayor con un aumento de la temperatura a 55 °C y aplicación de vacío que con sólo calentamiento.

La reducción promedio de 45.5 +/- 4.5 % a 30.9 +/- 4.1 % y de 21.2 +/- 2.8 % a 12.5 +/- 2.2 % MeOH en las microgotas es un resultado prometedor para el acoplamiento del HPLC y la realización de ensayos enzimáticos en línea con compuestos separados por HPLC. Es probable que un aumento del tiempo de residencia de microgotas en el microcanal de pervaporación aumente la reducción del porcentaje de metanol.

Se logró realizar ensayos enzimáticos con microgotas utilizando la neuraminidasa de *C. perfringens* en un microchip acoplado a un equipo de HPLC con un gradiente de 10 % - 50 % MeOH y se logró realizar ensayos de inhibición con el zanamivir. A pesar de que el acoplamiento del HPLC y su gradiente introduce ruido, en este trabajo se logró mostrar claramente la inhibición de la neuraminidasa de *C. perfringens* con zanamivir, lo que es un buen indicador de la sensibilidad del método.

8. PERSPECTIVAS

El método de extracción reportado en este trabajo se podría utilizar para probar la actividad inhibitoria de compuestos orgánicos como la hierbabuena (Figura 47) separados con un gradiente de 10 % - 100 % MeOH con la neuraminidasa de *C. perfringens*.

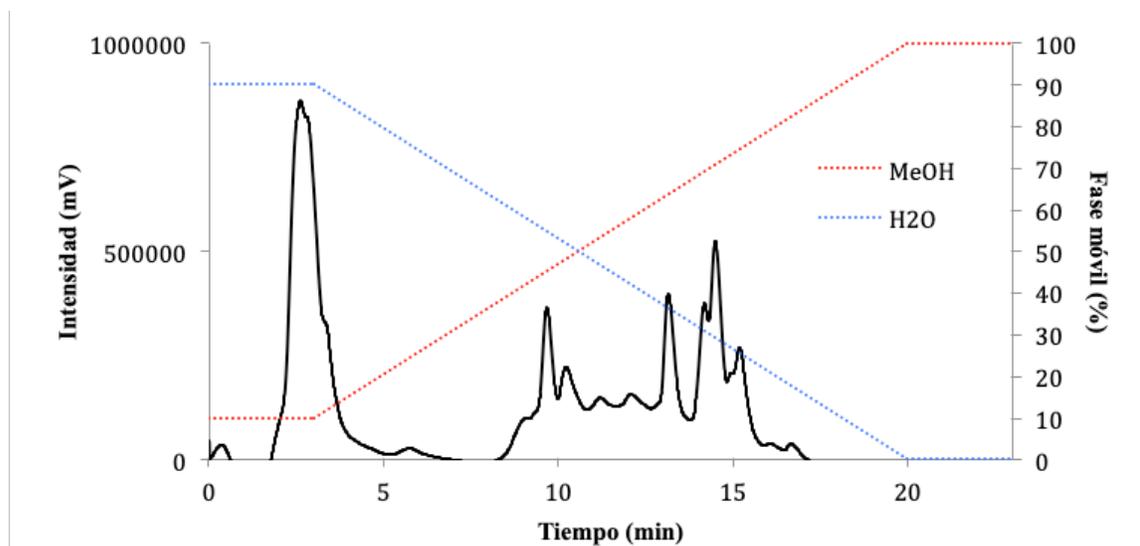


Figura 47. Cromatograma de hierbabuena (*Mentha x piperita*) separado con un gradiente de 10 % a 100 % MeOH. Separación realizada por Laura Cuevas Lomas (resultados no publicados)

Para enzimas más sensibles al metanol, el método descrito en este trabajo aumenta el rango de concentraciones de metanol que se puede utilizar para separar compuestos y el rango de compuestos que se puede probar, aunque para enzimas muy sensibles se tendría que utilizar un gradiente menos extremo, como el que se utilizó para la separación de té de tila (*T. lineata*) en la Figura 48.

Uno de los mayores retos para el acoplamiento del HPLC a la plataforma microfluídica es la regulación y el manejo del flujo del eluato del HPLC en canales microfluídicos, porque se requiere disminuir en un 99 % el flujo de 6000 a 60 $\mu\text{l/h}$.

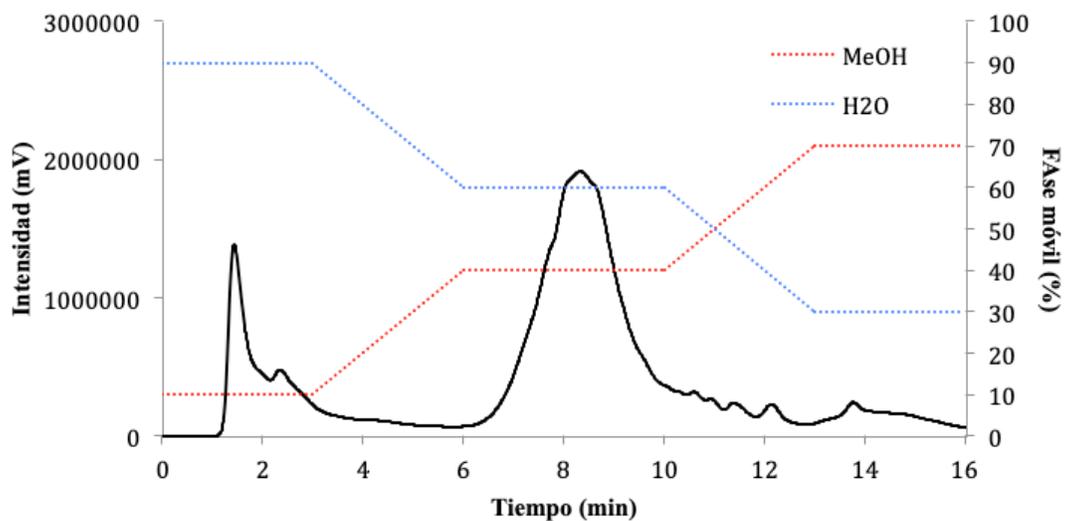


Figura 48. Cromatograma de Tila (*Ternstroemia lineata*) separado con una serie de gradientes con porcentaje final de MeOH a 70 %. Separación realizada por Laura Cuevas Lomas (resultados no publicados)

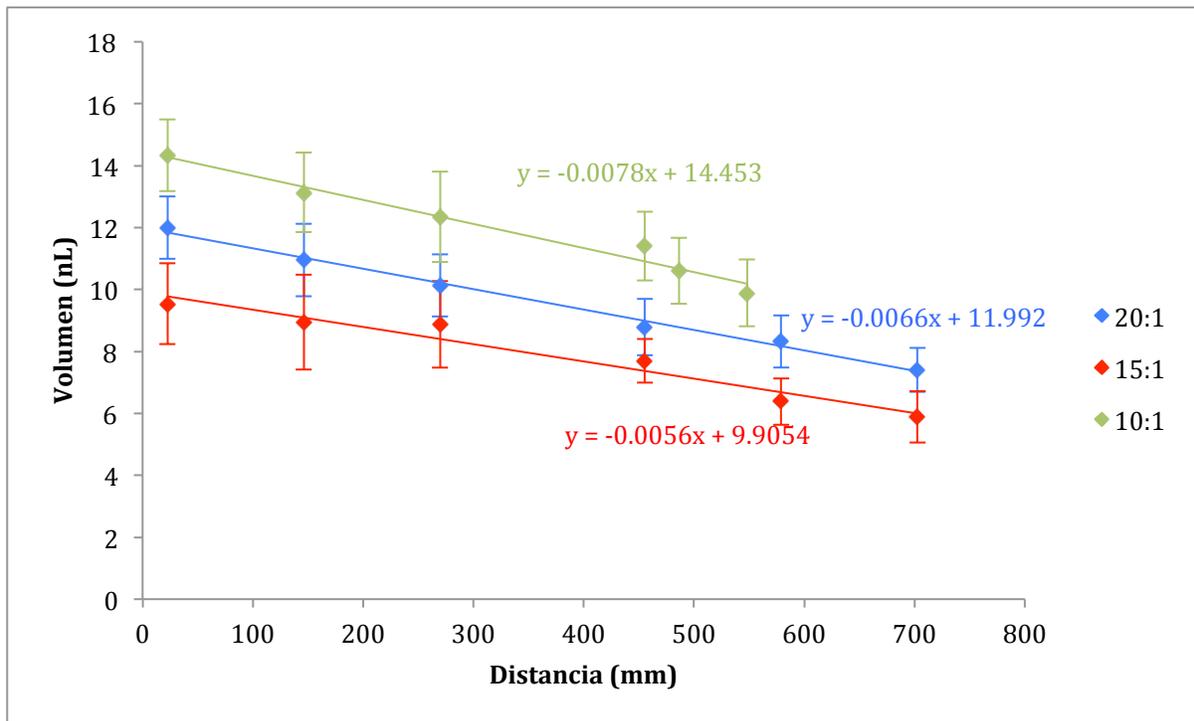
Una alternativa sería utilizar equipos de *Ultra-Performance Liquid Chromotography* (UPLC) en donde se manejan flujos muy bajos que son compatibles con la microfluídica. El método de extracción propuesto podría ser muy útil para grupos de investigación que trabajan con ensayos biológicos en sistemas microfluídicos acoplados a un equipo UPLC.

Sin embargo, el acoplamiento del HPLC sigue siendo un reto importante, porque el HPLC tradicional es un equipo más común y accesible.

9. ANEXO

9.1

Anexo 1. Pendientes de disminución de gotas de 50 % MeOH y H₂O en el aceite FC-40 con 3 % tensoactivo variando la relación entre la base de PDMS y el agente entrecruzante en la membrana de PDMS.



9.2

Anexo 2. Pendientes de disminución de gotas de 50 % MeOH y H₂O en el aceite FC-40 bajo varias condiciones.

Temperatura C	% Tensoactivo	Presión (mbar)	PDMS:agente entrecruzante	pendiente de disminución
55	0.1	0.14	10:01	-0.0107
55	0.1	0.3	10:01	-0.0076
55	0.5	2.3	10:01	-0.0055
55	0.5	0.16	10:01	-0.0065
55	1.5	0.16	10:01	-0.0064
55	1.55	0.16	10:01	-0.0074
55	1.55	0.26	10:01	-0.0061
55	3	0.16	10:01	-0.0067
23	3	780	20:01	0.001
23	3	1.7	20:01	0.0007
55	3	780	20:01	-0.0027
55	3	1.7	20:01	-0.0066
55	3	1.7	15:01	-0.0056
55	3	1.7	10:01	-0.0078
55	5	0.32	10:01	-0.0035
55	5	0.32	15:01	-0.0045
55	5	0.32	20:01	-0.0052
23	5	780	10:01	-0.0009
23	5	2.3	10:01	-0.00009
23	5	0.1	10:01	0.0001
23	5	780	15:01	-0.0002
23	5	2.3	15:01	0.0007
23	5	0.1	15:01	0.0004
55	5	780	10:01	-0.0023
55	5	2.3	10:01	-0.0028
55	5	0.1	10:01	-0.0025
55	5	780	15:01	-0.0017
55	5	2.3	15:01	-0.0026
55	5	0.1	15:01	-0.002

10. REFERENCIAS

- Abate, A. R.; Hung, T.; Mary, P.; Agresti, J. J.; Weitz, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2010**, *107*(45), 19163-6.
- Anthon, G. E.; Barrett, D. M. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3749-53.
- Bajpayee, A.; Edd, J. F.; Chang, A.; Toner, M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*(4), 1288-91.
- Bakhshi, A.; Mohammadi, T.; Nik, O. G.; Aroujalian, A. *Membr. Tech.* **2006**, *2006*(11), 7-9.
- Basilio, P. A.; Torres Rojas, A. M.; Corvera Poiré, E.; Olguín, L. F. *Microfluid. Nanofluidics*. **2019**, *23*.
- Clausell-Thomas, J.; Griffiths, A. D.; Merten, C. A. *Lab Chip*. **2010**, *10*, 1302-7.
- Courtois, F.; Olguin, L. F.; Whyte, G.; Theberge, A. B.; Huck, W. T. S.; Hollfelder, F.; Abell, C. *Anal. Chem.* **2009**, *81*(8), 3008-16.
- DeJournette, C. J.; Kim, J.; Medlen, H.; Li, X.; Vincent, L. J.; Easley, C. J. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10556-64.
- Eslami, F.; Elliot, J. A. W. *J. Phys. Chem. B*. **2013**, *117*, 2205-14.
- Ferretti, F.; Gallo, E.; Ragaini, F. *Chem. Cat. Chem.* **2015**, *7*, 2241-47.
- Gladysz, J. A.; Jurisch, M. Structural, Physical, and Chemical Properties of Fluorous Compounds. In: Horváth I. (eds) *Fluorous Chemistry. Topics in Current Chemistry*, **2011**, *308*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Gnyawali, V.; Moon, B.; Kieda, J.; Karshafian, R.; Kolios, M. C.; Tsai, S. S. H. *Soft Matter*. **2017**, *13*, 4011-16.
- Gruner, P.; Riechers, B.; Chacón Orellana, L. A.; Brosseau, Q.; Maes, F.; Beneyton, T.; Pekin, D.; Baret, J. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2015**, *20*(3), 183-91.
- Gu, H.; Duits, M. H. G.; Mugele, F. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2572-97.
- He, M.; Sun, C.; Chiu, D. T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1222-27.
- Heus, F.; Giera, M.; de Kloe, G. E.; van Iperen, D.; Buijs, J.; Nahar, T. T.; Smit, A. B.; Lingeman, H.; de Esch, I. J. P.; Niessen, W. M. A.; Irth, H.; Kool, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*(7-8), 3023-32.

Hernández Raya, S. Desarrollo de un ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad enzimática de la neuraminidasa de clostridium perfringens, usando 2-o-(p-nitrofenil)-alfa-d-n-ácido acetilneuramínico. Tesis, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, Ciudad de México, 2012.

Holtze, C.; Rowat, A. C.; Agresti, J. J.; Hutchison, J. B.; Angile, F. E.; Schmitz, C. H. J.; Koster, S.; Duan, H.; Humphry, K. J.; Scanga, R. A.; Johnson, J. S.; Pisignano, D.; Weitz, D. A. *Lab Chip*. **2008**, *8*, 1632-39.

Jeffries, G. D. M.; Kuo, J. S.; Chiu, D. T. *J. Phys. Chem. B*. **2007**, *111*(11), 2806-12.

Ji, J.; Nie, L.; Li, Y.; Yang, P.; Liu, B. *Anal. Chem*. **2013**, *85*, 9617-22.

Kaminski, T. S.; Garstecki, P. *Chem. Soc. Rev*. **2017**, *46*, 6210-26

Kim, J. H.; Resende, R.; Wennekes, T.; Chen, H. M.; Bance, N.; Buchini, S.; Watts, A. G.; Pilling, P.; Streltsov, V. A.; Petric, M.; Liggins, R.; Barrett, S.; McKimm-Breschkin, J. L.; Niikura, M.; Withers, S. G. *Science*. **2013**, *340*(6128), 71-5.

Lamberti, A.; Marasso, S. L.; Cocuzza, M. *RSC Adv*. **2014**, *4*, 61415-19.

Langedijk, J. P. M.; Daus, F. J.; van Oirschot, J. T. *J. Virol*. **1997**, *71*(8), 6155-67.

Lee, Y.; Youn, H.; Lee, J.; An, J. Y.; Park, K. R.; Kang, J. Y.; Ryu, Y. B.; Jin, M. S.; Park, K. H.; Eom, S. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2017**, *486*(2), 470-5.

Li, L.; Boedicker, J. Q.; Ismagliov, R. F. *Anal. Chem*. **2007**, *79*, 2756-61.

Liu, G.; Hung, W. S.; Shen, J.; Li, Q.; Huang, Y. H.; Jin, W.; Lee, K. R.; Lai, J. Y. *J. Mater. Chem. A*. **2015**, *3*, 4510-21.

Mazutis, L.; Baret, J.; Griffiths, A. D. *Lab Chip*. **2009**, *9*, 2665-72.

Mazutis, L.; Gilbert, J.; Ung, W. L.; Weitz, D. A.; Griffiths, A. D.; Heyman, J. A. *Nature Protocols*. **2013**, *8*(5), 870-91

Mary, P.; Struder, V.; Tabeling, P. *Anal. Chem*. **2008**, *80*(8), 2680-7.

Mixa, A.; Staudt, C. *Int. J. Chem. Eng*. **2008**, 1-12.

Mohammadi, T.; Aroujalian, A.; Bakhshi, A. *Chem. Eng. Sci*. **2005**, *60*(7), 1875-80.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod*. **2016**, *79*(3), 629-61.

Newstead, S. L.; Potter, J. A.; Wilson, J. C.; Xu, G.; Chien, C. H.; Watts, A. G.; Withers, S. G.; Taylor, G. L. *J. Biol. Chem*. **2008**, *283*, 9080-8.

Ochoa, A.; Álvarez-Bohórquez, E.; Castellero, E.; Olguin, L. F. *Anal. Chem*. **2017**, *89*(9), 4889-96.

- Ochoa, A. Identificación de inhibidores de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens* en un dispositivo de microfluídica asociado a un equipo de HPLC. Tesis, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, Ciudad de México, 2016.
- Potterat, O.; Hamburger, M. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 546.
- Price, A. K.; Paegel, B. M. *Anal. Chem.* **2016**, *88*(1), 339-53.
- Rahman, M. T.; Rebrov, E. V. *Processes.* **2014**, *2*(2), 466-93.
- Santos, E. C. D.; Ładosz, A.; Maggioni, G. M.; Rohr, P. R. V.; Mazzotti, M. *Chem. Eng. Res. Des.* **2018**, *138*, 444-57.
- Shembekar, N.; Chaipan, C.; Utharala, R.; Merten, C. A. *Lab Chip.* **2016**, *16*, 1314-31.
- Shim, J.; Patil, S. N.; Hodgkinson, J. T.; Bowden, S. D.; Spring, D. R.; Welch, M.; Huck, W. T. S.; Hollfelder, F.; Abell, C. *Lab Chip.* **2011**, *11*(6), 1132-7.
- Song, H.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. *Angewandte Chemie International Edition.* **2003**, *42*(7), 768-72.
- Soong, G.; Muir, A.; Gomez, M. I.; Waks, J.; Reddy, B.; Planet, P.; Singh, P. K.; Kanetko, Y.; Wolfgang, M. C.; Hsiao, Y.; Tong, L.; Prince, A. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*(8), 2297-305.
- Taylor, G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*(6), 830-7.
- Theberge, A. B.; Whyte, G.; Huck, T. S. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3449-53.
- Thompson, J. W.; Kaiser, T. J.; Jorgenson, J. W. *J. Chromatogr. A.* **2006**, *1134*, 201-209.
- Toepke, M. W.; Beebe, D. J. *Lab Chip.* **2006**, *6*, 1484-6.
- Villegas, M.; Castro, E. F.; Gottifredi, J. C. *Chem. Eng. Res. Des.* **2015**, *94*, 254-65.
- von Itzstein. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*(12), 967-74.
- Wu, J.; Zhang, M.; Li, X.; Wen, W. *Anal. Chem.*, **2012**, *84*(22), 9689-93.
- Wu, T.; Hirata, K.; Sukuki, H.; Xiang, R.; Tang, Z.; Yomo, T. *Appl. Phys. Lett.* **2012**, *101*, 074108.
- Xu, C.; Xie, T. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, *56*(27), 7593-622.
- Xu, L.; Lee, H.; Jetta, D.; Oh, K. W. *Lab Chip.* **2015**, *15*, 3962-79.
- Zeitoun, R. I.; Goudie, M. J.; Zwier, J.; Mahawilli, D.; Burns, M. A. *Lab Chip.* **2011**, *11*, 4022-8.