



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE LA ENZIMA NEURAMINIDASA
DE *Clostridium perfringens* EN UN DISPOSITIVO DE
MICROFLUÍDICA ASOCIADO A UN EQUIPO DE HPLC**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO**

PRESENTA

ABRAHAM OCHOA GUERRERO



CD. DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres**

VOCAL: **Profesor: Ernesto Carrillo Nava**

SECRETARIO: **Profesor: Luis Fernando Olguín Contreras**

1er. SUPLENTE: **Profesor: David Turcio Ortega**

2° SUPLENTE: **Profesor: José Enrique Barquera Lozada**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 309, BIOFISICOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

SUSTENTANTE:

Abraham Ochoa Guerrero

Agradecimientos.

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

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

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

Agradezco a Dr. Luis Olguín por todo lo que me ha brindado, confianza, consejos, tiempo, sabiduría y paciencia entre muchas otras. Le agradezco la dedicación que presto para poder desarrollar todo este trabajo y toda la ayuda que recibí de su parte para poder hacerlo.

A mis padres por estar siempre ahí, por ser todo eso que son para mí y hacer hasta lo imposible para apoyarme en el camino que me han dejado elegir tan libremente desde siempre. Por todo lo que me han dado, que me ha permitido llegar a este momento. Agradezco a mis hermanos por su tolerancia y compañía que me ayudo a salir de momentos complicados y seguir adelante.

A mi gran amigo Armando, por la paciencia, consejos, risas, pizzas, chelas, etc. que compartimos durante todo este tiempo y que sin duda han hecho de mi estancia en el laboratorio y la facultad algo muy agradable.

Y todos aquellos amigos que han estado a mi lado dándome consejos, soportándome en algunos casos, escuchándome, acompañándome y haciendo de esto algo tan inolvidable, a todos ellos y ellas muchas gracias.

Contenido

1	Introducción.....	1
1.1	Planteamiento del Problema	2
1.2	Objetivo	4
1.3	Hipótesis	4
2	Antecedentes.....	5
2.1	Microfluídica	6
2.1.1	Dinámica de Flujos en dispositivos de microfluídica	7
2.1.2	Microgotas y Flujo continuo	9
2.1.3	Técnicas de separación acopladas a dispositivos de microfluídica basada en microgotas	11
2.2	Neuraminidasas	14
2.2.1	Virus de la Influenza	14
2.3	Neuraminidasa de <i>Clostridium perfringens</i>	17
2.4	Técnicas de estudio para determinación de la actividad de neuraminidasa.	18
2.4.1	Estudio de neuraminidasas en microchips.	19
2.5	Actividad del extracto Natural Umckaloabo (UMK) como inhibidor de Neuraminidasas. 20	
2.6	Principios de cinética enzimática	22
2.6.1	Inhibición enzimática.....	24
3	Desarrollo Experimental	26
3.1	Fabricación de microchips	27
3.1.1	Fabricación de Moldes mediante fotolitografía suave	27
3.1.2	Sellado de microchips.....	30
3.1.3	Caracterización física de los microchips de PDMS.....	30
3.2	Formación de microgotas	31
3.2.1	Inyección de disoluciones	32
3.2.2	Tiempo de residencia de las gotas en el microchip	33
3.3	Arreglo experimental para la medición de la fluorescencia.....	34
3.4	Cámara Phantom	36
3.5	Curva de calibración de la fluorescencia de la 4-MU	36

3.5.1	Obtención y análisis de videos.....	38
3.6	Ensayos Enzimáticos en microchips	42
3.7	Caracterización de un control positivo de inhibición (Zanamivir)	43
3.7.1	Inyección de Zanamivir en HPLC.....	44
3.8	Identificación de inhibidores en el extracto natural Umckaloabo (UMK)	45
3.8.1	Separación de UMK en HPLC	46
3.8.2	Análisis de fluorescencia en compuestos de UMK	46
4	<i>Resultados y Discusión</i>	48
4.1	Fabricación de Microchips.....	49
4.1.1	Caracterización física de réplicas en PDMS	49
4.2	Descripción y funcionamiento del microchip.....	51
4.3	Formación de Microgotas.....	53
4.4	Tiempo de residencia de las gotas en microchips.	55
4.5	Curvas de Calibración para la fluorescencia de 4-MU	56
4.5.1	Curvas de Calibración	56
4.6	Ensayos Enzimáticos en Microchips	61
4.7	Control positivo de inhibición (Zanamivir)	64
4.7.1	Aproximación de la concentración de Zanamivir en las microgotas.	69
4.7.2	Determinación del valor de K_i para Zanamivir.....	74
4.8	Identificación de Inhibidores en el extracto natural Umckaloabo.....	75
5	<i>Resumen de Resultados</i>	85
6	<i>Conclusiones</i>	86
7	<i>Perspectivas</i>.....	87
8	<i>Referencias</i>	88
9	<i>Anexo I</i>	91

Lista de Figuras

Figura 2-1. Dispositivo de microfluidica fabricado en el laboratorio de trabajo, se observa que sus dimensiones son comparables con una moneda de un peso mexicano.....	6
Figura 2-2. Microchip de PDMS en donde se observa su flexibilidad	7
Figura 2-3. Dispersión de un fluido con flujo laminar dentro de un canal. Las flechas negras indican los vectores de velocidad de las distintas "laminas" del fluido.	8
Figura 2-4. Diagrama de flujo continuo contra microgotas. (A) Flujo continuo, (B) flujo en microgotas. Tomado de [14].	9
Figura 2-5. Fig. 2-5. Formación de microgotas en un microchip. Se puede observar como el cambio en la tasa de flujo a la cual entran las disoluciones cambia la composición de las microgotas. Así mismo se ilustra el flujo laminar dentro de las microgotas y la eficiencia del mezclado de las sustancias en microgotas con respecto al flujo continuo. Tomado de [15].....	10
Figura 2-6. Esquema del diseño utilizado para la generación de un gradiente de concentración en flujo continuo seguido por encapsulación en microgotas para llevar a cabo ensayos de inhibición enzimática. Tomado de [18].	10
Figura 2-7. Esquema general para la compartimentación en microgotas de los compuestos separados mediante alguna técnica capilar de separación. Tomado de [5].	11
Figura 2-8. Reportes recientes de técnicas de separación acopladas a dispositivos de microfluidica basado en microgotas. (A) Electroforesis capilar acoplada a microchips para análisis de mezclas de aminoácidos. (B) UPLC acoplado a microchips para el análisis de mezclas de colorantes generando microgotas con un gradiente de concentración de los colorantes. (C) Inserción de una columna tipo HPLC en un dispositivo de microfluidica para la formación de microgotas.	12
Figura 2-9. Reacción general de hidrólisis del ácido siálico asistido por neuraminidasa. (http://www.worthington-biochem.com/NEUP/ , 20-04-16)	14
Figura 2-10. Esquema del virus de la influenza. Se observan tres proteínas clave del proceso infeccioso: hemaglutinina azul, neuraminidasa vino y canales M2 morado. (http://espanol.cdc.gov/enes/flu/images.htm 20-04-16).	15
Figura 2-11. Ciclo de vida del virus de la Influenza. (1) Anclaje del virus a la membrana celular mediante la formación de enlaces glucosídicos por la actividad de la hemaglutinina. (2) Formación del endosoma. (3) Activación de proteínas M2 en el virus. (4) Liberación del material genético del virus en la célula. (5) Replicación del material genético del virus. (6) Formación de nuevos viriones en la membrana celular. (7) Liberación de los viriones debido a la actividad de la neuraminidasa. 16	
Figura 2-12. Estructuras químicas de inhibidores de la neuraminidasa del virus de la influenza. Tomado de [24].	16

Figura 2-13. Estructura de la Neuraminidasa (<i>NanI</i>) de <i>Clostridium perfringens</i> acomplejada con ácido siálico. PDB: 2BF6.....	17
Figura 2-14. Reacción de hidrólisis del 4-MUNANA catalizada por neuraminidasa.....	18
Figura 2-15. Espectro de absorción (superficie azul) y emisión (superficie rosa) de 4-MU. (https://www.semrock.com/SetDetails.aspx?id=2845-05-04-16).....	19
Figura 2-16. (A) Esquema del dispositivo utilizado por el grupo de Ishimoto para llevar a cabo los ensayos enzimáticos de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> . (B) Demostración de la actividad inhibidora de Zanamivir sobre la neuraminidasa. Tomado de [28].	20
Figura 2-17. Se observa una fracción del oligómero de galocatequinas y epigalocatequinas presentes en gran proporción en el extracto de UMK. Arriba se señala en un círculo punteado el heterociclo con una configuración <i>trans</i> característico de una galocatequina. Debajo se señala el heterociclo con una configuración <i>cis</i> característico de una epigalocatequina. Tomado de [31]. ...	21
Figura 2-18. Modelo de la actividad de una enzima sobre una molécula de sustrato. El sustrato libre (S) se une a la enzima libre (E) formándose el complejo (ES) en equilibrio con E y S. El complejo ES se puede disociar de manera irreversible liberando los productos y quedando la enzima libre.....	22
Figura 2-19. Velocidad inicial de una reacción enzimática en función de la concentración de sustrato.	24
Figura 2-20. Esquema para el equilibrio de una reacción enzimática en presencia y en ausencia de un inhibidor.....	25
Figura 3-1. Diseño del microchip utilizado en este proyecto.....	27
Figura 3-2. (A) Se muestra la descarga de plasma de oxígeno (Corona Treater, BD-20AC, Electro-technic Products) sobre un portaobjetos de vidrio. (B) Descarga de plasma de oxígeno sobre la superficie de microchip de PDMS. En ambos casos el plasma activa las superficies generando radicales libres que pueden formar enlaces covalentes al poner ambas superficies en contacto. ...	30
Figura 3-3. Ejemplo de cortes realizados sobre microchips de PDMS para su caracterización.....	31
Figura 3-4. Diseño del pentágono para inyección de disoluciones y formación de microgotas en el microchip utilizado para el desarrollo de este proyecto. Se hace un acercamiento a la intersección entre los canales de la fase acuosa y los canales de la fase orgánica. En este punto se lleva a cabo la formación de microgotas mediante el corte por dos flancos de la fase acuosa el aceite.	32
Figura 3-5. Se observa un acercamiento a la cruz cinco de microchip, este corresponde al centro del diseño de fractales. En este punto se determinó el tiempo de residencias de las gotas para cada una de las curvas presentes. Las flechas indican la dirección del flujo. Flecha azul gotas en la curva con menor tiempo de residencia, flecha verde gotas en la curva con mayor tiempo de residencia.	34
Figura 3-6. Espectros de transmitancia para el juego de filtros y espejos utilizados en el microscopio de fluorescencia así como espectro de absorción y emisión para 4-MU. Línea morada: transmitancia del filtro de excitación. Línea azul: transmitancia del espejo dicróico. Línea verde: transmitancia filtro de emisión. Superficie morada: espectro de absorción de 4-MU. Superficie verde: espectro de emisión 4-MU.....	35
Figura 3-7. Arreglo para inyección de disoluciones al microchip durante los experimentos para la obtención de curvas de calibración.....	37

Figura 3-8. Interfaz de Tracker. El cirulo rosa que se observa en uno de los canales del video delimita la región RGB que se analizara durante todo el video. En este punto corresponde a la “curva a” del centro del microchip. En la esquina superior derecha de la imagen se observa el grafico generado por Tracker, debajo se encuentra la tabla de datos que se genera, un dato por cada medición.	38
Figura 3-9. Análisis de videos con Tracker. Se muestran el número de pasos necesarios para obtener el perfil de una gota que pasa por alguna de las curvas en la Cruz 5 del microchip. En la esquina superior derecha de cada paso se muestra la gráfica de intensidad luminosa según la sección de la gota sobre la cual se este realizando la medición.	40
Figura 3-10. A la izquierda se observa la gráfica generada por Tracker tras el análisis de 3 s de video. A la derecha se observa los resultados obtenidos con Mathematica, los puntos rojos en esta grafica corresponden a los máximos de fluorescencia de cada gota.	41
Figura 3-11. Arreglo de inyección de disoluciones en microchips para los experimentos de la reacción de hidrolisis de 4-MUNANA asistida por neuraminidasa.	42
Figura 3-12. Arreglo para la inyección de disoluciones en microchip durante los experimentos con Zanamivir.	44
Figura 3-13. Arreglo para inyección de disoluciones en microchip durante los experimentos para el análisis de fluorescencia en los compuestos de UMK.	47
Figura 4-1. Caracterización física de las réplicas en PDMS de los microchips utilizados en este trabajo. (A) El cuadro delimitado por la línea roja punteada es un ejemplo de corte realizado sobre las réplicas de PDMS y la sección que fue fotografiada con la cámara Phantom montada sobre el microscopio invertido, se observó la imagen con el objetivo 10X (B) Foto obtenida, con la cámara Phantom, de una sección del corte observado al microscopio, las líneas rojas sobre la imagen muestran los resultados de la caracterización del microchip con Image J.	49
Figura 4-2. (A) Diseño del microchip de fractal utilizado en este trabajo; (B) Formación de microgotas de agua en aceite debido a la intersección ambas fases; (C) Microgotas en la parte central del microchip se señalan las curvas a, b, c y d las cuales corresponden al 15 %, 40 %, 65 % y 90 % respectivamente del tiempo total de residencia de las gotas en el microchip; (D) Diseño para entrada de sustancias dentro del microchip	52
Figura 4-3. Montaje experimental para ensayos en microchips acoplado a un equipo HPLC.	53
Figura 4-4. Microchip montado en el microscopio con todas las tuberías conectadas para introducción de disoluciones, así como tubería para salida de las mismas.	53
Figura 4-5. (A) Formación de microgotas en el microchip utilizado en el laboratorio. La imagen se observa al microscopio con un objetivo 4X (Leica, NA= 0.1). (B) Se observa como los giros de las gotas dentro de los microchips genera turbulencia favoreciendo el mezclado de las disoluciones dentro de las microgotas. La imagen se observa al microscopio con el objetivo 10X (Leica, NA = 0.25).	54
Figura 4-6. Se observa un acercamiento a la cruz cinco de microchip, este corresponde al centro del diseño de fractales. Las flechas indican la dirección del flujo. Flecha azul: gotas en la curva con menor tiempo de residencia, flecha verde: gotas en la curva con mayor tiempo de residencia. En la imagen a la derecha se indica el tiempo de residencia de las gotas para cada una de las curvas en	

el centro del microchip así como el porcentaje al cual corresponden del tiempo total de residencia de las gotas en el microchip.	56
Figura 4-7. Intensidad de fluorescencia de las microgotas en la cruz 5 del microchip a diferentes concentraciones de 4-MU. Fotos obtenidas con la cámara Phantom, observadas al microscopio con un objetivo 20X.	57
Figura 4-8. Curva de calibración de 4-MU en Buffer de Fosfatos para cada curva (a, b c y d) en la cruz 5 del microchip. Las líneas continuas representan la ecuación que mejor se ajusta a la serie de datos, corresponde a una ecuación cuadrática de la forma: $RFU = A [4-MU]^2 + B [4-MU] + C$	58
Figura 4-9. Microgotas en la cruz 5 del microchip a altas concentraciones de 4-MU. Se puede observar con claridad el fenómeno de reparto de 4-MU entre la fase acuosa y la fase orgánica. Conforme las gotas recorren un mayor porcentaje del microchip el fenómeno es más cuantitativo. Foto tomada con cámara Phantom, vista al microscopio con el objetivo 10X.	60
Figura 4-10. Inyección de disoluciones de neuraminidasa y 4-MUNANA en el microchip acoplado al HPLC. La foto esta tomada con una cámara digital que se fija al lente del microscopio.	61
Figura 4-11. Microgotas con neuraminidasa y 4-MUNANA en la cruz 5 del microchip. Se observa el aumento de fluorescencia debido al avance de la reacción enzimática conforme las gotas avanzan en el chip. La foto esta tomada con la cámara Phantom y vista al microscopio con un objetivo 20X.	62
Figura 4-12. Concentración de 4-MU acumulada con respecto al tiempo de video. Se observa el aumento de la concentración de 4-MU conforme aumenta el tiempo de residencia debido a la hidrólisis de 4-MUNANA asistida por neuraminidasa de <i>C. perfringens</i>	62
Figura 4-13. Curso de la reacción enzimática de hidrólisis del 4-MUNANA por la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> determinada en los microchips. Concentraciones iniciales: 1.13 U/mL neuraminidasa, 100 μ M 4-MUNANA ambos en Buffer de Fosfatos pH 7.0, KCl 150 mM y 0.2% m/v de BSA.	63
Figura 4-14. Cromatograma de elución del Zanamivir en columna C-18 (Raptor ARC-18, 2.7 μ m, 50 x 2.1 mm, Restek) utilizando un programa isocrático de 15 % MeOH y 85 % agua en la fase móvil a un flujo de 0.1 mL/min. $C_{Zanamivir} = 20$ mg/mL, $V_{inyección} = 20$ μ L, detector a $\lambda = 270$ nm.	64
Figura 4-15. Estructura Zanamivir. Tomado de [24]	65
Figura 4-16. El eje izquierdo muestra la señal de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF) evaluada durante el tiempo de video (220s) este eje permite observar la actividad de la enzima neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en la “curva a” de la cruz 5 del microchip. Línea azul, muestra la actividad solo de la enzima sin presencia de algún inhibidor. Línea roja, actividad de la enzima una vez que se ha inyectado Zanamivir en el HPLC. La línea verde esta asociada al eje de la derecha y muestra el cromatograma de elución de Zanamivir en unidades arbitrarias (AU), esta línea se logra alinear sumando al tiempo de retención en el cromatograma los 90 s de “delay” entre el HPLC y el microchip más el tiempo que una gota tarda en llegar hasta la “curva a” en total 96.9 s.....	66
Figura 4-17. El eje izquierdo muestra la señal de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF) evaluada durante el tiempo de video (220s) este eje permite observar la actividad de la enzima neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en la “curva b” de la cruz 5 del microchip. Línea azul, muestra la actividad solo de la enzima sin presencia de algún inhibidor. Línea roja,	

actividad de la enzima una vez que se ha inyectado Zanamivir en el HPLC. La línea verde esta asociada al eje de la derecha y muestra el cromatograma de elución de Zanamivir en unidades arbitrarias (AU), esta línea se logra alinear sumando al tiempo de retención en el cromatograma los 90 s de “delay” entre el HPLC y el microchip más el tiempo que una gota tarda en llegar hasta la “curva b” en total 108.9 s.....66

Figura 4-18. El eje izquierdo muestra la señal de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF) evaluada durante el tiempo de video (220s) este eje permite observar la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* en la “curva c” de la cruz 5 del microchip. Línea azul, muestra la actividad solo de la enzima sin presencia de algún inhibidor. Línea roja, actividad de la enzima una vez que se ha inyectado Zanamivir en el HPLC. La línea verde esta asociada al eje de la derecha y muestra el cromatograma de elución de Zanamivir en unidades arbitrarias (AU), esta línea se logra alinear sumando al tiempo de retención en el cromatograma los 90 s de “delay” entre el HPLC y el microchip más el tiempo que una gota tarda en llegar hasta la “curva c” en total 120.9 s.67

Figura 4-19. El eje izquierdo muestra la señal de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF) evaluada durante el tiempo de video (220s) este eje permite observar la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* en la “curva d” de la cruz 5 del microchip. Línea azul, muestra la actividad solo de la enzima sin presencia de algún inhibidor. Línea roja, actividad de la enzima una vez que se ha inyectado Zanamivir en el HPLC. La línea verde esta asociada al eje de la derecha y muestra el cromatograma de elución de Zanamivir en unidades arbitrarias (AU), esta línea se logra alinear sumando al tiempo de retención en el cromatograma los 90 s de “delay” entre el HPLC y el microchip más el tiempo que una gota tarda en llegar hasta la “curva d” en total 132.9 s.....67

Figura 4-20. Resultados de inhibición de la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* debido a la presencia de Zanamivir. Los resultados aquí corresponden al promedio de intensidad de fluorescencia de las gotas que pasaron durante 220 s en cada una de las curvas en la cruz 5 de microchip.68

Figura 4-21. Ejemplo de la división del área bajo la curva del cromatograma para aproximar el número de moles de Zanamivir que entran al microchip en un intervalo de tiempo. Línea punteada azul, intensidad de la señal en el HPLC que genera la inyección de Zanamivir en unidades arbitrarias. Superficie negra; área que considera Origin Pro 8debajo del cromatograma de Zanamivir Línea roja; comportamiento de la fluorescencia en el microchip tras la inyección de Zanamivir. Línea verde; promedio de la fluorescencia durante 220 s en un punto del microchip debido solo a la actividad de la enzima sobre el sustrato.70

Figura 4-22. Ejemplo de división de área bajo las curvas para determinar el % de actividad enzimática. Las gráficas corresponden a los mismos datos que los presentados en la Figura 4-16. Las diagonales azules en el grafico a la izquierda representan el área bajo la curva que indica la actividad de la enzima sobre el sustrato en un intervalo de 5 s en el video. Las diagonales rojas indican la actividad de la enzima sobre el sustrato en presencia de Zanamivir en un intervalo de 5 s en el video.....71

Figura 4-23. % de actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* con respecto a la concentración de Zanamivir para las curvas “a, b y c” en el centro del microchip.....72

Figura 4-24. Resultados del ajuste para la fracción de actividad de la enzima neuraminidasa de <i>C. prefringens</i> a diferentes concentraciones de Zanamivir. El valor “m1” que se encuentra en la tabla sobre la figura corresponde al valor de $K_i = 3.45$ mM.....	74
Figura 4-25. Cromatograma de separación de UMK en columna fase reversa C-18 (Raptor ARC-18, Restek). $C_{UMK} = 3.2$ mg/mL, $V_{iny} = 20$ μ L, Detector UV a $\lambda = 320$ nm, Flujo fase móvil = 0.1 mL/min. Programa de elución; 0 min-20 min (15 %B), 20 min-25 min (15 %B-100 %B), 25 min-35 min (100 %B).	75
Figura 4-26. Comparación de la fluorescencia de las gotas en ausencia del primer pico de UMK y en presencia del mismo. A la izquierda, se observa una imagen de la actividad de la neuraminidasa sobre 4-MUNANA sin haber inyectado aún UMK. A la derecha se observa la actividad de la enzima sobre el sustrato en presencia del primer compuesto que eluye en la separación de UMK (t de retención= 3.5 min)	77
Figura 4-27. Estructura de la 4-metilumbeliferona (4-MU) y catequinas presentes en Umckaloabo® (UMK). Se observa la similitud entre ambas estructuras por lo que es de esperarse que ambos compuestos presenten espectros de fluorescencia muy similares.	77
Figura 4-28. Entrada al microchip del primer pico cromatográfico del UMK en el microchip con disoluciones de Buffer de Fosfatos. Se hace un acercamiento a la zona donde se intersectan los tres flujos de la fase acuosa en el microchip. La línea de fluorescencia que se observa es debida al aumento del pH cuando el compuesto acarreado por la fase móvil de HPLC (pH 6.0) se mezcla con las disoluciones de Buffer de Fosfatos (pH 7.0).	78
Figura 4-29. Entrada del primer pico cromatográfico del UMK en el microchip con disoluciones de enzima y sustrato. Se hace un acercamiento a la zona donde se intersectan los tres flujos de la fase acuosa en el microchip, la línea de fluorescencia que se observa es debida al aumento del pH cuando el compuesto acarreado por la fase móvil de HPLC (pH 6.0) se mezcla con las disoluciones de enzima y sustrato en Buffer de Fosfatos (pH 7.0).....	79
Figura 4-30. Comportamiento de la fluorescencia en la “curva d” de la cruz 5 del microchip (42.9 s de reacción) con diferentes composiciones de las microgotas. Línea negra, fluorescencia de las microgotas con neuraminidasa, 4-MUNANA y el 1er compuesto que eluye del extracto UMK. Línea Roja, fluorescencia de las microgotas solo con el 1er compuesto que eluye del extracto UMK y Buffer de Fosfatos. Línea Azul, resta de la línea roja a la línea negra, corresponde a la fluorescencia solo de la 4-MU que se acumula en la microgotas en presencia de enzima, sustrato y el 1er compuesto que eluye de UMK. Línea verde, fluorescencia de las microgotas debida solo a la actividad de la neuraminidasa sobre 4-MUNANA, sin presencia de ningún compuesto de UMK.	80
Figura 4-31. Comportamiento de la fluorescencia en las cuatro curvas de la cruz 5 del microchip a diferentes composiciones de las microgotas. Línea negra: fluorescencia de las microgotas con neuraminidasa, 4-MUNANA y el 1er compuesto que eluye del extracto de UMK. Línea Roja: fluorescencia de las microgotas solo con el 1er compuesto que eluye del extracto de UMK y Buffer de Fosfatos. Línea Azul: resta de la línea roja a la línea negra, corresponde a la fluorescencia solo de la 4-MU que se acumula en la microgotas en presencia de enzima sustrato y el 1er compuesto de UMK. Línea verde: fluorescencia de las microgotas debida solo a la actividad de la neuraminidasa sobre 4-MUNANA sin presencia de ningún compuesto de UMK.	81

Figura 4-32. Concentración de 4-MU en las microgotas en cada una de las curvas de la cruz 5 del microchip. Línea rosa; muestra el comportamiento de la concentración de 4-MU en las microgotas que contienen enzima, sustrato y el 1 er pico de UMK. Se monitoreó el comportamiento durante 145 seg en cada una de las curvas. Conforme fue ingresando el 1 er compuesto que eluye de UMK se observó una disminución en la concentración debido a la inhibición que este compuesto provoca sobre la actividad de la neuraminidasa. Línea dorada; muestra el comportamiento de la concentración de 4-MU en las microgotas que solo incluyen enzima y sustrato. La concentración permaneció constante durante el tiempo de monitoreo debido a que no hay actividad de ningún inhibidor. La curva A corresponde a la curva con menor tiempo de residencia (6.9 s), seguida de la curva b (18.9 s), curva c (30.9 s) y por último curva d (42.9 s).83

Figura 4-33. Concentración de 4-MU en función del tiempo de residencia de las gotas en el microchip. Los marcadores azules muestran la concentración de 4-MU que se acumula en las microgotas debido solo a la actividad de la neuraminidasa sobre 4-MUNANA. Los marcadores rojos muestran la concentración de 4-MU que se acumula en las microgotas que contienen neuraminidasa, 4-MUNANA y el 1er pico que eluye de UMK. Se observa una clara disminución en la concentración de 4-MU debido a la inhibición que el 1er pico de UMK provoca sobre la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*.84

Lista de tablas

Tabla 3-1. Procedimiento para la fabricación del molde maestro. Se describe el procedimiento para una resina SU8-2015.	28
Tabla 3-2. Flujos de disoluciones de 4-MU y buffer de reacción utilizados para la obtención de curvas de calibración. En todas las condiciones se mantuvo constante un flujo de 60 $\mu\text{L}/\text{h}$ de HPLC en la zona de formación de microgotas así como un flujo de 180 $\mu\text{L}/\text{h}$ de la fase orgánica.....	38
Tabla 3-3. Parámetros de la cámara Phantom utilizados para la obtención de videos durante la obtención de curvas de calibración.....	39
Tabla 3-4. Flujos utilizados de las disoluciones en el microchip para todos los ensayos enzimáticos realizados en este trabajo.	44
Tabla 3-5. Parámetros utilizados para la obtención de videos durante los ensayos con Zanamivir .45	
Tabla 4-1. Resultados de la caracterización de microchips correspondientes al análisis de 5 puntos diferentes en el microchip.	50
Tabla 4-2. Tiempo de residencia de las gotas en la cruz cinco del microchip. La velocidad promedio de las gotas corresponde a 5.8×10^{-3} m/s, la longitud total del canal es 28 cm, por lo tanto el tiempo total de residencia de las gotas en el microchip es de 48.28 s.	55
Tabla 4-3. Resultados de la regresión para cada una de las curvas en la cruz 5 del microchip.	59

Lista de abreviaturas

4-MU	4-metilumbeliferona
4-MUNANA	ácido 2-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
E	Enzima
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K_i	Constante de inhibición
K_M	Constante de Michaelis
MeOH	Metanol
S	Sustrato
t_{exp}	Tiempo de exposición
UA	Unidades Arbitrarias
UMK	Umckaloabo
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
URF	Unidades relativas de fluorescencia
v_{cap}	Velocidad de captura
Zan	Zanamivir

1 Introducción

1.1 Planteamiento del Problema

Las enzimas juegan un rol esencial en muchos procesos de propagación de enfermedades, por lo tanto la búsqueda de moléculas pequeñas capaces de inhibir la actividad de alguna enzima resulta una tarea muy importante para controlar y erradicar dichas enfermedades. Por dicha razón la industria farmacéutica y muchos laboratorios de investigación dedican buena parte de su esfuerzo a encontrar estos inhibidores ¹.

Hoy en día, la búsqueda de inhibidores enzimáticos implica llevar a cabo ensayos masivos, los cuales comprenden el muestreo de una biblioteca de compuestos de hasta 10^6 miembros. Para llevar a cabo estos ensayos comúnmente se utilizan técnicas de muestreo en microplacas de 96, 384 y 1536 pozos que permiten reducir el gasto de reactivos hasta el orden de los microlitros para cada pozo (10^{-6} L) ². Sin embargo considerando un análisis en placas de 1536 pozos se necesitarían 652 placas para muestrear una biblioteca de un millón de compuestos. Llevar a cabo esta tarea resultaría imposible sin el uso de robots automatizados, así mismo, recolectar esta información puede tomar semanas y consumir una gran cantidad de reactivos (> 10 L) aumentando por lo tanto los costos de análisis ³. De tal forma que si el proyecto no representa un claro objetivo económico en el mercado la búsqueda de tratamientos para algunas enfermedades queda en segundo plano.

Una alternativa para la solución de este problema es la miniaturización de los ensayos enzimáticos y la automatización de los mismos. La microfluídica es una técnica que permite la manipulación de volúmenes de líquidos del orden de los nanolitros (10^{-9} L) hasta los femtolitros (10^{-15} L), así mismo esta técnica permite llevar a cabo una gran cantidad de análisis químicos y biológicos de manera automatizada, en tiempos cortos y disminuyendo dramáticamente el consumo de reactivos ⁴.

Por otro lado el uso de técnicas de separación de alta resolución tales como electroforesis capilar (CE) o Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia HPLC por sus siglas en inglés, son técnicas ampliamente utilizadas que permiten la separación de mezclas complejas utilizando una cantidad minúscula de reactivos. El acoplamiento de estas técnicas de

separación a dispositivos de microfluídica es una actividad que se ha comenzado a desarrollar durante los últimos años y ha demostrado su eficiencia para el desarrollo de algunos análisis bioquímicos ⁵.

En este trabajo se logró acoplar un equipo de HPLC a un dispositivo de microfluídica para llevar a cabo ensayos enzimáticos dentro del dispositivo que permitieron identificar entre los compuestos que conforman el extracto natural Umckaloabo® (UMK), cual de ellos es capaz de inhibir la actividad de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens*. Cabe mencionar que la actividad de las neuraminidasas esta íntimamente relacionada en una gran cantidad de procesos infecciosos y entre ellos uno de los de mayor importancia es su relación con la propagación del virus de la influenza.

El ensayo realizado en este trabajo resulta una prueba de principio que permitió comprobar la eficiencia de un sistema microfluídico para la identificación de inhibidores enzimáticos dentro de mezclas complejas, tal como extractos naturales, de manera automatizada, en tiempos cortos de análisis y utilizando una mínima cantidad de reactivos.

1.2 Objetivo

Identificar dentro de un dispositivo de microfluídica acoplado a un equipo de HPLC compuestos con propiedades inhibitoras de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, mediante el seguimiento de la reacción de hidrolisis del ácido 2-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA).

1.3 Hipótesis

El acoplamiento de un equipo de HPLC a un microchip de microfluídica permitirá identificar cual o cuales de los compuestos que conforman el extracto natural Umckaloabo[®] son capaces de inhibir la actividad de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens*.

2 Antecedentes

2.1 Microfluídica

La microfluídica es el estudio de líquidos confinados en canales muy pequeños con dimensiones del orden de décimas a unos cuantos cientos de micrómetros, es decir son tan pequeños como el grosor de un cabello. En un dispositivo de microfluídica o también conocido como “Lab on a chip” se pueden manipular volúmenes que van desde los nanolitros hasta los picolitros. La microfluídica cuenta con las herramientas necesarias que permiten llevar a cabo la automatización de ensayos, reducir de forma importante el tiempo y la cantidad de muestra en ensayos químicos y biológicos comparados con los métodos comúnmente utilizados. Permite llevar a cabo la compartimentación y detección de compuestos con una alta eficiencia y sensibilidad a precios relativamente bajos ⁴.

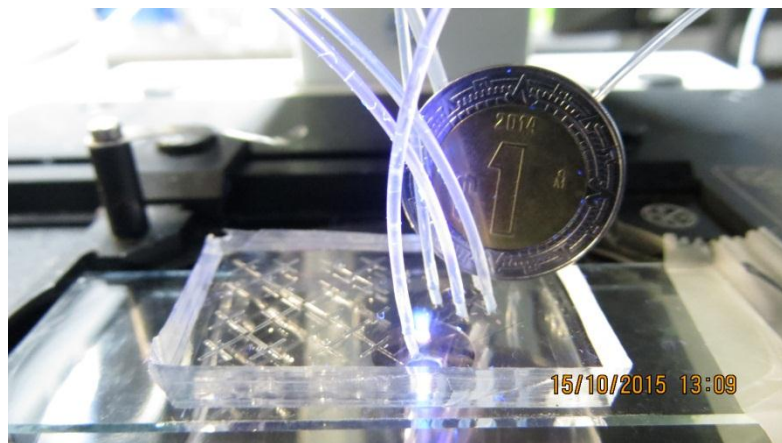


Figura 2-1. Dispositivo de microfluídica fabricado en el laboratorio de trabajo, se observa que sus dimensiones son comparables con una moneda de un peso mexicano.

Debido a sus características, el campo de aplicación de la microfluídica es muy extenso. Por ejemplo, existen reportes de trabajos realizados en dispositivos de microfluídica para llevar a cabo síntesis orgánica ⁶, cinéticas enzimáticas ⁷, ensayos celulares ⁸ y cristalización de proteínas ⁹ entre muchos otros.

La mayoría de los dispositivos de microfluídica se construyen a base de polidimetilsiloxano (PDMS). El PDMS es un polímero biocompatible, de bajo costo y ópticamente transparente en longitudes de onda entre 235 y 1100 nm lo que lo hace muy útil para técnicas de detección en la zona UV-VIS ¹⁰. Para la fabricación de dispositivos de microfluídica en

PDMS es muy común el uso de la técnica de fotolitografía suave, la cual consiste en el uso de moldes maestros que permiten transferir un patrón al PDMS. La construcción de los moldes maestros se realiza mediante el uso de resinas fotosensibles como la SU-8¹¹. En la sección de metodología se ahondara un poco más en el tema de fabricación.

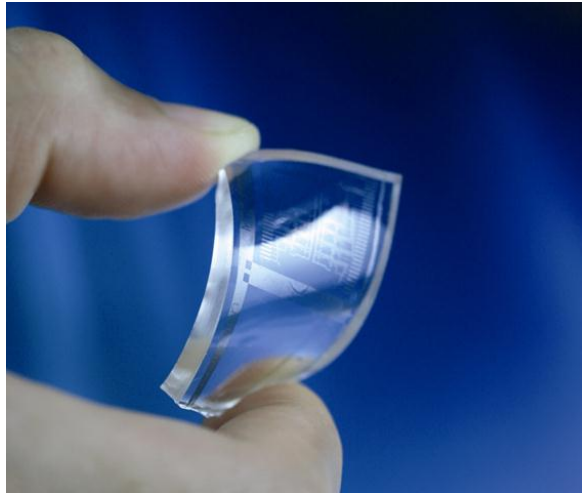


Figura 2-2. Microchip de PDMS en donde se observa su flexibilidad

2.1.1 Dinámica de Flujos en dispositivos de microfluídica

Cuando un líquido viaja a través de canales tan pequeños como los de un dispositivo de microfluídica presenta un flujo de comportamiento laminar, es decir las partículas del líquido viajan en forma de láminas ordenadas una encima de otra.

Los números de Reynolds son parámetros adimensionales que permiten determinar el tipo de flujo en un canal. Este parámetro asocia las propiedades del fluido con las características físicas del canal mediante la siguiente ecuación:

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

Donde:

$Re = \text{Número de Reynolds}$

$\rho = \text{densidad del fluido}$

$v = \text{Velocidad del fluido en el canal}$

$D = \text{diámetro del canal}$

$\mu = \text{viscosidad del fluido}$

$Re \leq 2000 \rightarrow \text{flujo laminar}$ $Re \geq 40\,000 \rightarrow \text{Flujo turbulento}$

De la ecuación de Reynolds se puede deducir que cuando el diámetro del canal disminuye el parámetro Re también disminuye. De tal forma que, para un dispositivo común de microfluídica, el número de Reynolds comúnmente se encuentra alrededor de diez ¹², lo que significa que el comportamiento en estos canales es completamente laminar.

Cuando un fluido con comportamiento laminar viaja a través de un canal presenta una dispersión longitudinal (Dispersión de Taylor). Es decir la velocidad del flujo en las zonas cercanas a las paredes del canal es menor con respecto a la velocidad en la parte central. Por lo tanto, cuando un compuesto viaja a través de un canal las partículas que se encuentran en la parte central del canal viajan con mayor velocidad provocando una dispersión de las partículas que conforman el fluido generando un gradiente de concentración a través del canal.

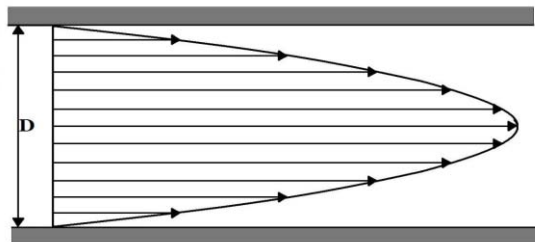


Figura 2-3. Dispersión de un fluido con flujo laminar dentro de un canal. Las flechas negras indican los vectores de velocidad de las distintas "laminas" del fluido.

2.1.2 Microgotas y Flujo continuo

Dentro de la microfluídica han destacado dos técnicas, el flujo continuo y la microfluídica basada en microgotas.

El flujo continuo consta en inyectar dentro de dispositivos de microfluídica, microchips, disoluciones en una misma fase (orgánica o acuosa) para llevar a cabo algún estudio. Sin embargo, cuando dos flujos de fluidos diferentes y miscibles viajan juntas a través de un microcanal, en ausencia de turbulencia o remolinos, la única forma en la que se pueden mezclar es por difusión molecular, este fenómeno resulta ser un proceso lento que provoca complicaciones en los ensayos; Por ejemplo, para llevar a cabo alguna reacción dentro del microchip. Así mismo la dispersión de Taylor genera un gradiente de concentración de la muestra ocasionando que se produzcan mezclas indeseadas dentro de los canales del microchip ¹³.

La microfluídica basada en microgotas es una técnica que usa dos fases inmiscibles para generar una emulsión mono dispersa de gotas de fase acuosa separadas una tras otra por una fase continua de aceite. La compartimentación de la fase acuosa trae consigo varias ventajas sobre el tradicional flujo continuo: se evita la difusión de las partículas de la muestra a través del microcanal, el mezclado de las sustancias es más rápido y eficiente y además se disminuye la probabilidad de obstrucción en los canales del microchip (Figura 2-4) ¹⁴.

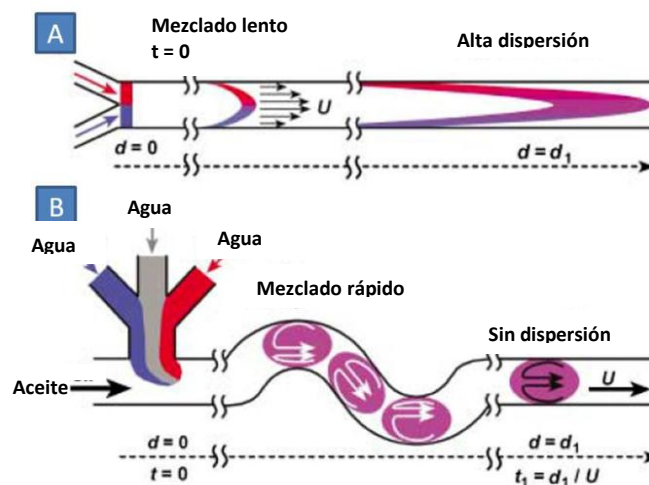


Figura 2-4. Diagrama de flujo continuo contra microgotas. (A) Flujo continuo, (B) flujo en microgotas. Tomado de [14].

Las microgotas funcionan como micro reactores con una composición muy similar uno del otro, así mismo, como se observa en la Figura 2-5, se pueden realizar cambios muy sutiles en la composición de la microgotas cambiando los flujos a los cuales se forman ¹⁵. El análisis de microgotas se puede hacer de manera simultánea por distintos métodos de detección, tal como fluorescencia ¹⁶ o algunos métodos electroquímicos ¹⁷.

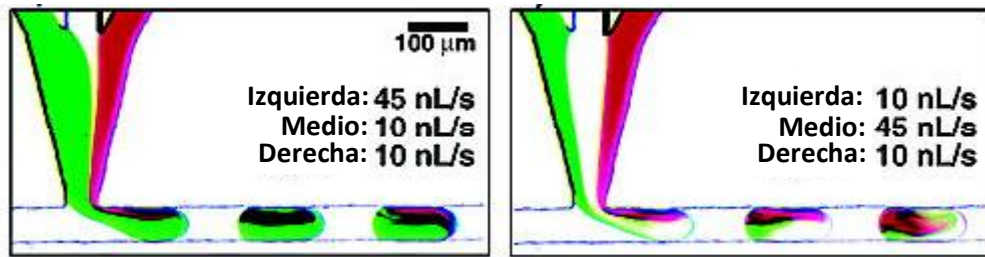


Figura 2-5. Fig. 2-1. Formación de microgotas en un microchip. Se puede observar como el cambio en la tasa de flujo a la cual entran las disoluciones cambia la composición de las microgotas. Así mismo se ilustra el flujo laminar dentro de las microgotas y la eficiencia del mezclado de las sustancias en microgotas con respecto al flujo continuo. Tomado de [15].

Cabe mencionar que el uso de flujo continuo no es obsoleto, algunos estudios han aprovechado la dispersión de concentración en flujo continuo seguido de la formación de microgotas, de esta manera se generan microgotas con un gradiente de concentración del compuesto en estudio y se han logrado gradientes de 3 a 4 ordenes de magnitud ¹⁸ (Figura 2-6).

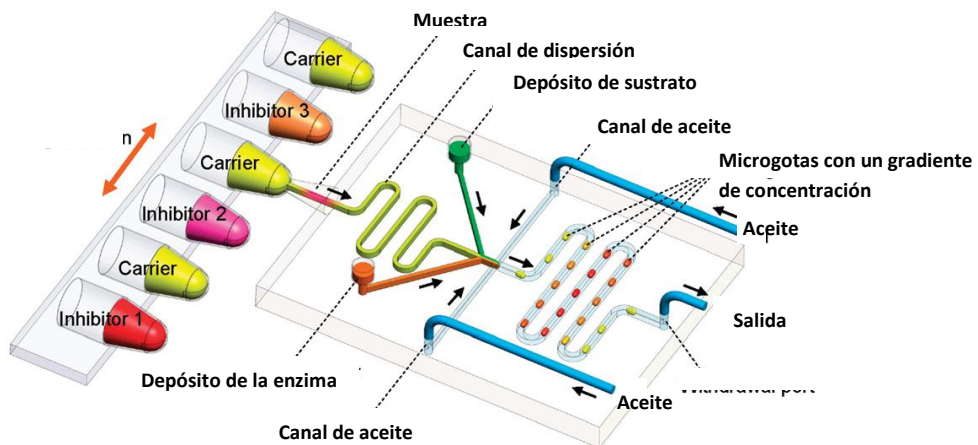


Figura 2-6. Esquema del diseño utilizado para la generación de un gradiente de concentración en flujo continuo seguido por encapsulación en microgotas para llevar a cabo ensayos de inhibición enzimática. Tomado de [18].

2.1.3 Técnicas de separación acopladas a dispositivos de microfluídica basada en microgotas

La separación de mezclas complejas juega un papel muy importante en el área de la química y la biotecnología. Técnicas como la electroforesis o la cromatografía son pasos esenciales para llevar a cabo la separación de mezclas complejas. Sin embargo, el análisis posterior a la separación no siempre es sencillo y puede resultar muy costoso.

En 2009, Edgar *et al.*⁵ propusieron el acoplamiento de alguna técnica de separación a un dispositivo de microfluídica basado en microgotas, de tal forma que se pudiera llevar a cabo, de manera automatizada, la compartimentación y el análisis simultáneo en microgotas de los compuestos separados (Figura 2-7). Para demostrar su idea, el grupo de investigación reportó el desarrollo de un dispositivo de microfluídica basado en microgotas acoplado a un equipo de electroforesis capilar para llevar a cabo la separación de una mezcla de aminoácidos. Los compuestos ya separados se lograron compartimentar en microgotas y se consiguió identificarlos en las mismas mediante métodos electroquímicos durante la separación y fluorescencia en las microgotas (Figura 2-8 A).

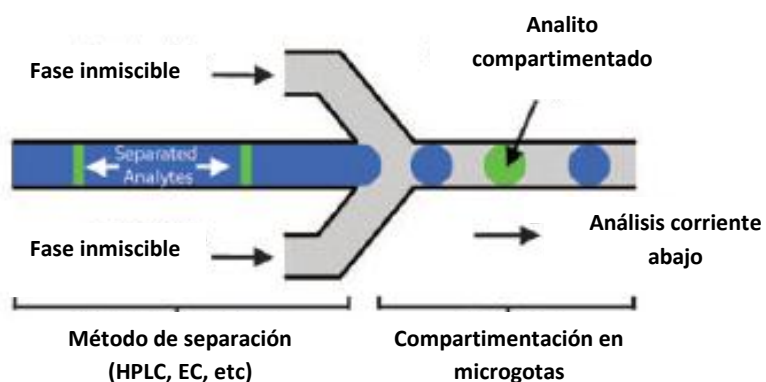


Figura 2-7. Esquema general para la compartimentación en microgotas de los compuestos separados mediante alguna técnica capilar de separación. Tomado de [5].

En 2010, Theberge B. y colaboradores¹⁹ lograron generar un gradiente de concentración de colorantes en microgotas mediante el acoplamiento de un equipo de UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) a un dispositivo de microfluídica (Figura 2-8 B). De manera un poco diferente, Jin-Young Kim en 2012²⁰ reportó la fabricación de una columna C-18 incrustada dentro de un dispositivo de microfluídica, esta a su vez asociada a un diseño para la formación de microgotas (Figura 2-8 C).

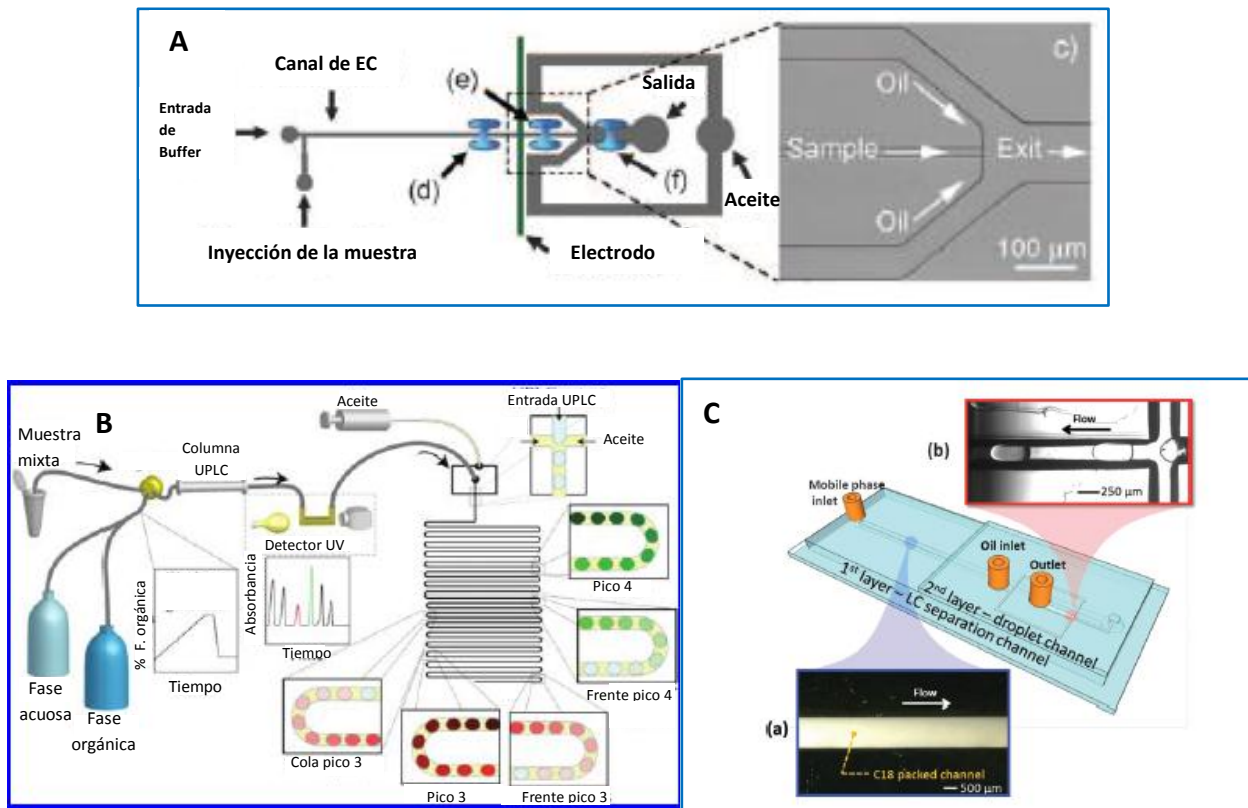


Figura 2-8. Reportes recientes de técnicas de separación acopladas a dispositivos de microfluídica basado en microgotas. (A) Electroforesis capilar acoplada a microchips para análisis de mezclas de aminoácidos. (B) UPLC acoplado a microchips para el análisis de mezclas de colorantes generando microgotas con un gradiente de concentración de los colorantes. (C) Inserción de una columna tipo HPLC en un dispositivo de microfluídica para la formación de microgotas.

Importancia del acoplamiento de la técnica HPLC a dispositivos de microfluídica

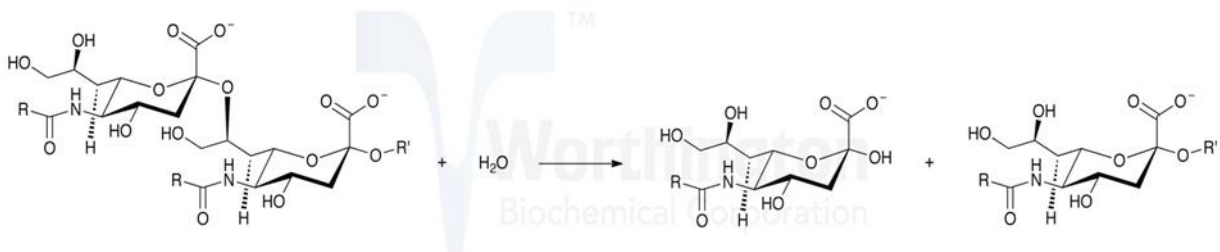
La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), por sus siglas en inglés, es una de las técnicas más socorridas en una gran cantidad de laboratorios de diversas índoles y tiene un gran número de aplicaciones en la investigación y en la industria. Permite llevar a cabo la separación de mezclas complejas con un gran número de moléculas pequeñas así como la separación de compuestos muy similares entre ellos¹⁹.

El acoplamiento de un equipo HPLC a un dispositivo de microfluídica basado en microgotas permite llevar a cabo la separación de una mezcla compleja en el HPLC e introducir en las microgotas uno a uno los compuestos separados según su tiempo de retención. Las microgotas mantienen la separación que se logra inicialmente y pueden ser analizadas por diferentes métodos espectroscópicos o electroquímicos. Esto resultaría de gran utilidad para llevar a cabo escrutinios de alta eficiencia, ensayos enzimáticos y celulares. Sin embargo, hasta hoy solo se ha logrado desarrollar el acoplamiento de las técnicas a microchips y comprobar que la separación de los compuestos permanece constante. Utilizar este principio en aplicaciones más importantes es uno de los objetivos innovadores de este trabajo.

En particular en este trabajo se describe el acoplamiento de un equipo de HPLC, conectado a una columna C-18, a un dispositivo de microfluídica para llevar a cabo la identificación de inhibidores enzimáticos, generando un gradiente de concentración de los mismos y logrando evaluar su actividad inhibitoria a distintas concentraciones según su composición en las microgotas.

2.2 Neuraminidasas

Las neuraminidasas o sialidasas son una familia de enzimas capaces de catalizar la reacción de hidrólisis de un ácido siálico terminal presente en una diversidad de glicoconjugados. Estas enzimas generalmente actúan sobre el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) presente en glicoproteínas de la membrana celular. En la Figura 2-9 se presenta un esquema de la reacción general de hidrólisis del ácido siálico asistido por las neuraminidasas, donde R' puede ser el sitio de unión del ácido siálico a alguna proteína, lípido u oligosacárido, entre otros.



R = -CH₃ (ácido N-acetilneuramínico) o -CH₂OH (ácido gliconeuramínico)
R' = oligosacárido, proteína, lípido, etc.

Figura 2-9. Reacción general de hidrólisis del ácido siálico asistido por neuraminidasa.
(<http://www.worthington-biochem.com/NEUP/>, 20-04-16)

Las neuraminidasas están presentes en humanos, bacterias, virus, hongos y protozoarios²¹. Juegan un rol importante en patogénesis, nutrición bacteriana y algunas interacciones celulares²².

2.2.1 Virus de la Influenza

Un caso particular y de gran importancia de las neuraminidasas es su actividad durante el proceso infeccioso del virus de la influenza. El estudio de este virus ha logrado identificar algunas proteínas clave para su propagación: hemaglutinina, neuraminidasa y proteínas M2 (Figura 2-10)²³.

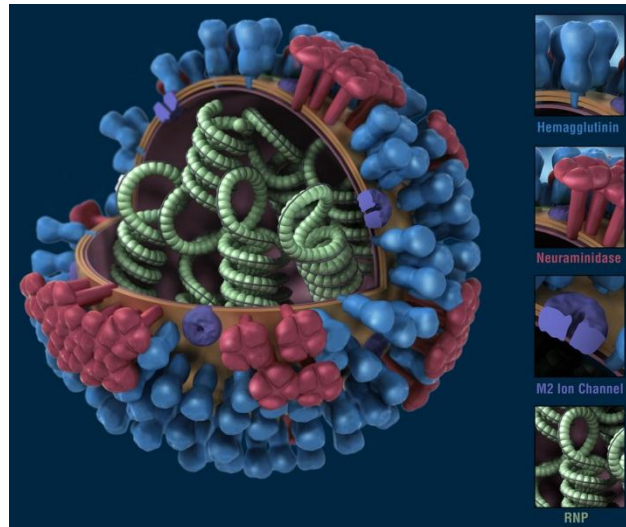


Figura 2-10. Esquema del virus de la influenza. Se observan tres proteínas clave del proceso infeccioso: hemagglutinina azul, neuraminidasa rojo y canales M2 morado. (<http://espanol.cdc.gov/enes/flu/images.htm> 20-04-16).

La hemagglutinina se encarga de unir los ácidos siálicos terminales de la célula receptora a la superficie del virus mediante enlaces glucosídicos. De esta manera, el virus se ancla a la célula huésped y entra a la célula por endocitosis. En el endosoma, el pH es considerablemente bajo (5.5-6.0) y a este valor el canal de protones M2 en la membrana del virus se activa permitiendo la entrada del material genético del virus en la célula y desencadenando así la replicación. Los viriones comienzan a formarse en la superficie de la célula quedando unidos a la membrana lipídica por enlaces glucosídicos con el ácido siálico de la membrana celular²⁴.

En el último paso la neuraminidasa del virus se encarga de hidrolizar los enlaces glucosídicos que mantienen unidos los viriones con la membrana celular, liberando así los viriones para que estos puedan seguir con el proceso infeccioso. En pocas palabras la neuraminidasa del virus de la influenza se ve fuertemente implicada en la propagación de la enfermedad (Figura 2-11)

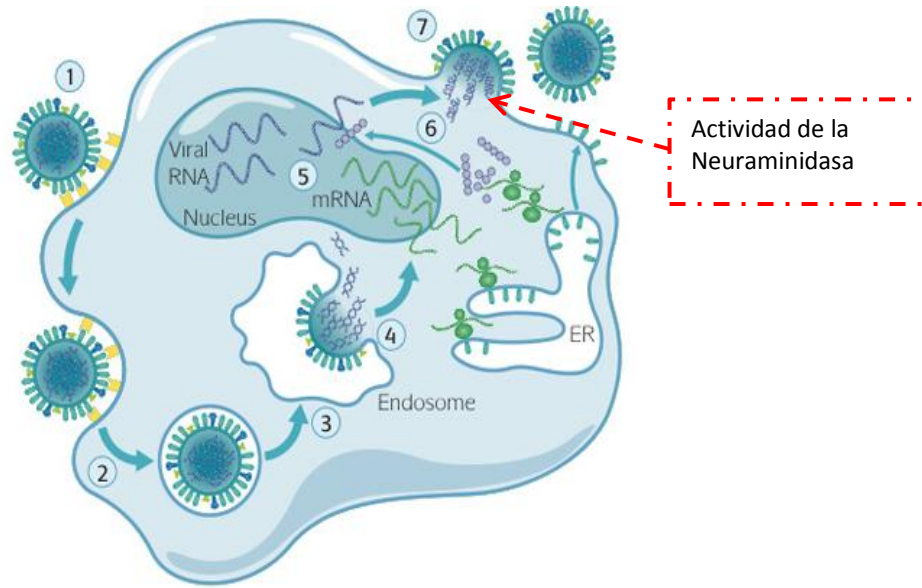


Figura 2-11. Ciclo de vida del virus de la Influenza. (1) Anclaje del virus a la membrana celular mediante la formación de enlaces glucosídicos por la actividad de la hemaglutinina. (2) Formación del endosoma. (3) Activación de proteínas M2 en el virus. (4) Liberación del material genético del virus en la célula. (5) Replicación del material genético del virus. (6) Formación de nuevos viriones en la membrana celular. (7) Liberación de los viriones debido a la actividad de la neuraminidasa.

Inhibidores de la neuraminidasa del virus de la influenza

Los fármacos con mayor eficiencia para el tratamiento de la influenza son aquellos que inhiben la actividad neuraminidasa. A nivel mundial, existen dos inhibidores: Relenza® (Zanamivir) y Tamiflu® (Osetalmivir). El estudio en Japón sobre este tema ha logrado el desarrollo y la obtención de licencia en este país de dos compuestos más: Peramivir y Laninamivir (Figura 2-12) ²⁴.

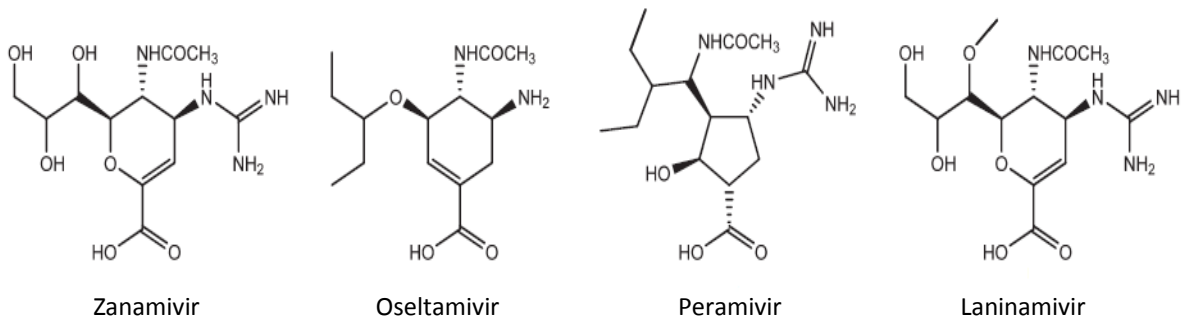


Figura 2-12. Estructuras químicas de inhibidores de la neuraminidasa del virus de la influenza. Tomado de [24].

A pesar de la existencia de esta serie de compuestos inhibidores de la neuraminidasa del virus de la influenza, existe una gran necesidad de producir nuevos compuestos capaces de combatir las cepas del virus que han generado resistencia a estos medicamentos. Por ejemplo, durante la temporada del 2008-2009 la cepa estacional AH1N1 del virus de la influenza generó una resistencia hacia el Oseltamivir en un 99 % de los casos que se detectaron ²⁵. Problemas como este exigen el desarrollo de nuevos antivirales más eficientes, razón por la cual la investigación sobre el tema es aun de gran relevancia.

2.3 Neuraminidasa de *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens es una bacteria gram-positiva causante de diversas enfermedades en humanos tales como gangrena gaseosa o enterotomía en humanos. La secuenciación del genoma de *C. perfringens* ha permitido identificar tres genes que codifican para tres neuraminidasas diferentes, *NanH*, *NanI* y *NanJ*. Sin embargo, solo *NanI* y *NanJ* son secretadas. El producto del gen *nanI* es una neuraminidasa de 77 kDa que puede ser aislada de tal forma que conserve su actividad como sialidasa (Figura 2-13) ²⁶.



Figura 2-13. Estructura de la Neuraminidasa (*NanI*) de *Clostridium perfringens* complejada con ácido siálico. PDB: 2BF6.

La forma relativamente sencilla y barata de obtener la neuraminidasa de *C. perfringens*, en comparación con las enzimas del virus, provoca que esta enzima resulte un modelo de estudio inicial para la actividad de neuraminidasas y la búsqueda de inhibidores para este tipo de enzimas ²⁷.

2.4 Técnicas de estudio para determinación de la actividad de neuraminidasa.

Para el estudio de las neuraminidasas generalmente se trabaja con sustratos que contengan en su estructura algún marcador fluorescente formando un enlace glucosídico con el ácido siálico, de tal forma que, al darse la reacción de hidrólisis catalizada por la enzima, se libere el compuesto fluorescente y se pueda seguir la reacción por medición de fluorescencia.

Para ello se emplea principalmente la enzima aislada de *C. Perfringens* junto con el ácido 2-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA). Dicho sustrato se conforma por el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) unido mediante un enlace glucosídico a 4-metilumbeliferona (4-MU). Esta última es una cumarina con propiedades fluorescentes (Figura 2-14).

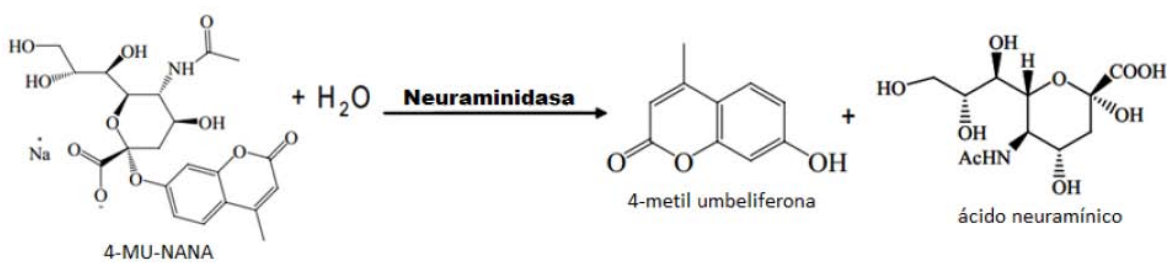


Figura 2-14. Reacción de hidrólisis del 4-MUNANA catalizada por neuraminidasa.

Espectro de absorción y emisión de la 4-metilumbeliferona

A pH alcalino la fluorescencia de la 4-MU tiene un máximo de emisión alrededor de los 450 nm, mientras que el máximo del espectro de excitación se encuentra alrededor de los 375 nm (Figura 2-15).

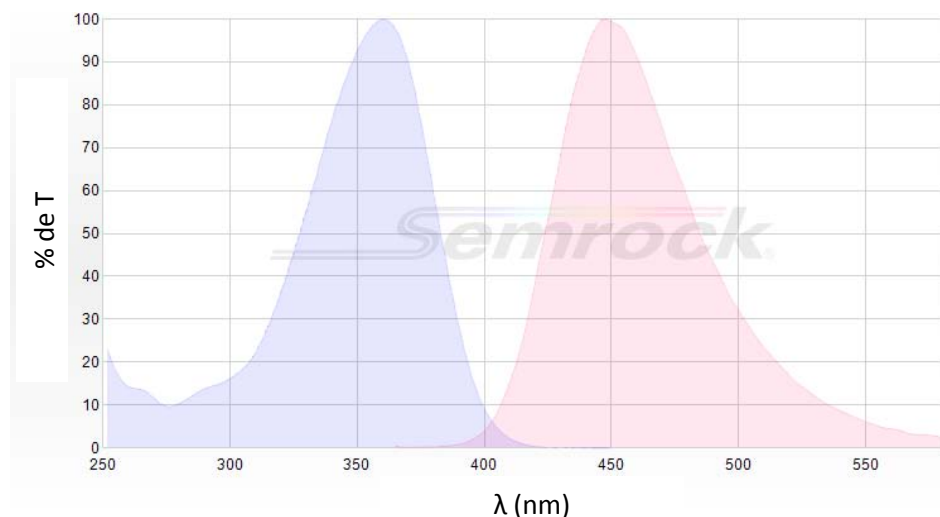


Figura 2-15. Espectro de absorción (superficie azul) y emisión (superficie rosa) de 4-MU. (<https://www.semrock.com/SetDetails.aspx?id=2845-05-04-16>)

2.4.1 Estudio de neuraminidasas en microchips.

Recientemente, los estudios de inhibición enzimática de diversas enzimas en microchips se han intensificado. Entre ellos en 2013, el grupo de trabajo de Ishimoto T.²⁸ reportó los resultados de un estudio cinético de la neuraminidasa de *C. perfringens* utilizando como sustrato 4-MUNANA. Mediante un dispositivo de microfluídica en dos piezas, una convexa y una cóncava, se logró inmovilizar la enzima en la primera pieza y el sustrato en la segunda utilizando polientilenglicol (Figura 2-16 A). Haciendo uso de este dispositivo y al hacer pasar un flujo en fase acuosa por el canal formado lograron medir la actividad de la enzima en presencia de Zanamivir (Relenza®). En la Figura 2-16 B se observan dos canales, a la izquierda se aprecia la actividad de la enzima sin inhibidor, mientras que el canal a la derecha se aprecia una disminución considerable en la fluorescencia correspondiente a la actividad de la enzima en presencia de Zanamivir.

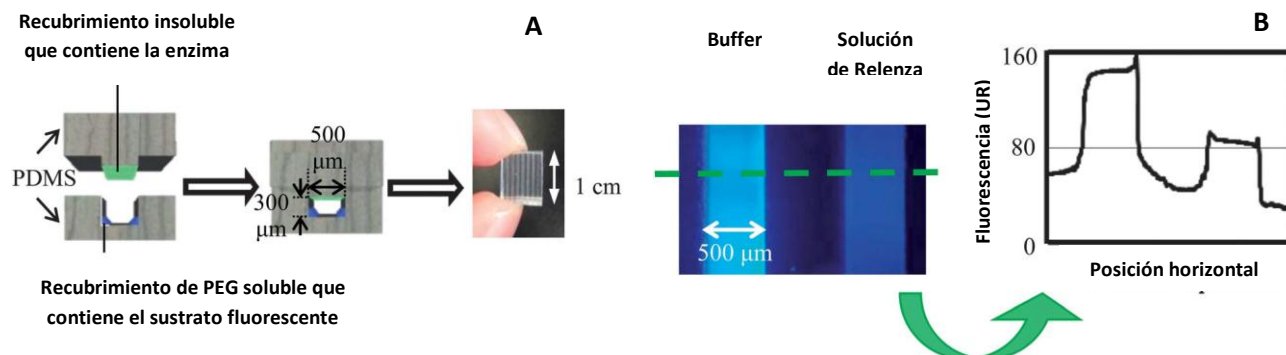
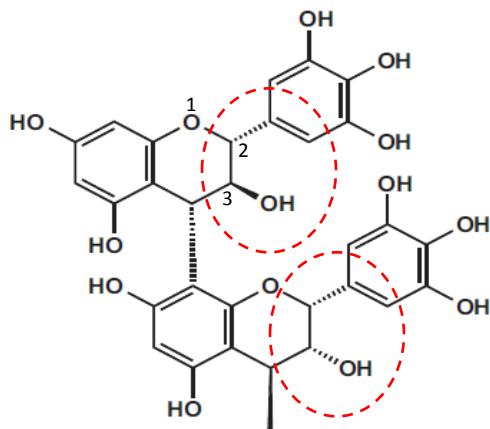


Figura 2-16. (A) Esquema del dispositivo utilizado por el grupo de Ishimoto para llevar a cabo los ensayos enzimáticos de la neuraminidas de *C. perfringens*. (B) Demostración de la actividad inhibitora de Zanamivir sobre la neuraminidas. Tomado de [28].

2.5 Actividad del extracto natural Umckaloabo (UMK) como inhibidor de neuraminidas.

Umckaloabo (UMK) EPs®7630 es un extracto etanólico de la raíz de *Pelargonium Sidoides* (Gerniaceae), planta originaria de África que ha sido utilizada como una medicina tradicional en varias regiones de Sudáfrica para el tratamiento de enfermedades respiratorias²⁹. UMK se ha comercializado desde el año 2005 por la compañía Alemana Farmasa-Schwabe y es comúnmente utilizado para el tratamiento de bronquitis y resfriado común.

UMK está compuesto principalmente por polifenoles. Entre ellos, un gran porcentaje corresponde a galocatequinas y epigalocatequinas oligomerizadas en una gran variedad de estructuras³⁰. Como se observa en la Figura 2-17, el grupo OH sobre el carbono en la posición tres del heterociclo es lo que diferencia a una galocatequina de una epigalocatequina³¹. La configuración *trans* corresponde a las galocatequinas mientras que las epigalocatequinas presentan una configuración *cis*.



Unidad monomérica de galocatequina

Unidad monomérica de epigalocatequina

Figura 2-17. Se observa una fracción del oligómero de galocatequinas y epigalocatequinas presentes en gran proporción en el extracto de UMK. Arriba se señala en un círculo punteado el heterociclo con una configuración *trans* característico de una galocatequina. Debajo se señala el heterociclo con una configuración *cis* característico de una epigalocatequina. Tomado de [31].

Existen reportes que han comprobado la actividad de este compuesto como inhibidores de la enzima neuraminidasa del virus de la influenza ³² así como su actividad bactericida ³³. Trabajos previos en nuestro laboratorio han evaluado su actividad como inhibidor de la neuraminidasa de *C. perfringens* mediante ensayos espectrofotométricos. Sin embargo, no se ha logrado identificar cual o cuales de los compuestos en el extracto son los que tienen actividad inhibidora.

2.6 Principios de cinética enzimática

La función de una enzima es acelerar la velocidad de una reacción química específica en un sistema biológico. La cinética enzimática es una rama de la enzimología que estudia los factores que afectan la velocidad a la cual una enzima cataliza una reacción. Entre los factores más importantes se encuentran: la concentración de la enzima, la concentración de los ligantes (sustrato, productos, inhibidores y activadores), pH, fuerza iónica y temperatura ³⁴. Todos estos factores afectan la reacción enzimática y un análisis apropiado sobre ellos nos puede proporcionar información relevante sobre la naturaleza de la enzima en estudio.

Como se observa en la Figura 2-18, una reacción enzimática es un ciclo catalítico que conlleva la formación de un complejo enzima-sustrato (ES) en equilibrio químico con el sustrato (S) y la enzima (E) libres. El complejo ES también puede disociarse hacia la formación de productos (P) dejando a la enzima libre para poder tomar otra molécula de sustrato y poder llevar a cabo nuevamente la transformación del sustrato en productos.

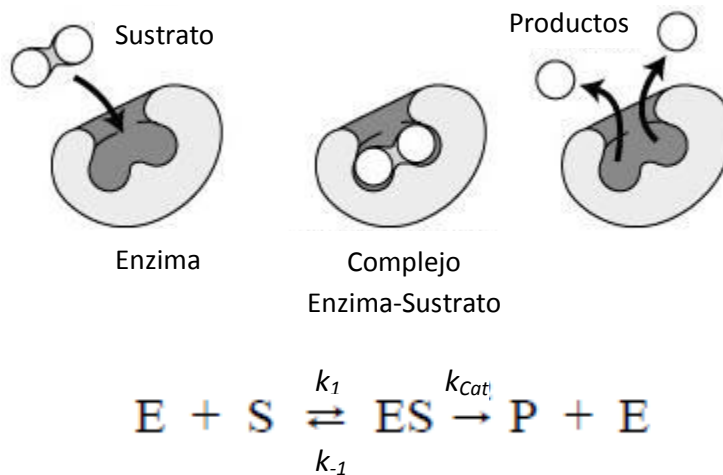


Figura 2-18. Modelo de la actividad de una enzima sobre una molécula de sustrato. El sustrato libre (S) se une a la enzima libre (E) formándose el complejo (ES) en equilibrio con E y S. El complejo ES se puede disociar de manera irreversible liberando los productos y quedando la enzima libre.

Durante una reacción enzimática comúnmente la concentración de enzima permanece constante mientras que la concentración de sustrato disminuye debido a que este se transforma en productos. Por ello el valor de la velocidad inicial (v_0), corresponde a la velocidad en la que el sustrato se transforma en productos. Se mide solo cuando no más del 5% de la concentración inicial de sustrato ha sido utilizada y por lo tanto la reacción reversible es despreciable.

En la Figura 2-19 se observa el comportamiento de la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato, el cual se encuentra descrito por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Donde:

V_{max} = *Velocidad maxima*

$[S]$ = *Concentración de sustrato*

K_m = *Constante de Michaelis*

v_0 = *velocidad inicial*

Al inicio en la gráfica de la Figura 2-19, a concentraciones bajas de sustrato, se puede observar que el aumento de la v_0 muestra una tendencia lineal y, conforme aumenta la concentración de sustrato el cambio de la velocidad inicial disminuye hasta llegar a un punto donde permanece constante. En este punto la enzima ha llegado a la saturación, es decir, todas las moléculas de enzima se encuentran en la forma ES, por lo tanto la velocidad de transformación de sustrato a productos permanece constante y se conoce como V_{max} . La constante de Michaelis (K_m) es un parámetro que corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial es un medio de la V_{max} . La K_m resulta un parámetro que nos da información acerca de la afinidad del sustrato por la enzima, cuando su valor es pequeño significa que se necesitan concentraciones bajas de sustrato

para poder saturar la enzima, lo que indica una alta afinidad del sustrato hacia la enzima. El caso contrario donde el valor de K_m es grande, significa que se necesitan concentraciones altas de sustrato para saturar las moléculas de enzima indicando una baja afinidad ¹.

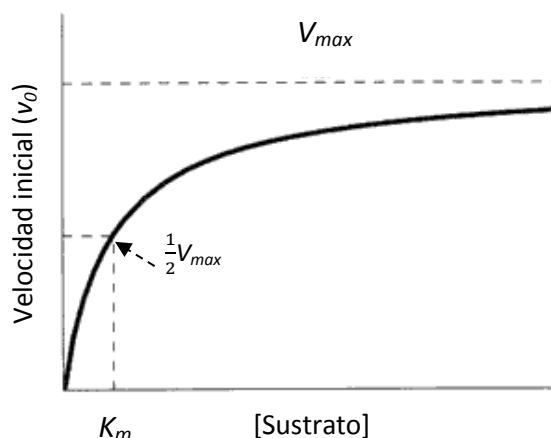


Figura 2-19. Velocidad inicial de una reacción enzimática en función de la concentración de sustrato.

2.6.1 Inhibición enzimática

Cualquier sustancia capaz de disminuir la velocidad de una reacción enzimática puede ser considerada como un inhibidor (I). Un inhibidor comúnmente es una molécula pequeña que puede interactuar con una enzima de diferentes maneras, según el tipo de interacción puede ser clasificado como un inhibidor competitivo, no competitivo o acompetitivo ¹.

A grandes rasgos, el caso más sencillo es la inhibición competitiva, donde el inhibidor compite directamente con el sustrato por el sitio activo en la enzima libre, provocando un aumento en el valor de K_m de la reacción de la enzima con su sustrato natural. La inhibición no competitiva es aquella donde el inhibidor se puede unir ya sea a la enzima libre o bien a al complejo enzima sustrato. En este caso el inhibidor se puede unir a algún otro sitio en la enzima diferente al sitio activo generando un cambio en la estructura tridimensional de la enzima, reduciendo la eficiencia de la enzima y por lo tanto disminuyendo el valor de la V_{max} . Un inhibidor acompetitivo se une exclusivamente al complejo ES en algún sitio diferente al sitio activo de la enzima, estos inhibidores son

capaces de disminuir la afinidad de la enzima por el sustrato y de disminuir la eficiencia de la enzima, es decir, provocan un aumento el valor de K_m y una disminución en el valor de V_{max} ¹ (Figura 2-20).

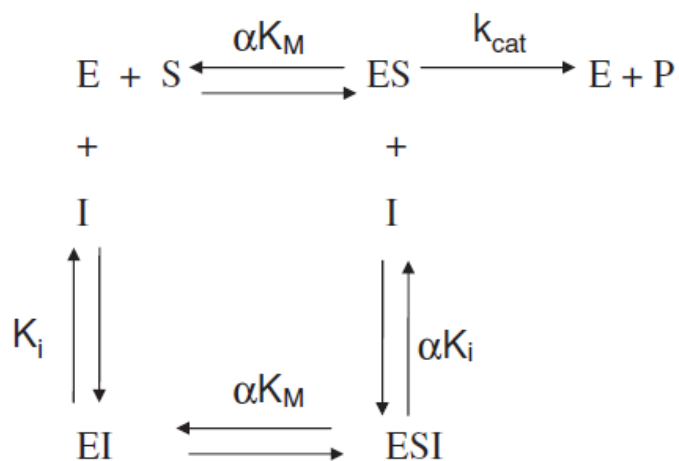


Figura 2-20. Esquema para el equilibrio de una reacción enzimática en presencia y en ausencia de un inhibidor.

3 Desarrollo Experimental

3.1 Fabricación de microchips

El proceso de fabricación de dispositivos de microfluídica (microchips) comenzó diseñando un arreglo de microcanales de 150 μm de ancho por 100 μm de altura utilizando el software Adobe Illustrator C56, el cual permite dibujar patrones con líneas que van desde décimas a cientos de micrómetros

La Figura 3-1 muestra el diseño de los microchips utilizados en este trabajo. Este arreglo de microcanales esta basado en el trabajo realizado por el grupo de Katsuki, H.³⁵ quienes diseñaron un arreglo de microcanales con geometría de fractales para el estudio de la cinética de reacciones bioquímicas. Una explicación más amplia sobre el diseño y funcionamiento del microchip se dara en la sección 3.2.

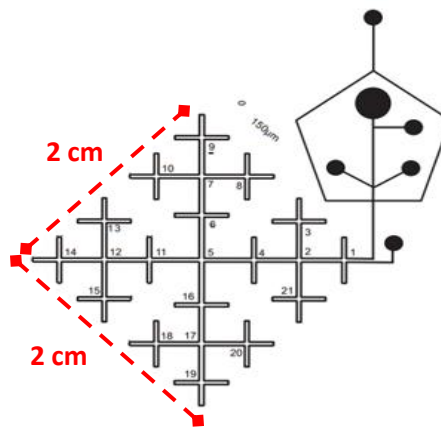


Figura 3-1. Diseño del microchip utilizado en este proyecto.

Una vez dibujados los diseños, se mandaron a imprimir en negativo sobre acetato (Gráficos Digitales Denver), los cuales sirvieron como máscaras para transferir el diseño a los moldes.

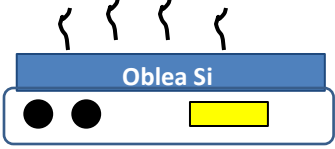
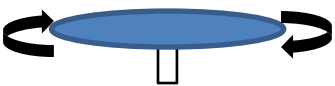
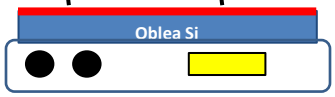
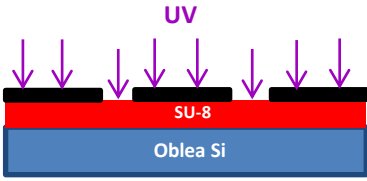


3.1.1 Fabricación de Moldes mediante fotolitografía suave

La fotolitografía suave es una técnica que permite obtener dispositivos de microfluídica a través de la fabricación de moldes y replicas. Dicha técnica se puede dividir en dos secciones, primero la fabricación de un molde maestro utilizando una resina fotosensible SU-8 y, segundo, la obtención de réplicas mediante el uso de polidimetilsiloxano (PDMS).

Obtención del Molde maestro

En la Tabla 3-1 se describe el procedimiento seguido para la fabricación de moldes mediante la técnica de fotolitografía utilizando la resina SU8-2015 (Microchem).

Tabla 3-1. Procedimiento para la fabricación del molde maestro. Se describe el procedimiento para una resina SU8-2015.

# de paso	Descripción del proceso	Esquema
1	Tratamiento de la oblea. Se colocó una oblea de silicio ($r = 3.81$ cm, Silicon Valley Microelectronics) sobre una parrilla a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, posteriormente 5 minutos en un horno a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, con la finalidad de eliminar el agua adsorbida.	
2	Spin Coat. La oblea limpia y seca se fijó mediante vacío sobre el spin coater. Sobre ella se agregaron alrededor de 3 mL de resina SU8-2015 (Microchem). Se utilizó un programa de spin en dos tiempos: 1) $t = 10$ s $\bar{\omega} = 500$ rpm $a = 100$ rpm/s 2) $t = 30$ s $\bar{\omega} = 1250$ rpm $a = 300$ rpm/s	 1) 10 s a 500 rpm 2) 30 s a 1250 rpm
3	Calentamiento suave. La oblea con la película de resina se colocó sobre una parrilla a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos para evaporar los disolventes que contiene la resina. Los pasos 2 y 3 se repitieron tres veces para obtener un grosor final de $100\text{ }\mu\text{m}$.	
4	Exposición UV. Se alineó la oblea con la máscara de acetato que contiene impreso el patrón del microchip, se colocó bajo la lámpara de UV (UVG-L25UV) durante 7 min a 7 cm de altura y $\lambda = 350$ nm, iniciando así la polimerización en las zonas donde la máscara permite el paso de luz.	
5	Calentamiento Post exposición. La oblea se colocó sobre una parrilla a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos para que la reacción de polimerización terminara por completo.	
6	Revelado. Se sumergió la oblea durante 10 minutos en el revelador (1-metoxi-2-propanol acetato), agitando constantemente durante ese tiempo para eliminar toda la resina que no fue polimerizada. Se sacó y enjuagó con isopropanol, se secó con aire comprimido y se colocó en una caja de Petri.	

Fabricación de microchips con PDMS

El PDMS es el polímero más extensamente utilizado en la fabricación de dispositivos de microfluídica, pertenece a una familia de polímeros que contienen aceites de silicón, cuenta con ciertas características que lo hacen altamente biocompatible, apto para su uso en microfluídica y ensayos espectrofotométricos debido a su transparencia en la zona del UV y visible.

Obtención de réplicas.

- I. Se pesaron 25 g de prepolimero PDMS (Sylgard 184, Silicone Elastomer base, Dow Corning) y se agregó el 8.5 % en masa de agente curante (Sylgard 184, Silicone Elastomer curing agent, Dow Corning). La mezcla se agitó durante unos minutos hasta alcanzar la homogenización.
- II. Se vertió la mezcla sobre el molde de SU-8 que se encontraba dentro una caja Petri. Se dejó reposar durante 5 min y se colocó dentro de una campana de vacío durante 5 min para extraer las burbujas atrapadas en la mezcla.
- III. Ya eliminadas las burbujas del molde con PDMS, se colocó en un horno a 70 °C durante al menos 12 horas para acelerar el proceso de polimerización del PDMS.
- IV. Finalizada la polimerización el PDMS adquiere una consistencia sólida y suave. Se cortó con bisturí a los alrededores del patrón de SU8. Se desprendió del molde con ayuda de espátula.
- V. Se hicieron las perforaciones pertinentes sobre el microchip de PDMS para la entrada de los fluidos con ayuda de punzones (Harris punch), $d = 0.75 \text{ mm}$ para entradas de fase acuosa y orgánica, 1.5 mm para entrada del equipo HPLC.

3.1.2 Sellado de microchips

El sellado del microchip se realiza aprovechando las características fisicoquímicas del PDMS y otros materiales basados en silicatos como el vidrio y el cuarzo. La oxidación de estas superficies se enriquece con grupos siloxilos generando radicales libres. Cuando dos superficies tratadas con plasma de oxígeno son puestas en contacto se forman enlaces covalentes y permanecen unidas³⁶.

Las superficies del microchip de PDMS y vidrio se trataron con plasma (Corona Treater, BD-20AC, Electro-technic Products) durante 15 s y 60 s respectivamente (Figura 3-2). Se juntaron las superficies quedando adheridas una a la otra. El microchip se dejó reposar durante 24 horas en un horno a 70 °C.

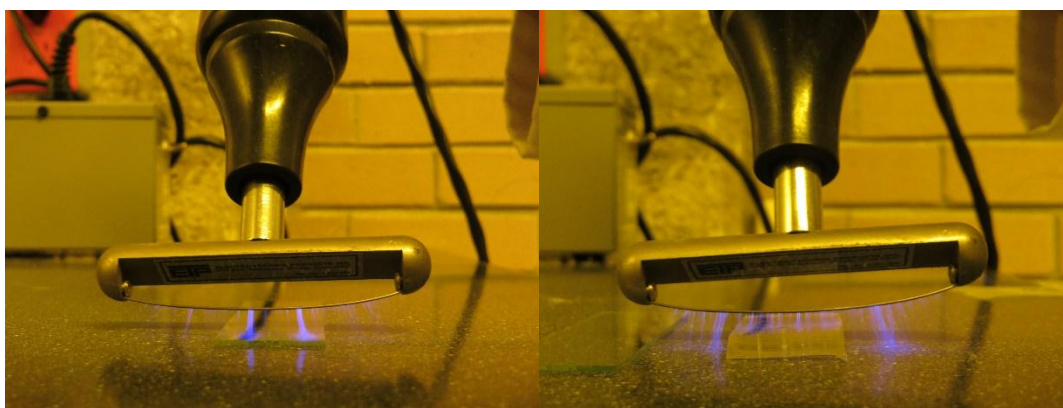


Figura 3-2. (A) Se muestra la descarga de plasma de oxígeno (Corona Treater, BD-20AC, Electro-technic Products) sobre un portaobjetos de vidrio. (B) Descarga de plasma de oxígeno sobre la superficie de microchip de PDMS. En ambos casos el plasma activa las superficies generando radicales libres que pueden formar enlaces covalentes al poner ambas superficies en contacto.

3.1.3 Caracterización física de los microchips de PDMS

La caracterización física de los microchips nos permite conocer exactamente el ancho y la altura de los canales obtenidos en las réplicas de PDMS.

Para ello, se realizaron cortes diagonales sobre los moldes de PDMS antes de ser adheridos al portaobjetos (Figura 3-3) y la sección obtenida se observó al microscopio con

el objetivo 10X (Leica, NA = 0.25) tomándose fotografías por triplicado con la cámara Phantom (ver sección 3.4). Se analizaron las fotografías con el programa Image J (National Institutes of Health) estableciendo una relación entre el número de píxeles y la longitud del microchip. El programa Image J se calibró utilizando una fotografía con el objetivo 10X (Leica, NA=0.25) de una retícula microscópica con dimensiones conocidas.

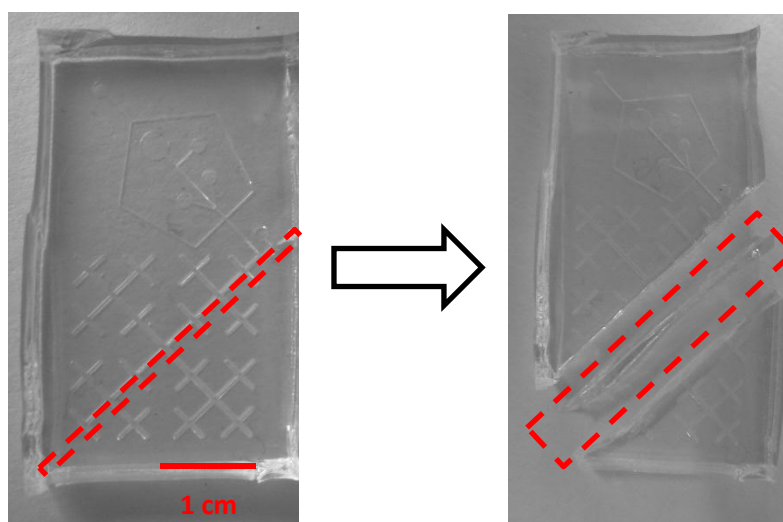


Figura 3-3. Ejemplo de cortes realizados sobre microchips de PDMS para su caracterización.

3.2 Formación de microgotas

El diseño del microchip utilizado, basado en trabajos anteriores en el laboratorio ³⁷, contiene un pentágono en el cual se introducen las diferentes fases al microchip: fase acuosa (compuesta por dos flujos de disoluciones en fase acuosa y un flujo de HPLC) y una fase orgánica compuesta por aceite mineral con 2 % m/m de Span 80 (Sigma- Aldrich) (Figura 3-4).

La fase acuosa se introduce en la parte interna del pentágono mientras que la fase orgánica en la parte externa. Ambas fases viajan por sus respectivos canales de tal forma que se intersectan en la parte inferior del pentágono provocando la formación de

microgotas de fase acuosa dispersas en la fase orgánica (Figura 3-4). Una explicación más detallada se encuentra en la sección 4.2.

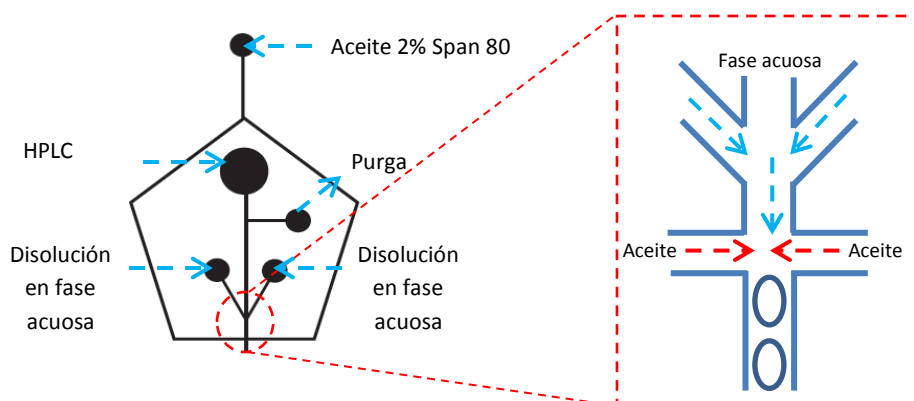


Figura 3-4. Diseño del pentágono para inyección de disoluciones y formación de microgotas en el microchip utilizado para el desarrollo de este proyecto. Se hace un acercamiento a la intersección entre los canales de la fase acuosa y los canales de la fase orgánica. En este punto se lleva a cabo la formación de microgotas mediante el corte por dos flancos de la fase acuosa el aceite.

3.2.1 Inyección de disoluciones

Inyección de fase acuosa

El HPLC (HPLC, LC-20AB, Shimadzu) se conectó al microchip introduciendo el extremo del tubo de salida del equipo en la perforación superior de la parte interna del pentágono ($d = 1.5 \text{ mm}$). El flujo proveniente del HPLC normalmente es muy alto ($6000 \mu\text{L/h}$) en comparación con los demás flujos en la fase acuosa ($< 110 \mu\text{L/h}$) y para contrarrestar este efecto se tiene una salida que corresponde a una purga.

La purga disminuye el flujo proveniente del HPLC succionando parte del líquido antes de que se mezcle con las otras disoluciones. Para ello, se conectó el extremo de un tubo flexible (Diámetro interno = 0.56 mm , Diámetro externo = 1.07 mm , PTFE, Cole Parmer) a la entrada de purga en el microchip, el otro extremo del tubo se unió a una jeringa de 20 mL marca BD. La jeringa se colocó en una bomba (NE-1000, New Era) que permitía jalar el embolo de la jeringa succionando a un flujo de $5940 \mu\text{L/h}$. De tal forma que el flujo de HPLC después de la purga se disminuye hasta $60 \mu\text{L/h}$.

Las demás disoluciones de la fase acuosa en todos los casos se colocaron en jeringas de 1 mL marca BD unidas por la aguja a un extremo de tubo PTFE y el otro extremo del tubo se introdujo en una de las perforaciones del microchip uniendo la jeringa con el microchip. Finalmente, las disoluciones se inyectaron gradualmente mediante bombas (NE-1000, New Era).

Inyección de fase Orgánica

De la misma manera se introdujo la fase orgánica en la parte superior externa del pentágono (Figura 3-4). Para la fase orgánica se utilizó aceite mineral con 2 % m/m de Span 80 (Sigma-Aldrich).

3.2.2 Tiempo de residencia de las gotas en el microchip

Se tomó un video de las gotas recién formadas y con ayuda del software PCC 2.2 (AMETEK, Materials Analysis Division) se determinó la velocidad de las gotas en la recta inicial del diseño de fractales. Una vez obtenida la velocidad es posible determinar cuanto tiempo tarda en llegar una gota a cierto punto del microchip si se conoce la distancia recorrida según la siguiente ecuación.

$$t_{res} = \frac{\text{Distancia recorrida}}{v_{gotas}}$$

Por lo tanto, conociendo la velocidad de las gotas y la distancia recorrida en cada punto del microchip se determinó el tiempo de residencia de las gotas en cada curva utilizando una hoja de cálculo. En este punto se prestó especial atención en el centro del microchip, debido a que en este punto el diseño de fractales permite obtener información suficiente y relevante de cuatro tiempos significativamente diferentes de una reacción que sucede dentro del microchip (Figura 3-5). Los valores obtenidos dependen de los flujos utilizados y se reportan en la sección 4.3 de resultados y discusión.

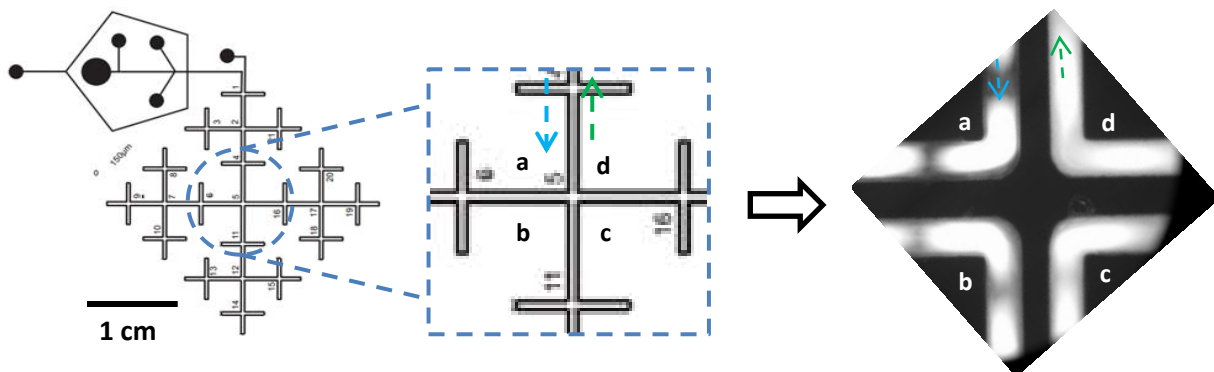


Figura 3-5. Se observa un acercamiento a la cruz cinco de microchip, este corresponde al centro del diseño de fractales. En este punto se determinó el tiempo de residencias de las gotas para cada una de las curvas presentes. Las flechas indican la dirección del flujo. Flecha azul gotas en la curva con menor tiempo de residencia, flecha verde gotas en la curva con mayor tiempo de residencia.

3.3 Arreglo experimental para la medición de la fluorescencia

Los ensayos llevados a cabo en este trabajo se realizaron mediante el seguimiento de 4-MU dentro de los microchips. 4-MU es una molécula con propiedades fluorescentes y presenta un máximo de absorción a 360 nm y un máximo de emisión a los 450 nm.

Para inducir la fluorescencia de 4-MU en microchips se colocó el microchip en un microscopio de fluorescencia (Leica, DMI3000-B) y se proyectó luz sobre los canales del microchip a través del objetivo (20X, Leica, NA = 0.3) del microscopio de la siguiente manera: la luz se generó en una lámpara (PhotoFluor II, Chroma, 89 North) que produce un abanico de longitudes de onda entre el visible y el ultravioleta. La luz se dirige hacia el microscopio, a través de un cable de fibra óptica, entra al microscopio y pasa a través de un cubo de fluorescencia DAPI-50LP-A (Semrock, Inc.). Los componentes del cubo (filtro de excitación, filtro de emisión y espejo dicróico) tienen características especiales para la medición de la fluorescencia de 4-MU y sus espectros de transmitancia se muestran en la Figura 3-6.

Filtro de excitación (FF01-377/50, BrightLine). La línea morada en la Figura 3-6 muestra el espectro de transmitancia del filtro de excitación. El filtro solo permite el paso de luz en un intervalo de 350 y 400 nm, que corresponde a la región de excitación de la 4-MU (superficie morada en Figura 3-6).

Espejo dicroico (FF409-DI03, BrighLine). La línea azul en la Figura 3-6 muestra el espectro de transmitancia de este espejo, el cual refleja toda la luz con longitudes de onda menores a 409 nm y permite el paso por encima de esta longitud de onda. La luz reflejada se orienta hacia la muestra a través del objetivo del microscopio. Se induce la fluorescencia de 4-MU en el microchip y parte de la luz que emite (superficie azul en Figura 3-6) regresa al espejo a través del objetivo.

Filtro de emisión (FF02-409/LP). Este filtro absorbe longitudes de onda menores a los 409 nm y permite el paso de longitudes de onda mayores (línea verde, Figura 3-6).

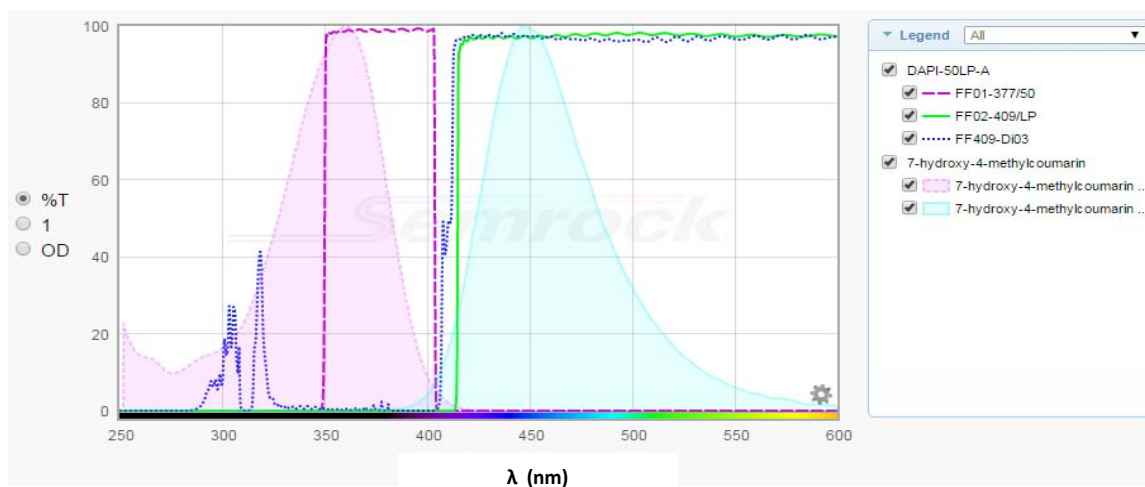


Figura 3-6. Espectros de transmitancia para el juego de filtros y espejos utilizados en el microscopio de fluorescencia así como espectro de absorción y emisión para 4-MU. Línea morada: transmitancia del filtro de excitación. Línea azul: transmitancia del espejo dicroico. Línea verde: transmitancia filtro de emisión. Superficie morada: espectro de absorción de 4-MU. Superficie verde: espectro de emisión 4-MU.

3.4 Cámara Phantom

El análisis de las microgotas en este trabajo para la obtención de datos fue a través del análisis de videos de las gotas en microchips. Para ello, se utilizó una cámara de video Phantom (Miro M110, AMETEK) acoplada al microscopio de fluorescencia.

La cámara Phantom es una cámara de alta velocidad que permite capturar hasta 5000 cuadros por segundo. El software PCC 2.2 es el controlador de la cámara, entre otras cosas nos permite manipular 3 parámetros importantes para la obtención de videos:

Resolución. Es el tamaño de la imagen en pixeles que nos da la cámara.

Velocidad de captura (\bar{u}_{Cap}). Corresponde al número de cuadros por segundo que captura la cámara.

Tiempo de exposición (t_{exp}). Corresponde al tiempo que permanece abierto el obturador de la cámara para tomar un cuadro.

Estos parámetros se optimizaron para cada experimento como se especificará más adelante.

3.5 Curva de calibración de la fluorescencia de la 4-MU

Preparación de disoluciones.

Se pesaron 2.27 mg de 4-metilumbeliferona (4-MU, MM = 176.17 g/mol, Sigma Aldrich, M1381) se disolvieron en 10 mL de un buffer que a partir de este momento se maneja como "Buffer de Fosfatos" (50 mM, pH 7, 0.2 % BSA, 150 mM KCl) al 10 % de metanol y se obtuvo un stock de concentración de 1.29 mM. Del stock se tomaron 77.5 μ L y 232.5 μ L ambos volúmenes se llevaron a un ml con el Buffer de Fosfatos. Se obtuvieron disoluciones de trabajo 100 μ M y 300 μ M, respectivamente.

Obtención de la curva de calibración de fluorescencia de las gotas en función de la concentración de 4-MU.

La curva de calibración se obtuvo dentro de microchips acoplados al equipo de HPLC. El flujo del HPLC, la fase móvil, fue de 0.1 mL/min y se compuso por 85% H₂O y 15 % MeOH. Además del flujo de HPLC se introdujo un flujo de 180 μ L/h de la fase orgánica para llevar a cabo la formación de microgotas. El flujo de HPLC y aceite se mantuvieron constantes durante todo el experimento.

Las disoluciones de trabajo de 4-MU y un Buffer de Fosfatos se inyectaron mediante bombas y jeringas de 1 mL según el arreglo en la Figura 3-7.

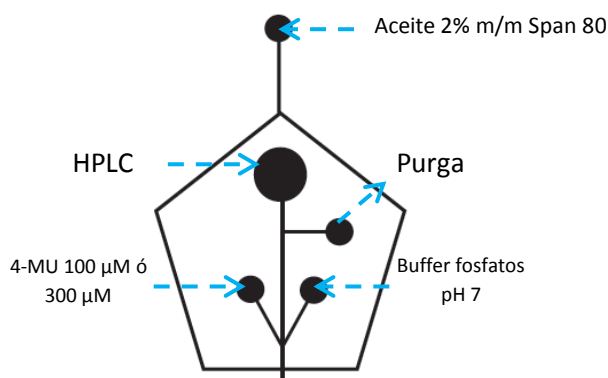


Figura 3-7. Arreglo para inyección de disoluciones al microchip durante los experimentos para la obtención de curvas de calibración.

Como se muestra en la Tabla 3-2, con ayuda de las bombas se fue variando el flujo de 4-MU y buffer manteniendo siempre un flujo total de 180 μ L/h en la fase acuosa, recordar que el flujo de HPLC en esta zona es de 60 μ L/h.

Tabla 3-2. Flujos de disoluciones de 4-MU y buffer de reacción utilizados para la obtención de curvas de calibración. En todas las condiciones se mantuvo constante un flujo de 60 $\mu\text{L/h}$ de HPLC en la zona de formación de microgotas así como un flujo de 180 $\mu\text{L/h}$ de la fase orgánica.

Disolución 4-MU 300 μM			Disolución 4-MU 100 μM		
Flujo 4-MU ($\mu\text{L/h}$)	Flujo Buffer ($\mu\text{L/h}$)	[4-MU] en microgotas (μM)	Flujo 4-MU ($\mu\text{L/h}$)	Flujo Buffer ($\mu\text{L/h}$)	4-MU en microgotas (μM)
90	30	150	95	25	52.6
75	45	125	83.5	36.5	46.8
60	60	100	72	48	40
45	75	75	57	63	31.6
			37	83	20
			20	100	11.1
			10	110	5.6

3.5.1 Obtención y análisis de videos

Tracker 4.92 es un software libre para análisis de videos desarrollado por Douglas Brown y entre otras cosas permite analizar regiones RGB (Red-Green-Blue) en una determinada sección en la imagen de un video, de tal forma que se puede analizar el cambio en la intensidad de luz a través del tiempo en el video.

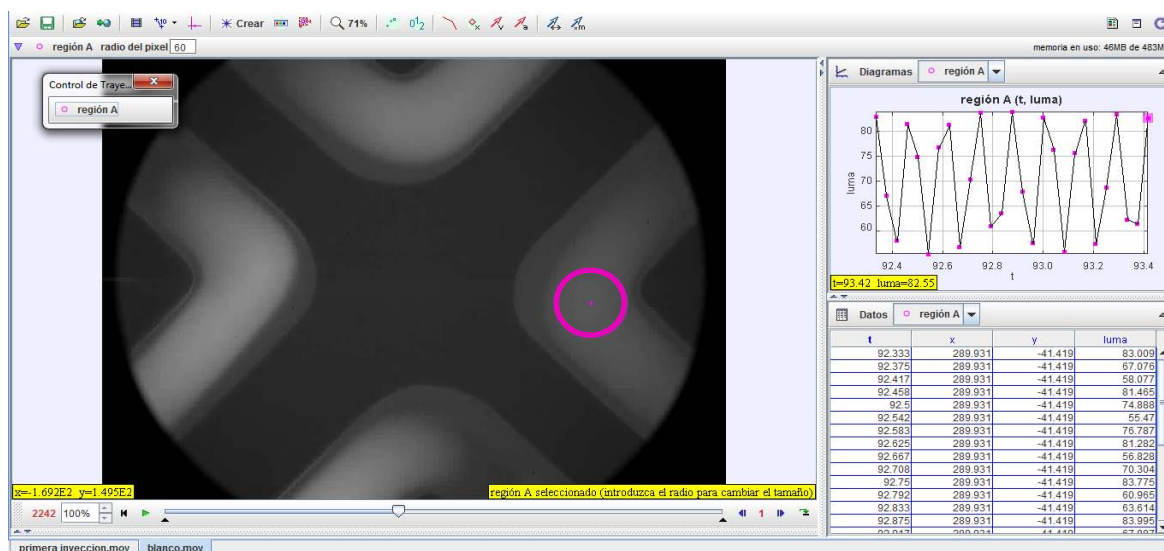


Figura 3-8. Interfaz de Tracker. El círculo rosa que se observa en uno de los canales del video delimita la región RGB que se analizara durante todo el video. En este punto corresponde a la "curva a" del centro del microchip. En la esquina superior derecha de la imagen se observa el gráfico generado por Tracker, debajo se encuentra la tabla de datos que se genera, un dato por cada medición.

Para cada concentración de 4-MU se tomaron videos de 5 s con la cámara Phantom en la cruz 5 del microchip utilizando los parámetros que se muestran en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3. Parámetros de la cámara Phantom utilizados para la obtención de videos durante la obtención de curvas de calibración.

Resolución	768x480 pixeles
\bar{v}_{cap}	40 fps
t_{exp}	24 000 μs

Para el análisis de videos se utilizó un círculo de 60 pixeles de radio para analizar el comportamiento de fluorescencia de las gotas en cada una de las curvas en la cruz 5 durante los 5 s de video.

Todos los resultados obtenidos con Tracker fueron tratados por el programa en Wolfram Mathematica desarrollado por la estudiante de Doctorado Aimme Torres de nuestra Facultad. Dicho programa permitió identificar todos los máximos en la serie de datos obtenidos en Tracker, eliminando señales no deseadas y mejorando los resultados, como se explica a continuación.

Tracker toma una medición cada cuadro del video ($\bar{v}_{cap} = 40$ fps) de tal forma que para generar el perfil de una sola gota se necesitan realizar mediciones en 6 pasos o bien 6 cuadros consecutivos (Figura 3-9):

Paso 1. En este momento Tracker realiza una medición en la intersección entre dos gotas, de tal forma que obtiene la luz del aceite y tensoactivo, sobre la misma imagen (Figura 3-9, Paso 1) en la esquina superior derecha se observa un punto morado en el gráfico que muestra este valor de fluorescencia para la intersección entre dos gotas.

Paso 2. La medición se realiza en la cabeza de una gota. Debido a la velocidad de la gota la luz se difumina en las partes externas de la gota y aumenta en la parte central.

Paso 3. La medición se realiza en la parte central de la gota. En este punto se obtiene la fluorescencia máxima en la gota y es el valor que más nos interesa obtener. Debido a que es el dato que mejor describe la fluorescencia en la gota.

Paso 4. La velocidad a la cual se tomó el video nos permite obtener dos mediciones en la parte central de la gota con valores muy similares de URF.

Paso 5. Se realiza la medición en la cola de la gota el fenómeno es el mismo que en el paso 2. La fluorescencia disminuye con respecto al centro debido a que la luz se difumina en los extremos.

Paso 6. Se vuelve a realizar una medición entre una gota y otra obteniéndose nuevamente el valor de la luz en el aceite.

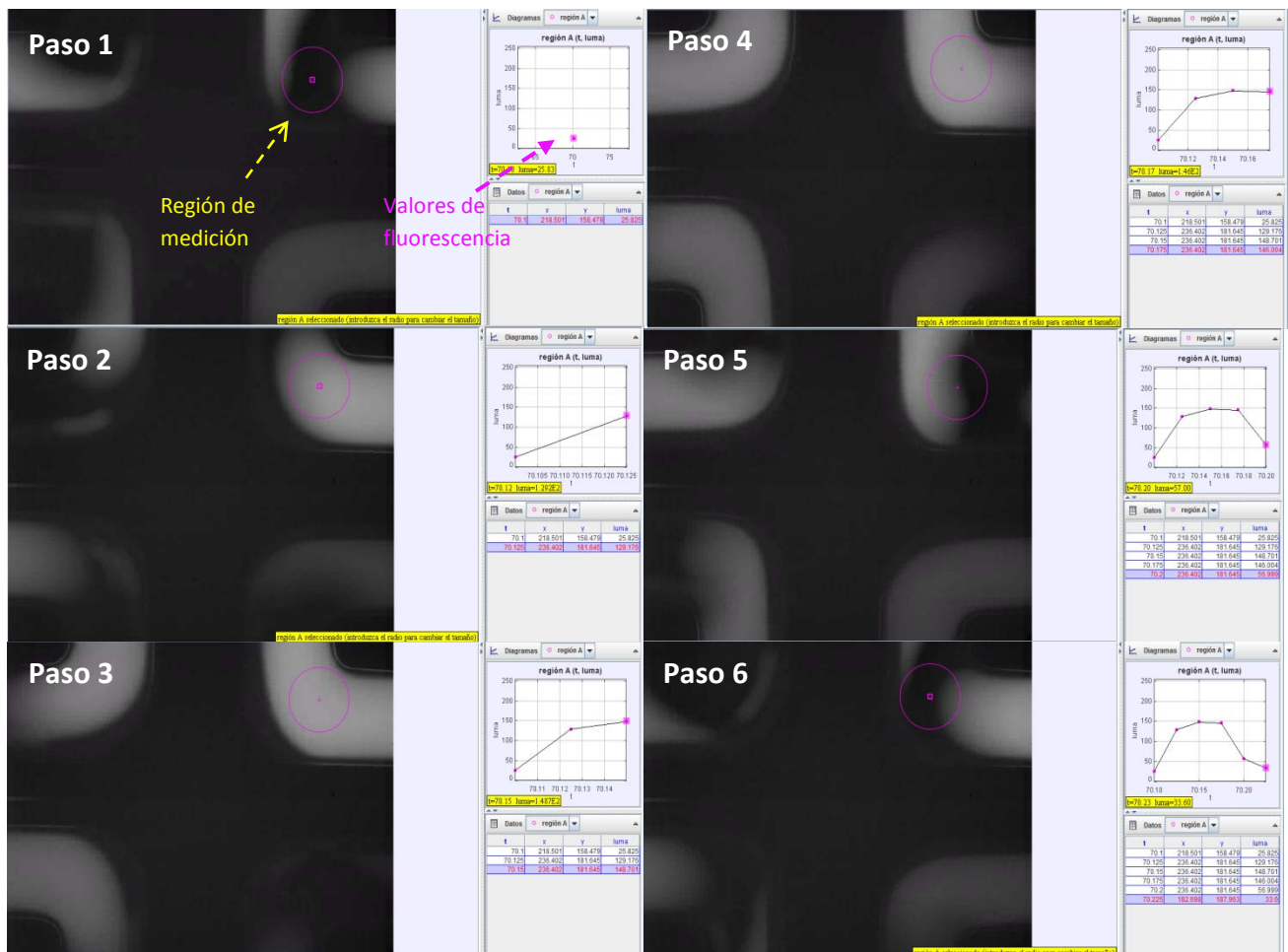


Figura 3-9. Análisis de videos con Tracker. Se muestran el número de pasos necesarios para obtener el perfil de una gota que pasa por alguna de las curvas en la Cruz 5 del microchip. En la esquina superior derecha de cada paso se muestra la gráfica de intensidad luminosa según la sección de la gota sobre la cual se este realizando la medición.

Una vez que se analiza por completo un video con Tracker se obtiene el perfil de fluorescencia de las gotas como se muestra en la Figura 3-10. Los puntos que son de nuestro verdadero interés son aquellas mediciones en el centro de la gota donde el valor de la fluorescencia es máximo.

El programa desarrollado en Wolfram Mathematica permite obtener los valores máximos en una serie de datos. A grandes rasgos este programa compara 3 puntos consecutivos de la serie de datos. Obtiene la pendiente entre el primero y el segundo así como la pendiente entre el segundo y el tercero. Si entre estos puntos existe un cambio de pendiente de positivo a negativo el programa registra un máximo y guarda las coordenadas del punto medio, si el cambio es de negativo a positivo registra un mínimo y guarda las coordenadas del punto medio, si no hay cambio de pendiente el programa avanza un punto y repite el procedimiento.

En la Figura 3-10 se muestran unidos por una línea verde los datos arrojados por Tracker, y en rojo los puntos obtenidos mediante Wolfram Mathematica. Se obtiene la intensidad de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF) en función del tiempo.

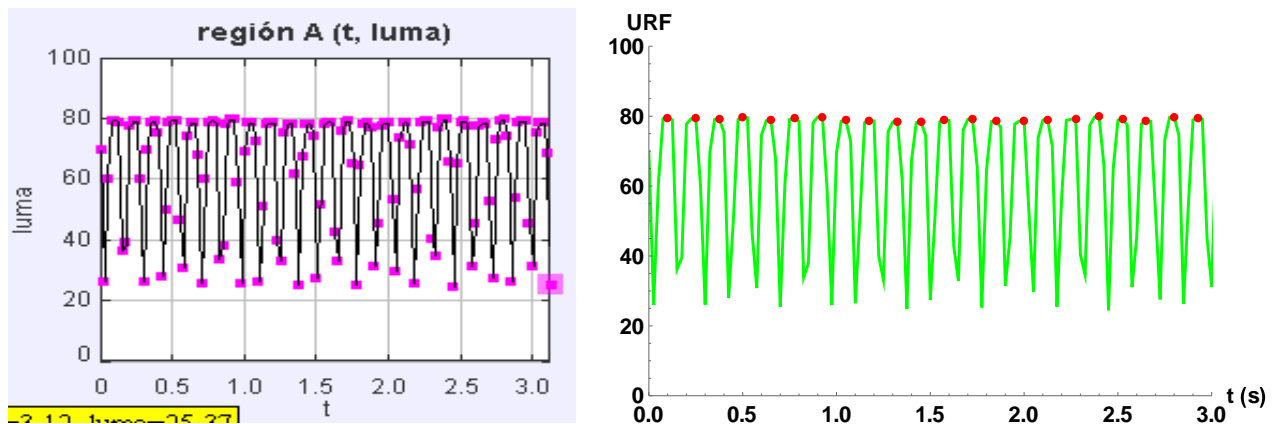


Figura 3-10. A la izquierda se observa la gráfica generada por Tracker tras el análisis de 3 s de video. A la derecha se observa los resultados obtenidos con Mathematica, los puntos rojos en esta grafica corresponden a los máximos de fluorescencia de cada gota.

3.6 Ensayos Enzimáticos en microchips

Preparación de disoluciones

Las disoluciones de neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Sigma Aldrich N2876-100UN) así como del sustrato ácido 2-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico, 4-MUNANA (MM= 489.41 g/mol, Sigma Aldrich M8639) se prepararon en un Buffer de Fosfatos 50 mM, pH 7, con 0.2 % de BSA y 150 mM de KCl. Se pesaron 4.58 mg de neuraminidasa, se disolvieron en 1.0 mL quedando una concentración 13.74 U/mL del stock de neuraminidasa, se tomaron 247.5 μ L de stock y se llevaron a 1.0 mL obteniéndose una disolución 3.4 U/mL. De 4-MUNANA se pesaron 5.71 mg, se disolvieron en 1.0 ml quedando un stock de 12 mM. Se tomaron 37.5 μ l y se llevaron a 1.5 mL obteniéndose la disolución de trabajo de 300 μ M, la cual corresponde a 3 veces la K_m según trabajos realizados anteriormente en el laboratorio ³⁸.

Metodología

La cinética enzimática se midió dentro de microchips acoplados al HPLC. El microchip se observó en un microscopio de fluorescencia con el objetivo 20X (Leica, NA = 0.3), los flujos de HPLC y aceite fueron iguales a los utilizados en la curva de calibración.

Las disoluciones de enzima (3.4 U/mL) y sustrato (300 μ M) se introdujeron en jeringas de 1 mL se inyectaron al microchip a un flujo constante de 60 μ L/h según lo dispuesto en la Figura 3-11.

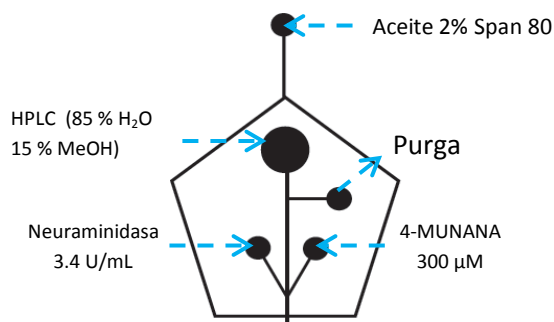


Figura 3-11. Arreglo de inyección de disoluciones en microchips para los experimentos de la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA asistida por neuraminidasa.

Obtención y análisis de videos

Se tomaron videos en la cruz 5 del microchip con la cámara Phantom, se utilizaron los mismos parámetros que en la curva de calibración (Tabla 3-3). Los videos se analizaron con Tracker y los resultados obtenidos se trataron con Wolfram Mathematica de la misma manera que se hizo para la curva de calibración.

3.7 Caracterización de un control positivo de inhibición (Zanamivir)

Para la caracterización de un control positivo para la inhibición de la actividad de neuraminidasa se utilizó Relenza[®], el cual es un fármaco comercial utilizado para el tratamiento de la influenza y que contiene como compuesto activo Zanamivir. Dicho compuesto es un inhibidor, con licencia a nivel mundial, de la enzima neuraminidasa de algunas cepas del virus de la influenza. Así mismo su actividad inhibidora de la neuraminidasa de *C. perfringens* fue evaluada durante el trabajo de tesis del QFB Enrique Álvarez³⁸.

Preparación de disoluciones.

La preparación de disoluciones de enzima y sustrato se hizo de la misma manera que la sección anterior. Se utilizaron las mismas concentraciones para su inyección en microchips.

Según las especificaciones en la caja del producto cada dosis de Relenza[®] es de 25 mg, de los cuales 5 mg corresponden a la masa de Zanamivir (332.32 g/mol), el resto corresponde al excipiente. Así mismo la solubilidad de zanamivir en agua a 25 °C, temperatura promedio de trabajo en el laboratorio, es de 20 mg/mL³⁹. Por lo tanto se tomaron dos dosis de Zanamivir y se disolvieron en 500 µL de agua destilada obteniéndose una disolución saturada de Zanamivir de 20 mg/mL.

Metodología

Se realizaron ensayos de inhibición en microchips acoplados al HPLC manteniendo constantes todos los flujos en el microchips como se indican en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4. Flujos utilizados de las disoluciones en el microchip para todos los ensayos enzimáticos realizados en este trabajo.

Disolución	Flujo (μL/h)
Neuraminidasa (3.4 U/mL)	60
4-MUNANA (300 μM)	60
HPLC	6000
Purga	5940
Aceite mineral 2% Span 80	180

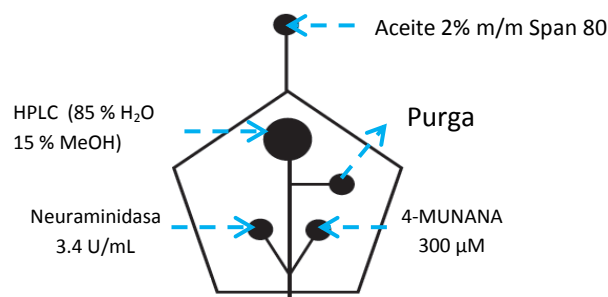


Figura 3-12. Arreglo para la inyección de disoluciones en microchip durante los experimentos con Zanamivir.

3.7.1 Inyección de Zanamivir en HPLC

Para la separación en el HPLC se utilizó una columna fase reversa C18 (Raptor™ ARC-18, 2.7 μm, 50 x 2.1 mm, Restek), la fase móvil se compuso por A (H₂O) y B (MeOH). Se utilizó un programa isocrático de A 15 % y B 85 % durante diez minutos. Se inyectaron 20 μL de muestra a un flujo constante de 0.1 mL/min y se realizó la detección a 270 nm.

Obtención y análisis de videos

En cuanto un compuesto comienza a emitir una señal en el detector de HPLC tarda un minuto con treinta segundos en recorrer el sistema de HPLC pasar por la tubería de salida y entrar al microchip acoplado. Considerando esto se tomaron videos de 4 min en la cruz cinco del microchip 1 minuto con 30 segundos después de que se observaba la señal de Zanamivir en el detector del HPLC. Los videos fueron tomados con la cámara Phantom utilizando los parámetros establecidos en la Tabla 3-5. Los videos fueron tratados con Tracker y Mathematica para la obtención de resultados.

Tabla 3-5. Parámetros utilizados para la obtención de videos durante los ensayos con Zanamivir

Resolución	768x480 pixeles
\bar{v}_{cap}	24 fps
t_{exp}	41 000 μs

3.8 Identificación de inhibidores en el extracto natural

Umckaloabo (UMK)

Se trabajó con un producto comercial de libre venta conocido como Umckaloabo® (UMK, Farmasa Schwabe), el cual es un extracto de la raíz *Pelargonium sidoides*. Se realizaron ensayos de inhibición en microchips acoplados al HPLC manteniendo constantes todos los flujos en el microchip según lo dispuesto en la Tabla 3-4 y en la Figura 3-12 en la sección de Zanamivir.

Preparación de disoluciones

La preparación de disoluciones de enzima y sustrato se llevó a cabo de la misma manera que en la sección anterior, se utilizaron las mismas concentraciones para su inyección en microchips.

Umckaloabo (UMK)

El producto se obtuvo en presentación de grageas con 20 mg de extracto, para la preparación de la muestra se tomó una gragea se retiró la recubierta mediante raspados finos, se trituró, pesó (321.48 mg) y disolvió en 5 mL de agua destilada. La disolución resultante se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min, se pasó tres veces a través de filtros de 0.2 μm (Spartan 13/0.2 RC, Whatman) quedando una disolución final de concentración 3.2 mg/mL lista para su inyección en HPLC.

3.8.1 Separación de UMK en HPLC

Para la separación de los compuestos de UMK se utilizó la misma instrumentación que la separación de Zanamivir. La fase móvil se compuso por A (H₂O) y B (MeOH) con el siguiente gradiente de elución: 0 min-20 min (15 %B), 20 min-25 min (15 %B-100 %B), 25 min-35 min (100 %B). Se inyectaron 20 µL de muestra de UMK con un flujo constante de 0.1 mL/min, con un detector UV en un canal a 320 nm y un segundo canal a 240 nm.

Obtención y análisis de videos.

La obtención de videos y el análisis se realizó en la cruz 5 del microchip en las mismas condiciones que se han venido explicando. Los videos se tomaron con la cámara Phantom utilizando los mismos parámetros que en la curva de calibración (Tabla 3-3). Se obtuvieron videos para cada pico predominante de la separación de UMK, la extensión de los videos fue alrededor de 4 min dependiendo del ancho de la base de cada pico.

Se realizaron experimentos por triplicado desde la inyección hasta la captura de videos para cada pico predominante.

3.8.2 Análisis de fluorescencia en compuestos de UMK

Se inyectaron 20 µL de UMK a una concentración de 3.2 mg/mL, se acopló la salida de HPLC a un microchip. En el microchip no se introdujeron disoluciones de enzima y sustrato, en lugar de ellas se introdujo Buffer de Fosfatos (Figura 3-13), se llevó a cabo la formación de microgotas y el análisis de ellas en el centro del microchip.

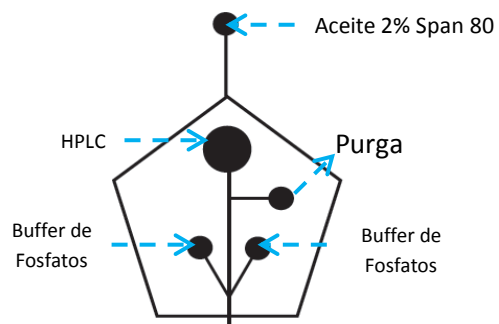


Figura 3-13. Arreglo para inyección de disoluciones en microchip durante los experimentos para el análisis de fluorescencia en los compuestos de UMK.

4 Resultados y Discusión

4.1 Fabricación de Microchips

Mediante la técnica de fotolitografía suave se lograron obtener réplicas en PDMS de los diseños de microchip para llevar a cabo ensayos enzimáticos según lo descrito en la sección de desarrollo experimental.

4.1.1 Caracterización física de réplicas en PDMS

La caracterización física de los microchips de PDMS consiste en determinar las dimensiones exactas de los microcanales. Para ello se realizaron cortes a las réplicas con bisturí como los que se muestran en la Figura 4-1(A). Dichos cortes se observaron al microscopio con un objetivo 10X y se tomaron fotos en distintas secciones del corte. Las imágenes se analizaron con el programa Image J previamente calibrado Figura 4-1 (B) y los resultados se resumen en la Tabla 4-1.

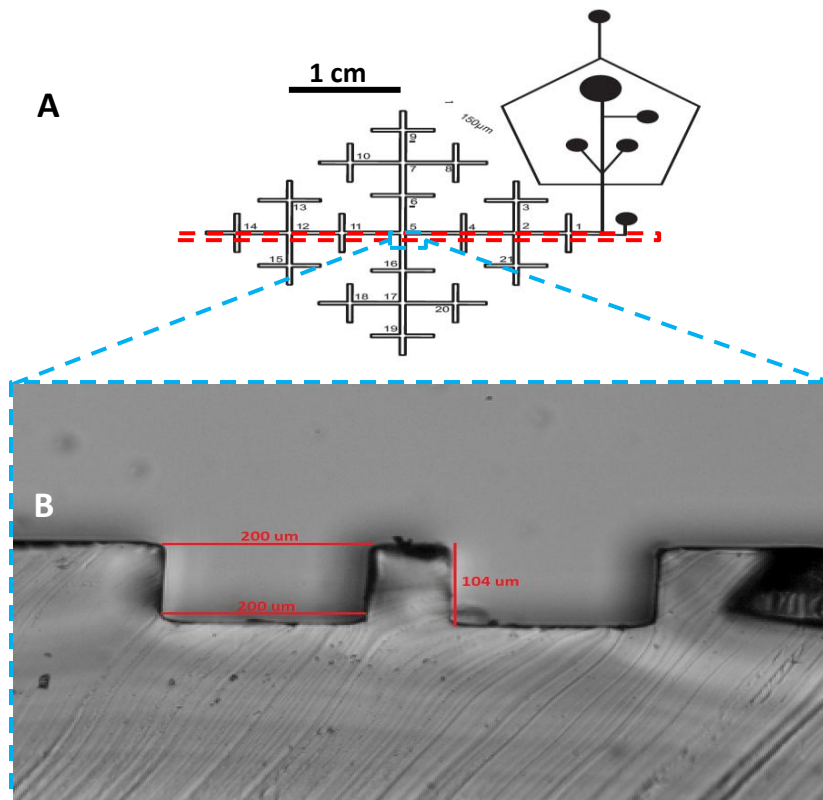


Figura 4-1. Caracterización física de las réplicas en PDMS de los microchips utilizados en este trabajo. (A) El cuadro delimitado por la línea roja punteada es un ejemplo de corte realizado sobre las réplicas de PDMS y la sección que fue fotografiada con la cámara Phantom montada sobre el microscopio invertido, se observó la imagen con el objetivo 10X (B) Foto obtenida, con la cámara Phantom, de una sección del corte observado al microscopio, las líneas rojas sobre la imagen muestran los resultados de la caracterización del microchip con Image J.

Tabla 4-1. Resultados de la caracterización de microchips correspondientes al análisis de 5 puntos diferentes en el microchip.

	Valor determinado (μm)	Desviación estándar (μm)
Ancho de la parte superior	200.8	2.6
Ancho de la parte inferior	199.7	3.7
Altura	104	1.1

Se pretendían obtener canales rectangulares de 150 μm de ancho por 100 μm de altura. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 4-1 el ancho de los canales es 50 μm más grande que el valor esperado lo que corresponde a un error del 33 %. Es muy probable que este ensanchamiento se deba a una sobreexposición a la luz UV durante el proceso de fabricación del molde maestro ¹¹.

Para fines prácticos, el ensanchamiento de los canales no significa un problema para el desarrollo del proyecto. Recordando la ecuación de flujo

$$t_{res} = \frac{A * l}{Q}$$

Donde:

t_{res} = tiempo de residencia del fluido en el canal

Q : Flujo A : Area del canal l : longitud del canal

Si el ancho del canal es mayor, el área del canal también lo es. De tal forma que si el área aumenta, el tiempo de residencia de las microgotas también lo hará. Es decir, para los objetivos de este proyecto obtener un canal con dimensiones mayores favorece la disminución de la velocidad de las microgotas dentro del chip y, por lo tanto, el aumento del tiempo de residencia y esto permite el análisis de la reacción enzimática durante un tiempo más prolongado en los microchips. Así mismo si las gotas tienen un tiempo de

residencia prolongado no es necesario agregar grandes cantidades iniciales de enzima y sustrato para poder detectar el producto acumulado, 4-MU.

4.2 Descripción y funcionamiento del microchip

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó un diseño de microcanales de 200 μm de ancho por 100 μm de altura (Figura 4-2 A). El diseño se conforma por una sección de introducción de disoluciones (Figura 4-2 D) la cual corresponde a un acercamiento de la Figura 4-2 A. El arreglo de este pentágono está dispuesto de tal forma que un flujo de fase orgánica intersecte por los dos flancos a un flujo de fase acuosa provocando la formación de microgotas de agua dispersas en una fase continúa de aceite (Figura 4-2 B).

La parte interna del pentágono corresponde a la introducción de la fase acuosa. Esta se compone por tres flujos diferentes: un flujo de HPLC y dos flujos de disoluciones en fase acuosa (estas últimas dependen del experimento a realizar). El extremo de la tubería de salida del equipo HPLC se acopla en la entrada de la parte superior interna del pentágono, introduciendo así el flujo de la fase móvil del HPLC al microchip. Sin embargo, el flujo de HPLC es muy alto (6000 $\mu\text{L/h}$) en comparación con los demás flujos de la fase acuosa (< 100 $\mu\text{L/h}$), por esta razón, se tienen una purga que se encarga de succionar una fracción del flujo de HPLC, de tal forma que, el flujo del HPLC se disminuye hasta ser comparable con los flujos de las otras disoluciones.

La siguiente sección del diseño consiste en un canal de 28 cm de longitud, por la cual viajan las microgotas. El canal tiene una geometría de fractales dispuesta en un área de 4 cm^2 (observe que el canal corresponde a la línea negra más no al espacio delimitado por esta, observar la Figura 4-6 para un mejor entendimiento). La cantidad de giros en este diseño permite acomodar una longitud considerablemente larga del canal en una sección pequeña de área. Así mismo, y no menos importante, los giros en el microchip favorecen la homogenización de las disoluciones que se mezclan en las microgotas.

Como se observa en la Figura 4-2 D la fase orgánica viaja a través de las líneas que dibujan el pentágono y se intersecta con la fase acuosa por dos flancos, formándose microgotas de fase acuosa dispersas en la fase orgánica (Figura 4-2 B). Una vez formadas, las microgotas comienzan a viajar por el diseño de fractales del microchip. Este arreglo, con los flujos utilizados, permite un tiempo total de residencia de las gotas en el microchip de alrededor de 50 s. Así mismo la geometría de fractales del microchip permite analizar en 27 puntos distintos (marcados en la Figura 4-2 A) cuatro gotas diferentes en una misma imagen, cada una de las gotas con un tiempo de residencia diferente.

La Figura 4-2 C muestra la cruz 5 del microchip que corresponde al centro del mismo. En esta sección se pueden analizar cuatro gotas con la mayor diferencia de tiempos de residencia entre ellas, del tiempo del total de residencia de las gotas en el microchip el porcentaje que se ha alcanzado hasta las curvas “a, b, c y d” corresponde a 15 %, 40 %, 65 % y 90 % respectivamente, tal como se muestra en la sección 4.4.

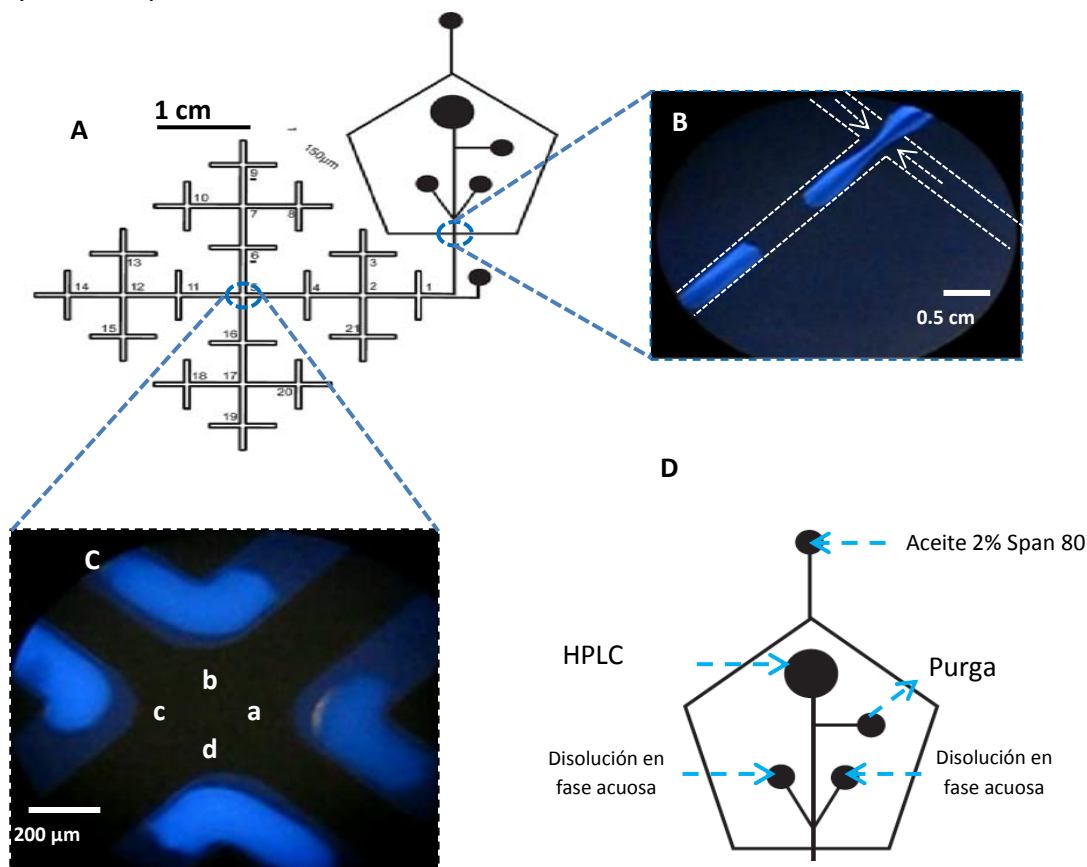


Figura 4-2. (A) Diseño del microchip de fractal utilizado en este trabajo; (B) Formación de microgotas de agua en aceite debido a la intersección ambas fases; (C) Microgotas en la parte central del microchip se señalan las curvas a, b, c y d las cuales corresponden al 15 %, 40 %, 65 % y 90 % respectivamente del tiempo total de residencia de las gotas en el microchip; (D) Diseño para entrada de sustancias dentro del microchip

4.3 Formación de Microgotas

Mediante jeringas, tuberías flexibles PTFE y bombas de infusión se lograron introducir disoluciones dentro de los microchips de PDMS acoplados a un equipo de HPLC. La Figura 4-3 muestra como se montó todo el equipo para llevar a cabo los experimentos.

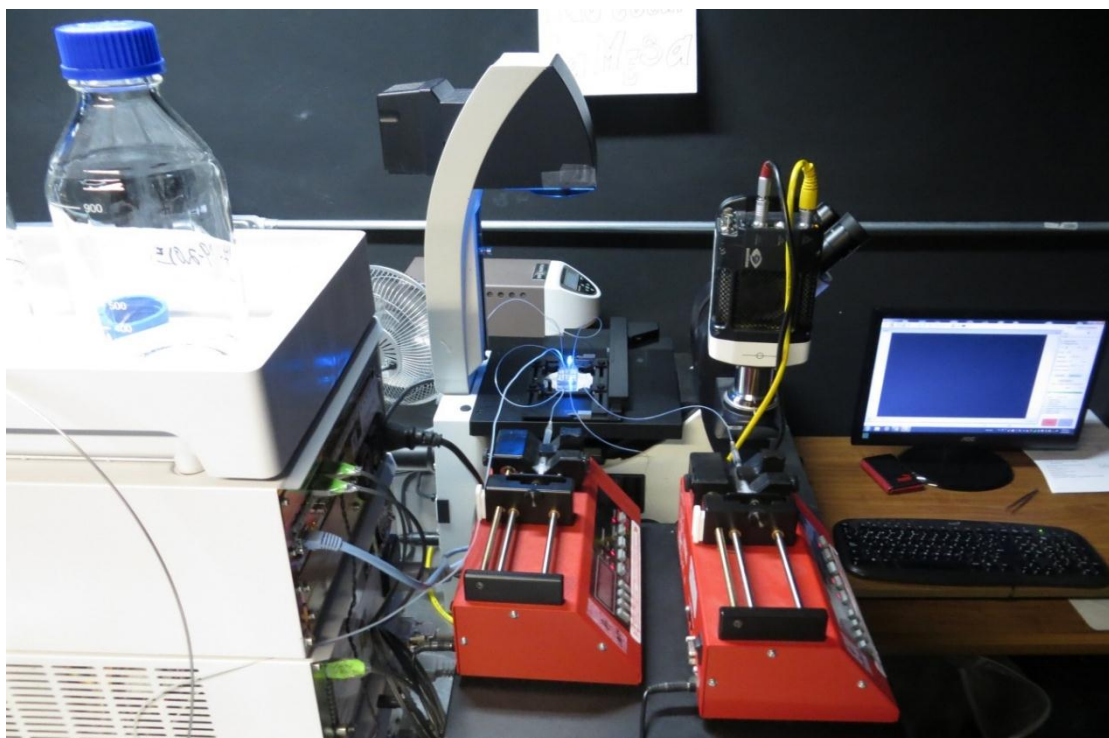


Figura 4-3. Montaje experimental para ensayos en microchips acoplado a un equipo HPLC.

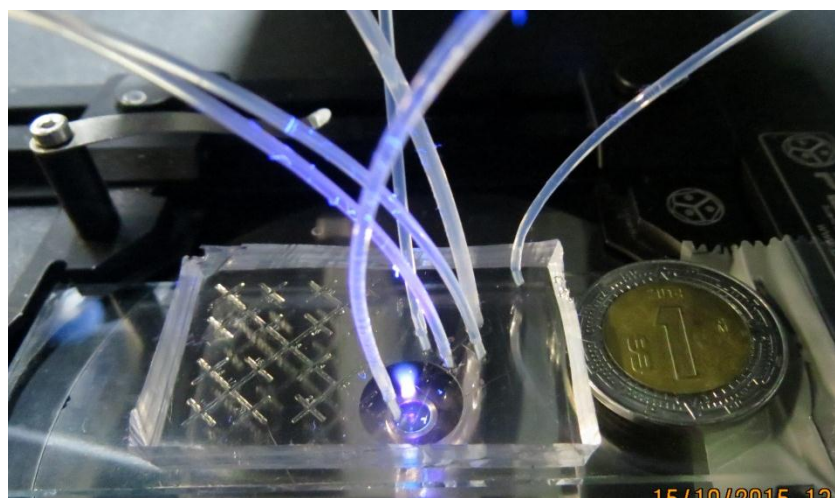


Figura 4-4. Microchip montado en el microscopio con todas las tuberías conectadas para introducción de disoluciones, así como tubería para salida de las mismas.

Una vez obtenidos los microchips, se realizaron pruebas con colorantes para evaluar su correcto funcionamiento. En la Figura 4-5 (A) se puede observar la intersección de los canales de la fase acuosa y los canales de la fase orgánica en la base del pentágono en el microchip. Disoluciones de un colorante azul y uno rojo entran al microchip juntándose con el flujo proveniente del HPLC acoplado al microchip. Se observa como cada componente de la fase acuosa viaja seccionado debido al comportamiento laminar del flujo, donde al principio la difusión es el único fenómeno que puede generar la homogenización.

La fase orgánica, compuesta por aceite mineral con 2% de Span 80, interseca a la fase acuosa por dos flancos favoreciendo la formación de microgotas. Una vez que se forman, las microgotas comienzan su recorrido por la sección de fractales del microchip. Cada giro en el diseño de fractales genera turbulencia en la gota favoreciendo el mezclado de las disoluciones dentro de la misma, ver la Figura 4-5 B.

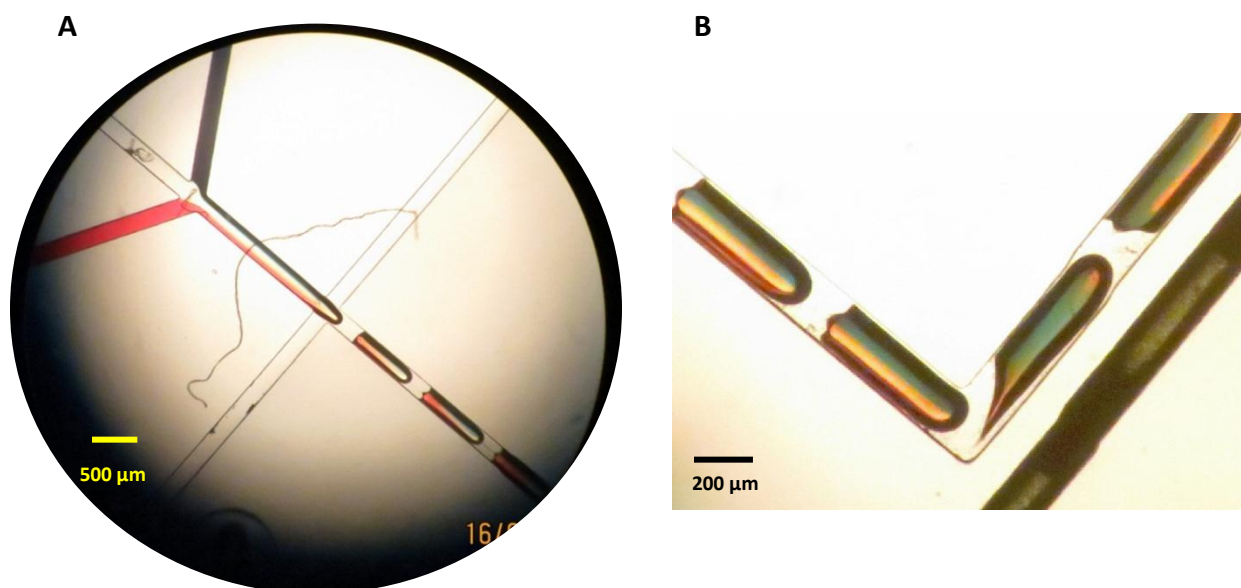


Figura 4-5. (A) Formación de microgotas en el microchip utilizado en el laboratorio. La imagen se observa al microscopio con un objetivo 4X (Leica, NA= 0.1). (B) Se observa como los giros de las gotas dentro de los microchips genera turbulencia favoreciendo el mezclado de las disoluciones dentro de las microgotas. La imagen se observa al microscopio con el objetivo 10X (Leica, NA= 0.25).

4.4 Tiempo de residencia de las gotas en microchips.

Después de varios experimentos de optimización se encontraron las mejores relaciones de flujo entre todas las fases que permitieran estabilizar la purga del microchip y permitir una correcta formación de microgotas. Para todos los experimentos realizados el flujo de la fase orgánica fue de 180 $\mu\text{L/h}$ y el mismo para la suma de los tres flujos que conforman la fase acuosa. A estos flujos se obtuvieron gotas con un volumen promedio de **(7.86 \pm 0.69) nL**. El valor corresponde al promedio de 3 gotas en diferentes puntos del microchip y se calculó considerando que a las gotas como prismas rectangulares que ocupan todo el alto y ancho de los canales, mediante Image J se midió la longitud de las gotas y se determinó el volumen.

Así mismo a los flujos mencionados se determinó la velocidad promedio de las gotas en la recta inicial del microchip con ayuda del programa PCC 2.2 obteniéndose un valor de **(5.8 \pm 0.3) $\times 10^{-3}$ m/s**. Este valor corresponde al promedio de la velocidad de las gotas de tres experimentos independientes. A tal velocidad el tiempo total de residencia de las gotas en el microchip es de 48.28 s. Así mismo, considerando la distancia recorrida de las microgotas para cada una de las curvas en el centro del microchip, se obtiene el tiempo de residencia de las gotas en cada curva y el porcentaje del tiempo total de residencia al cual corresponden, los valores se reportan en la Tabla 4-2 (Figura 4-6).

Tabla 4-2. Tiempo de residencia de las gotas en la cruz cinco del microchip. La velocidad promedio de las gotas corresponde a 5.8×10^{-3} m/s, la longitud total del canal es 28 cm, por lo tanto el tiempo total de residencia de las gotas en el microchip es de 48.28 s.

Curva	Distancia recorrida (mm)	Tiempo de residencia (s)	% del tiempo total de residencia
a	39.9	6.9	15 %
b	109.7	18.9	40 %
c	179.5	30.9	65 %
d	249.3	42.9	90 %

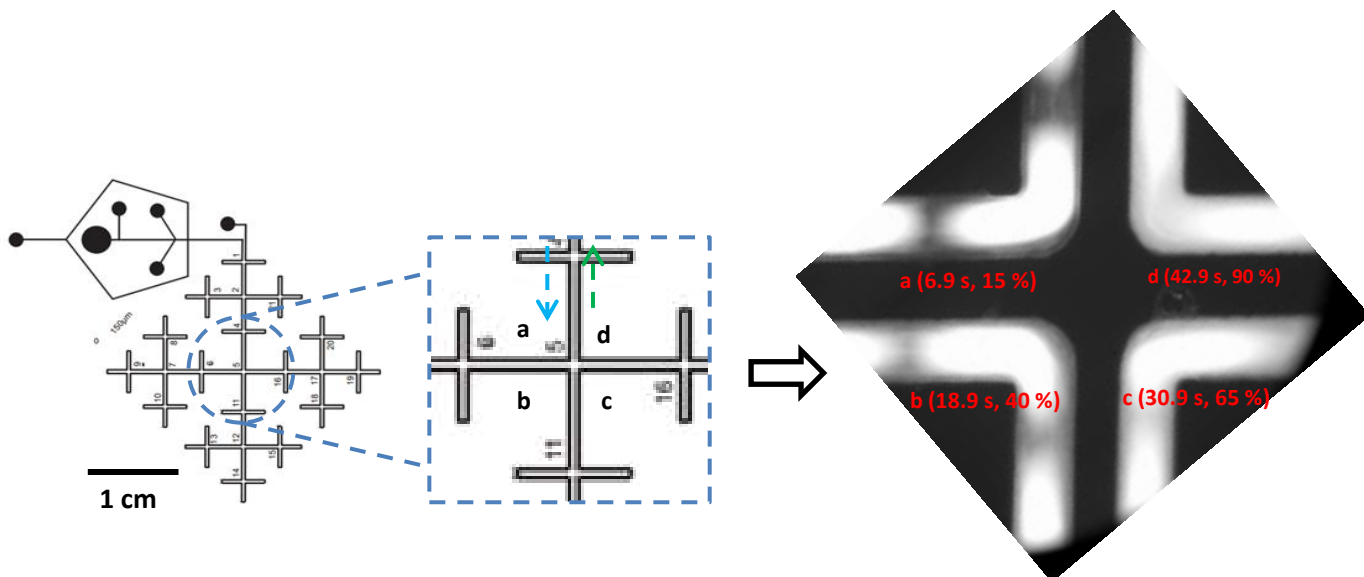


Figura 4-6. Se observa un acercamiento a la cruz cinco de microchip, este corresponde al centro del diseño de fractales. Las flechas indican la dirección del flujo. Flecha azul: gotas en la curva con menor tiempo de residencia, flecha verde: gotas en la curva con mayor tiempo de residencia. En la imagen a la derecha se indica el tiempo de residencia de las gotas para cada una de las curvas en el centro del microchip así como el porcentaje al cual corresponden del tiempo total de residencia de las gotas en el microchip.

4.5 Curvas de Calibración para la fluorescencia de 4-MU

En el microchip acoplado al HPLC se inyectaron disoluciones de 4-MU y Buffer de Fosfatos, se fueron variando los flujos de estas últimas de tal forma que la concentración de 4-MU cambiara en las microgotas pero que el flujo total permaneciera constante. La calibración se llevó a cabo para cada una de las curvas en la cruz 5 del microchip.

4.5.1 Curvas de Calibración

En la Figura 4-7 se puede observar la diferencia en la intensidad de fluorescencia de las microgotas conforme se disminuye la concentración de 4-MU según los flujos aplicados. Es claro como, conforme disminuye la concentración de 4-MU en la microgotas, la intensidad de fluorescencia también lo hace.

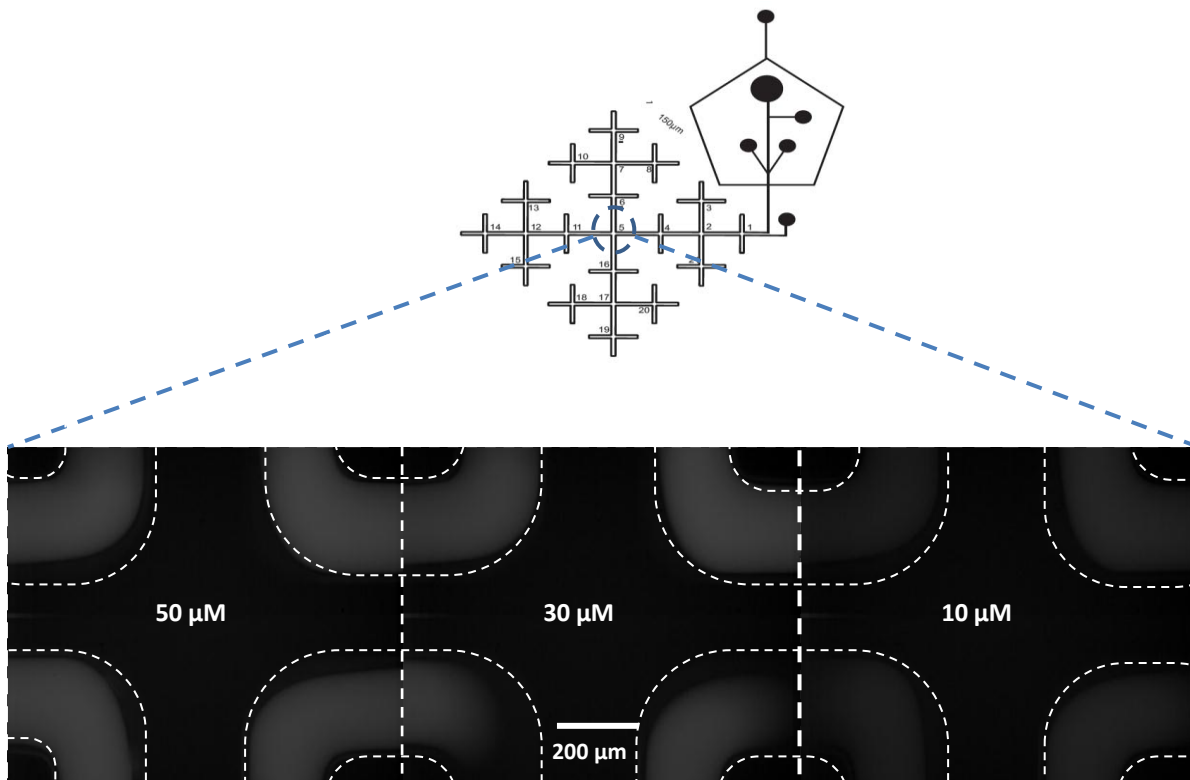


Figura 4-7. Intensidad de fluorescencia de las microgotas en la cruz 5 del microchip a diferentes concentraciones de 4-MU. Fotos obtenidas con la cámara Phantom, observadas al microscopio con un objetivo 20X.

La frecuencia de las gotas en los canales es en promedio 8 gotas por segundo, de tal forma que mediante el análisis de videos de 5 s para cada concentración de 4-MU en las microgotas se obtuvieron 40 puntos, los cuales corresponden a la intensidad de fluorescencia en las gotas según la concentración de 4-MU. El valor promedio de todos estos datos se reporta en la Figura 4-8.

Cada serie de puntos en la Figura 4-8 corresponde a la curva de calibración en la respectiva vuelta de la cruz 5 del microchip según lo observado en la Figura 4-2 (C).

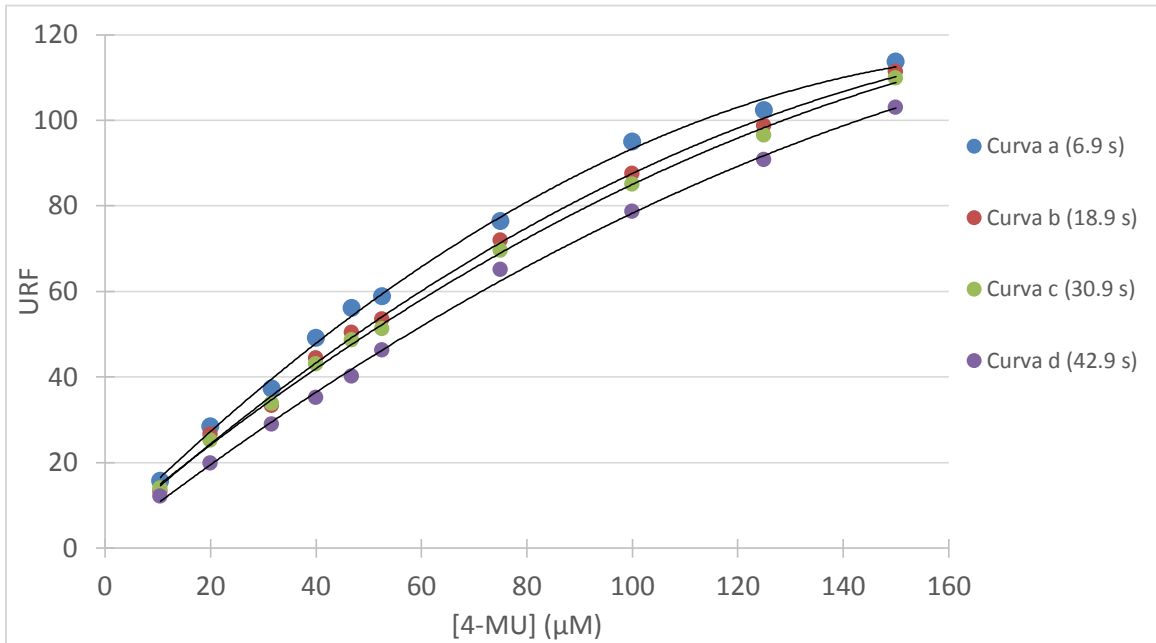


Figura 4-8. Curva de calibración de 4-MU en Buffer de Fosfatos para cada curva (a, b c y d) en la cruz 5 del microchip. Las líneas continuas representan la ecuación que mejor se ajusta a la serie de datos, corresponde a una ecuación cuadrática de la forma: $RFU = A [4-MU]^2 + B [4-MU] + C$

El intervalo de concentraciones que abarcan las curvas fue propuesto de esa manera debido a experimentos previos en laboratorio. El comportamiento de la fluorescencia en este intervalo no es lineal, pero un ajuste adecuado de los datos es a una ecuación de segundo orden de la forma:

$$y = Ax^2 + Bx + C$$

$$RFU = A [4-MU]^2 + B [4-MU] + C$$

Los valores de la regresión para cada una de las curvas se muestran en la Tabla 4-3. Seguramente este comportamiento se debe a la capacidad de Tracker al obtener la intensidad de luz en una región RGB donde es probable que el programa comience a llegar a la saturación, es decir que el programa pierde sensibilidad conforme aumentan los valores de fluorescencia. Sin embargo, el aumento de fluorescencia con respecto a la

concentración de 4-MU es proporcional en todo el intervalo de trabajo y nos permite sin ninguna dificultad hacer uso de estas curvas.

Tabla 4-3. Resultados de la regresión para cada una de las curvas en la cruz 5 del microchip.

Curva	Tiempo de residencia (s)	A	B	C	r ²
a	6.9	-0.0034	1.2344	3.977	0.9974
b	18.9	-0.0026	1.1009	3.417	0.9978
c	30.9	-0.0022	1.0230	4.574	0.9988
d	42.9	-0.0019	0.9580	1.119	0.9984

En la Figura 4-8 se observa que la intensidad de fluorescencia en las gotas disminuye conforme estas avanzan en el microchip. Es decir, para una concentración fija de 4-MU en la “curva a” donde las gotas han recorrido el 15 % del tiempo total en el microchip presentan mayor fluorescencia que las que se encuentran en la “curva b” donde ya han recorrido un 40 % del tiempo total de residencia. De la misma manera, el valor de la fluorescencia en las microgotas disminuye conforme avanzan en el microchip, de tal forma que las curvas disminuyen en intensidad conforme se avanza en el microchip, obteniendo entonces curvas paralelas.

Este comportamiento es debido a un fenómeno de reparto de las moléculas de 4-MU entre la fase acuosa (microgotas) y la fase orgánica (aceite mineral). Es decir las moléculas de 4-MU que se encuentran dentro de la microgota tienden a migrar hacia el aceite por interacciones electrostáticas. Mientras más tiempo permanezca la microgota en contacto con el aceite mayor es la acumulación de moléculas de 4-MU en el aceite, por lo tanto y como se observa en la Figura 4-9, la intensidad de luz en el aceite aumenta y disminuye en las microgotas conforme se avanza en el microchip debido a que masa que se transfiere es mayor conforme aumenta el tiempo de residencia de las microgotas en el microchip.

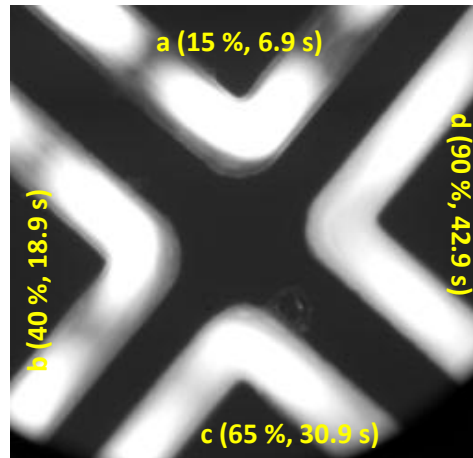


Figura 4-9. Microgotas en la cruz 5 del microchip a altas concentraciones de 4-MU. Se puede observar con claridad el fenómeno de reparto de 4-MU entre la fase acuosa y la fase orgánica. Conforme las gotas recorren un mayor porcentaje del microchip el fenómeno es más cuantitativo. Foto tomada con cámara Phantom, vista al microscopio con el objetivo 10X.

Las ecuaciones que se reportan en la tabla 4-3 asimilan este fenómeno y contienen de forma intrínseca el fenómeno de reparto, de tal forma que usando la ecuación para cada curva se puede transformar los valores de RFU en concentración de 4-MU para cada vuelta en la cruz 5 del microchip.

4.6 Ensayos Enzimáticos en Microchips

Se llevaron a cabo ensayos iniciales para observar el comportamiento de la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA asistido por la neuraminidasa. En un microchip acoplado al HPLC se inyectaron disoluciones 300 μM de 4-MUNANA y 3.4 U/mL de neuraminidasa a un flujo de 60 $\mu\text{L/h}$. En la Figura 4-10 se observa como entran las disoluciones de neuraminidasa y 4-MUNANA en el microchip ambas se juntan con el flujo que proviene del HPLC, que en esta sección también es de 60 $\mu\text{L/h}$ debido a la actividad de la purga en el microchip. La mezcla de los tres flujos genera que en las microgotas la concentración de enzima y sustrato sea un tercio de la concentración a la cual se inyectaron, es decir 1.13 U/mL y 100 μM en las microgotas, respectivamente.

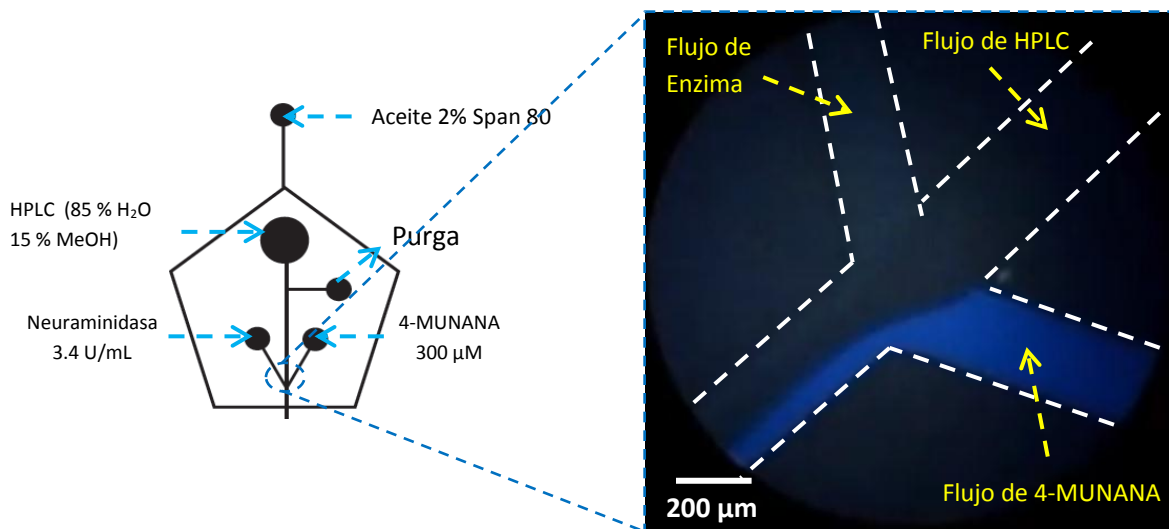


Figura 4-10. Inyección de disoluciones de neuraminidasa y 4-MUNANA en el microchip acoplado al HPLC. La foto esta tomada con una cámara digital que se fija al lente del microscopio.

En cuanto las microgotas se forman la neuraminidasa comienza a hidrolizar el enlace que mantiene unido al ácido N-acetilneuramínico con la 4-MU. En la Figura 4-11 se observan microgotas que contienen enzima y sustrato en la cruz 5 del microchip. Es claro como la fluorescencia de las gotas en la “curva a”, con un 15 % recorrido del tiempo total de residencia, es menor con respecto a la gota en la “curva b” donde ya ha transcurrido un 40 % del tiempo total de residencia. De la misma manera la fluorescencia en las microgotas sigue aumentando conforme aumenta el tiempo de residencia de las gotas en

el microchip (curvas c y d) debido al avance de la reacción enzimática. Es decir la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA se está llevando a cabo y por lo tanto se va acumulando una mayor concentración de 4-MU en las microgotas conforme estas avanzan en el trayecto de fractales.

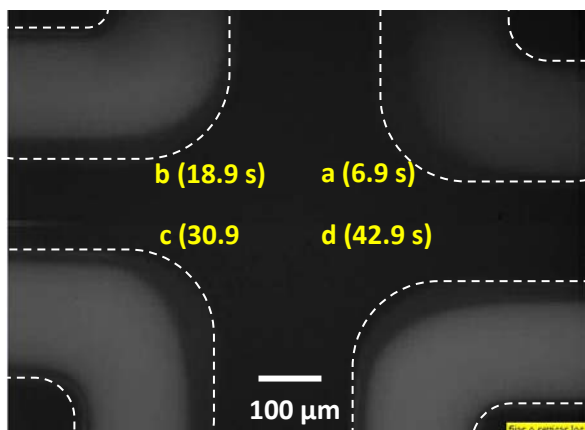


Figura 4-11. Microgotas con neuraminidasa y 4-MUNANA en la cruz 5 del microchip. Se observa el aumento de fluorescencia debido al avance de la reacción enzimática conforme las gotas avanzan en el chip. La foto esta tomada con la cámara Phantom y vista al microscopio con un objetivo 20X.

Se tomó un video de 145 s de las microgotas en la cruz 5 del microchip para tres experimentos independientes. Los videos fueron analizados con Tracker y Wolfram Mathematica. Los máximo obtenidos con Wolfram corresponden a máximos en URF, sobre estos puntos se utilizó la respectiva curva de calibración (ver Tabla 4-3) obteniéndose la Figura 4-12.

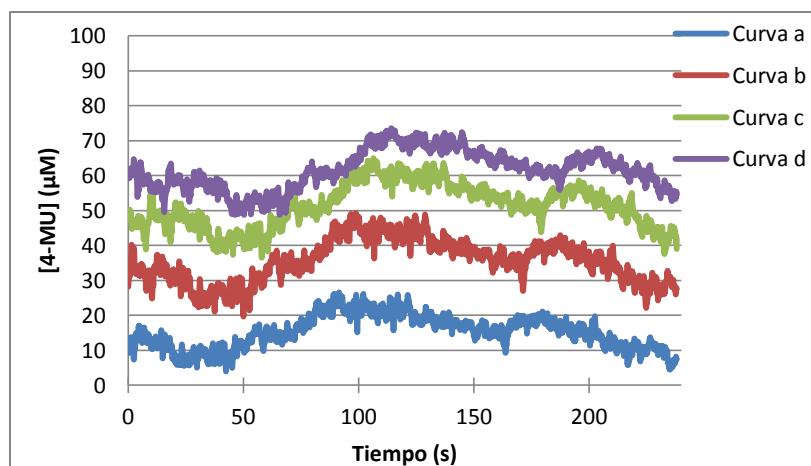


Figura 4-12. Concentración de 4-MU acumulada con respecto al tiempo de video. Se observa el aumento de la concentración de 4-MU conforme aumenta el tiempo de residencia debido a la hidrólisis de 4-MUNANA asistida por neuraminidasa de *C. perfringens*.

Considerando una frecuencia de 8 gotas por segundo (ver sección 3.1, Figura 3-10), durante los 145 segundos de video se registró la fluorescencia de 1160 gotas. El promedio de todas ellas en cada curva del centro del microchip se reporta en la Figura 4-13.

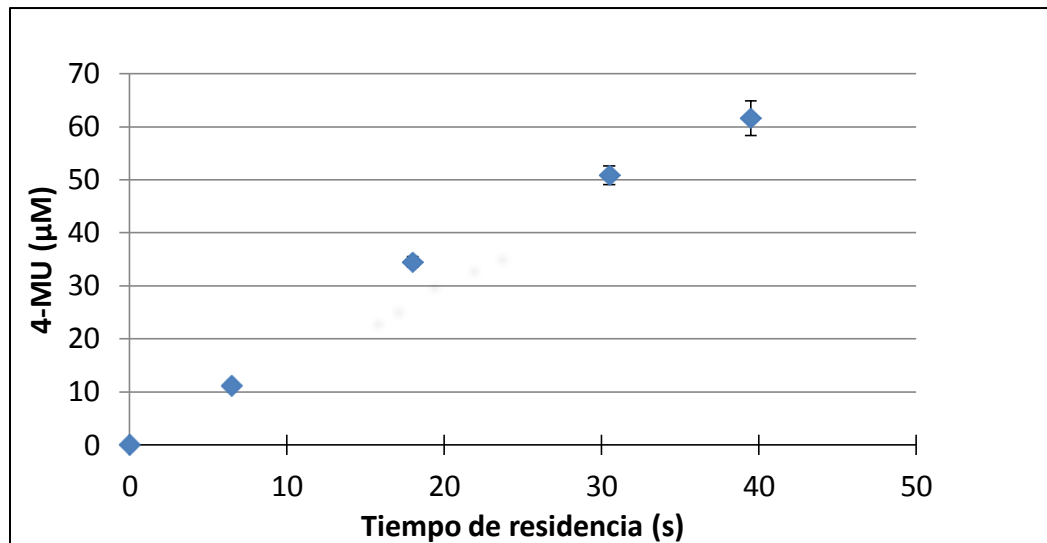


Figura 4-13. Curso de la reacción enzimática de hidrólisis del 4-MUNANA por la neuraminidasa de *C. perfringens* determinada en los microchips. Concentraciones iniciales: 1.13 U/mL neuraminidasa, 100 µM 4-MUNANA ambos en Buffer de Fosfatos pH 7.0, KCl 150 mM y 0.2% m/v de BSA.

En la Figura 4-13 se reporta el valor promedio de tres experimentos independientes. Se puede observar como la concentración de 4-MU aumenta conforme aumenta el tiempo de residencia de las gotas en el microchip, debido a que la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA asistido por neuraminidasa avanza, a mayor tiempo de residencia mayor hidrólisis de 4-MUNANA y, por lo tanto, mayor concentración de 4-MU. Conforme aumenta el tiempo de residencia de las gotas la dispersión de los datos también aumenta muy probablemente debido al fenómeno de extracción de 4-MU hacia la fase orgánica.

En el trabajo realizado anteriormente en el laboratorio por Enrique Álvarez³⁸ se reporta que la velocidad inicial para la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA asistida por neuraminidasa de *C. perfringens* es de 0.045 µM/s, para una [4-MUNANA] = 100 µM y $C_{\text{Enzima}} = 0.0027$ U/mL lo que corresponde a una concentración de enzima 37 veces menor

que la utilizada en este trabajo. En la Figura 4-13 se puede considerar que la pendiente entre los primeros tres puntos de esta grafica describen la velocidad inicial de la reacción enzimática obteniéndose un valor de 1.93 $\mu\text{M/s}$, dicho valor es 43 veces mayor que la velocidad reportada por Enrique ($1.93/0.045 = 42.9$). Por lo tanto y considerando que la velocidad de una reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración de enzima, se puede concluir que los resultados obtenidos de la cinética enzimática medida en microchips son congruentes con los resultados obtenidos por Álvarez mediante espectrofotometría.

4.7 Control positivo de inhibición (Zanamivir)

Para determinar el efecto de un compuesto inhibidor en la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* se utilizó Zanamivir. Como se mencionó en la sección 2.4, este compuesto ha sido caracterizado como un inhibidor competitivo de nuestra enzima³⁸.

Se inyectaron 20 μL de una disolución de Zanamivir (20 mg/mL) en el HPLC acoplado al microchip, obteniéndose el siguiente cromatograma (Figura 4-14):

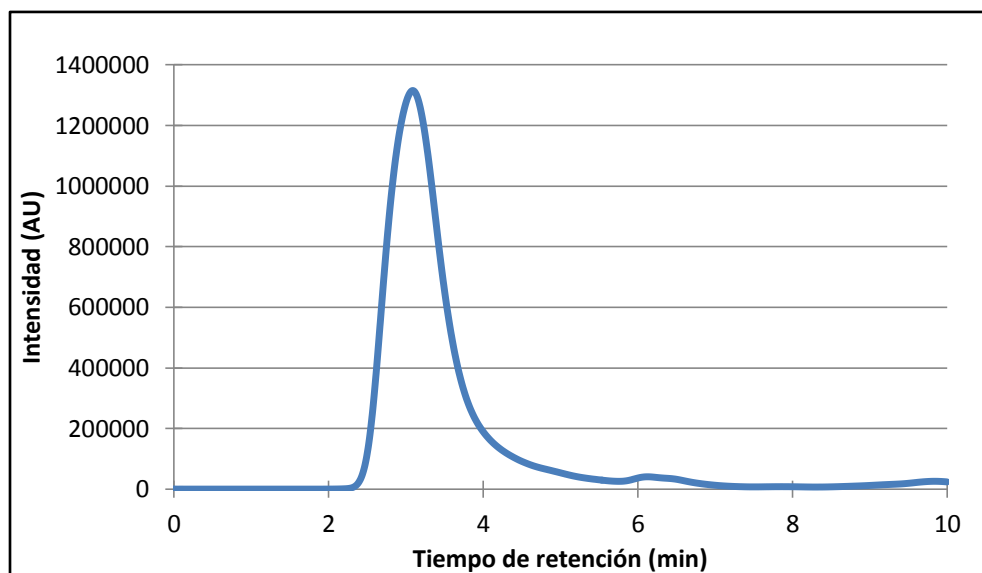


Figura 4-14. Cromatograma de elución del Zanamivir en columna C-18 (Raptor ARC-18, 2.7 μm , 50 x 2.1 mm, Restek) utilizando un programa isocrático de 15 % MeOH y 85 % agua en la fase móvil a un flujo de 0.1 mL/min. $C_{\text{Zanamivir}} = 20 \text{ mg/mL}$, $V_{\text{inyección}} = 20 \mu\text{L}$, detector a $\lambda = 270 \text{ nm}$.

La Figura 4-14 muestra el cromatograma de elución de Zanamivir, se observan un pico predominante con un tiempo de retención de 3.1 min así como una señal de muy baja intensidad a los 6.05 min. Como se observa en la Figura 4-15 el Zanamivir es un compuesto con una polaridad alta, razón por la cual se ve poco retenido en la columna de fase reversa que se utiliza para su separación⁴⁰, existen varios grupos en la su estructura de que pueden presentar algún grado de ionización dependiendo del pH, Por lo tanto es probable que la señal en el cromatograma que se observa en 6.05 min se deba a alguna especie estructural no predominante al valor de pH en cual se disolvió el compuesto (pH 6).

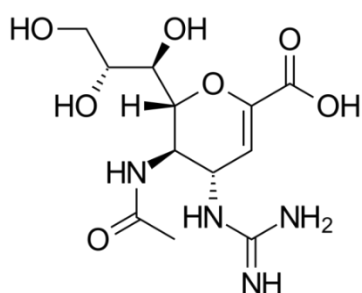


Figura 4-15. Estructura Zanamivir.
Tomado de [24]

En cuanto un compuesto se observa en el detector del equipo HPLC tarda 90 s en recorrer la tubería restante del HPLC e ingresar al microchip acoplado. Por lo tanto, una vez que se lleva a cabo la inyección de Zanamivir en el HPLC y se comienza a observar su señal en el detector del equipo (2.1 min en la Figura 2-14) se esperan 90 s para tomar un video de la gotas en el microchip y entonces poder evaluar la actividad enzimática en presencia del inhibidor. Así mismo, durante el mismo experimento se tomaron videos de microgotas en el microchip sin haber inyectado Zanamivir para registrar la actividad de la enzima sin inhibidor.

El análisis de videos con Tracker y su posterior tratamiento con Mathematica se realizó de la misma manera que en la sección 4.4.1. Los máximos de fluorescencia que se obtienen con Mathematica para ensayos con Zanamivir se presentan en la Figuras 4-16, 17, 18 y 19, una figura para cada curva en el centro del microchip. Una explicación de como se alinearon las señales de fluorescencia con la señal de cromatograma se muestra en el Anexo I.

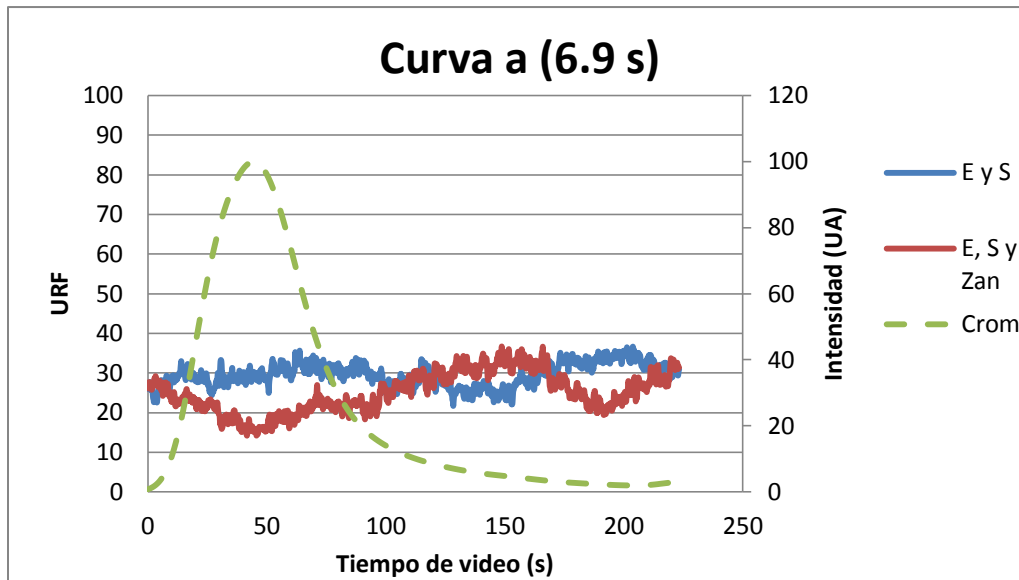


Figura 4-16. El eje izquierdo muestra la señal de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF) evaluada durante el tiempo de video (220s) este eje permite observar la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* en la “curva a” de la cruz 5 del microchip. Línea azul, muestra la actividad solo de la enzima sin presencia de algún inhibidor. Línea roja, actividad de la enzima una vez que se ha inyectado Zanamivir en el HPLC. La línea verde esta asociada al eje de la derecha y muestra el cromatograma de elución de Zanamivir en unidades arbitrarias (AU), esta línea se logra alinear sumando al tiempo de retención en el cromatograma los 90 s de “delay” entre el HPLC y el microchip más el tiempo que una gota tarda en llegar hasta la “curva a” en total 96.9 s.

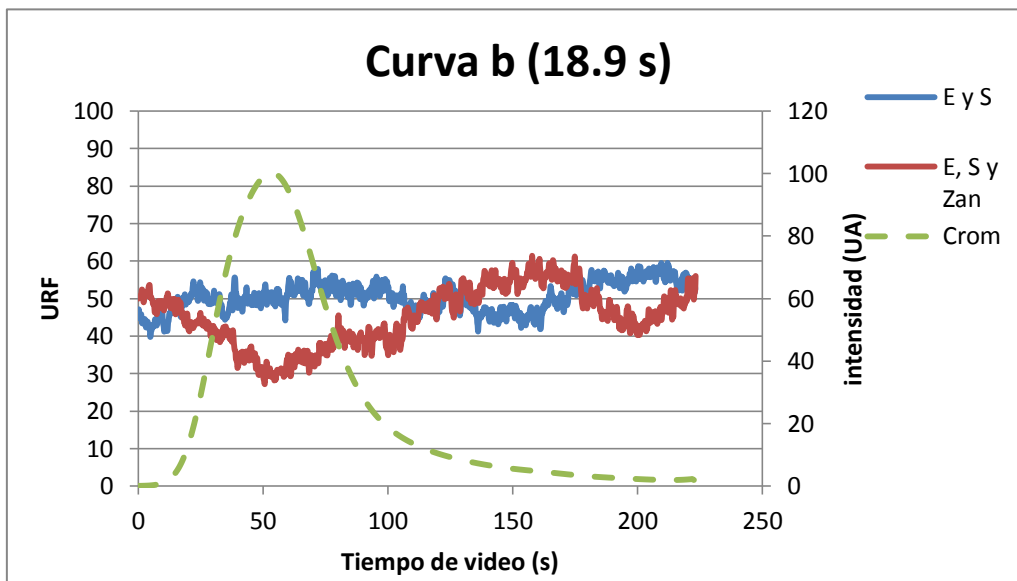


Figura 4-17. El eje izquierdo muestra la señal de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF) evaluada durante el tiempo de video (220s) este eje permite observar la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* en la “curva b” de la cruz 5 del microchip. Línea azul, muestra la actividad solo de la enzima sin presencia de algún inhibidor. Línea roja, actividad de la enzima una vez que se ha inyectado Zanamivir en el HPLC. La línea verde esta asociada al eje de la derecha y muestra el cromatograma de elución de Zanamivir en unidades arbitrarias (AU), esta línea se logra alinear sumando al tiempo de retención en el cromatograma los 90 s de “delay” entre el HPLC y el microchip más el tiempo que una gota tarda en llegar hasta la “curva b” en total 108.9 s.

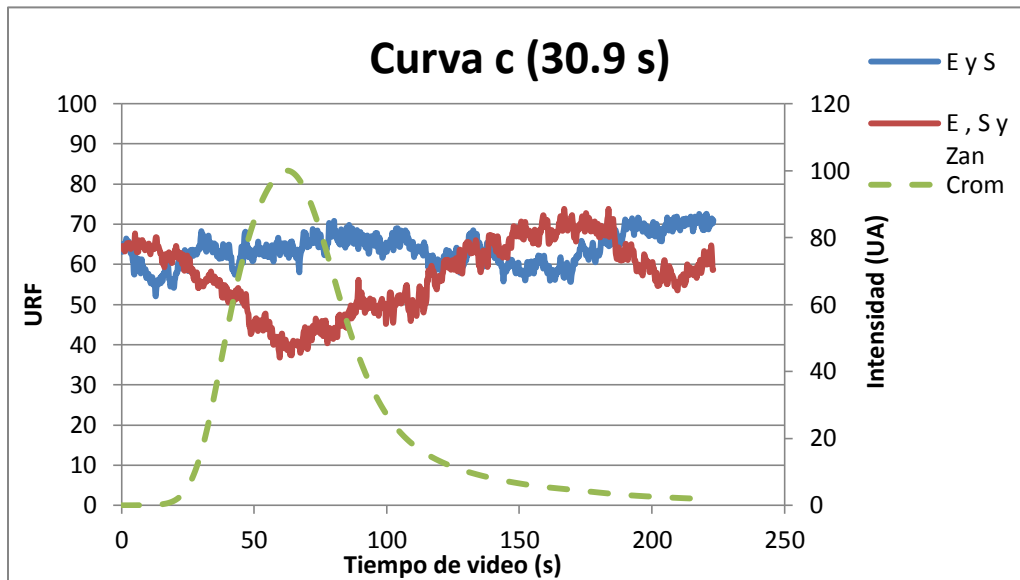


Figura 4-18. El eje izquierdo muestra la señal de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF) evaluada durante el tiempo de video (220s) este eje permite observar la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* en la “curva c” de la cruz 5 del microchip. Línea azul, muestra la actividad solo de la enzima sin presencia de algún inhibidor. Línea roja, actividad de la enzima una vez que se ha inyectado Zanamivir en el HPLC. La línea verde esta asociada al eje de la derecha y muestra el cromatograma de elución de Zanamivir en unidades arbitrarias (AU), esta línea se logra alinear sumando al tiempo de retención en el cromatograma los 90 s de “delay” entre el HPLC y el microchip más el tiempo que una gota tarda en llegar hasta la “curva c” en total 120.9 s.

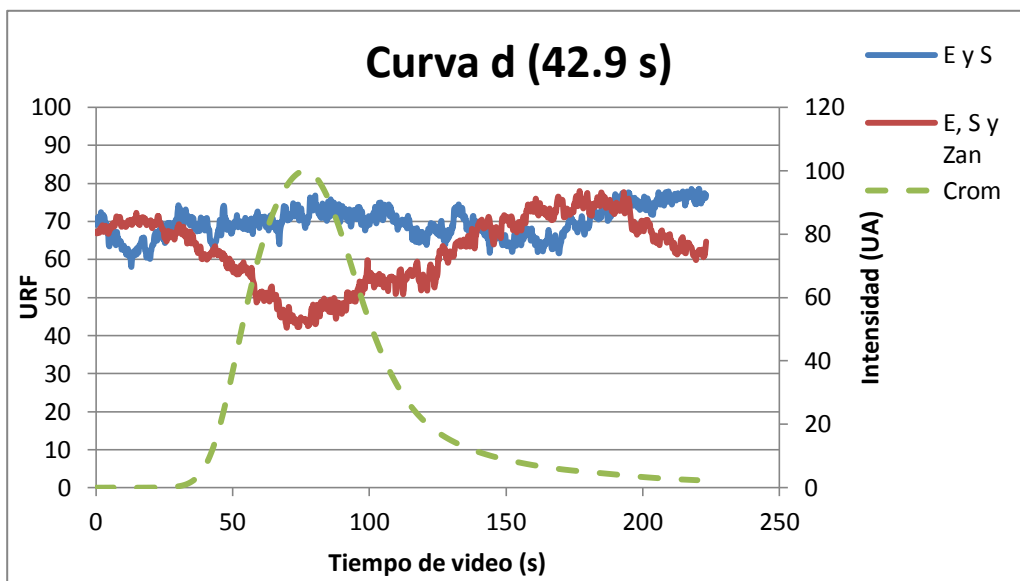


Figura 4-19. El eje izquierdo muestra la señal de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF) evaluada durante el tiempo de video (220s) este eje permite observar la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* en la “curva d” de la cruz 5 del microchip. Línea azul, muestra la actividad solo de la enzima sin presencia de algún inhibidor. Línea roja, actividad de la enzima una vez que se ha inyectado Zanamivir en el HPLC. La línea verde esta asociada al eje de la derecha y muestra el cromatograma de elución de Zanamivir en unidades arbitrarias (AU), esta línea se logra alinear sumando al tiempo de retención en el cromatograma los 90 s de “delay” entre el HPLC y el microchip más el tiempo que una gota tarda en llegar hasta la “curva d” en total 132.9 s.

En las cuatro figuras anteriores la línea azul muestra la actividad hidrolítica de la enzima sobre 4-MUNANA sin presencia de algún inhibidor. Como se explicó en la sección 4.5 la concentración de 4-MU va aumentando conforme aumenta el tiempo de residencia de las gotas en el microcanal y, por ello, a un mayor tiempo mayor intensidad de fluorescencia.

La línea roja muestra el comportamiento de la fluorescencia a través del tiempo conforme el Zanamivir ingresa al microchip. La línea verde corresponde al cromatograma obtenido en el detector del HPLC tras la inyección de Zanamivir. En todas la gráficas se observa la disminución de la fluorescencia (línea roja) conforme la concentración de Zanamivir aumenta en las microgotas (línea verde). Es decir, el Zanamivir inhibe la actividad de la enzima provocando una disminución de la producción de 4-MU lo cual se ve reflejado en una disminución de la intensidad de la fluorescencia de las microgotas.

De los gráficos anteriores se determinó el valor promedio de URF (unidades relativas de fluorescencia) en cada una de las curvas de la cruz 5 del microchip y los resultados se muestran en la Figura 4-20. Cabe mencionar que los parámetros de la cámara Phantom con los que se realizaron estos experimentos no son los mismos que los utilizados para la construcción de la curva de calibración, razón por la cual los resultados se reportan en URF y no en unidades de concentración de 4-MU.

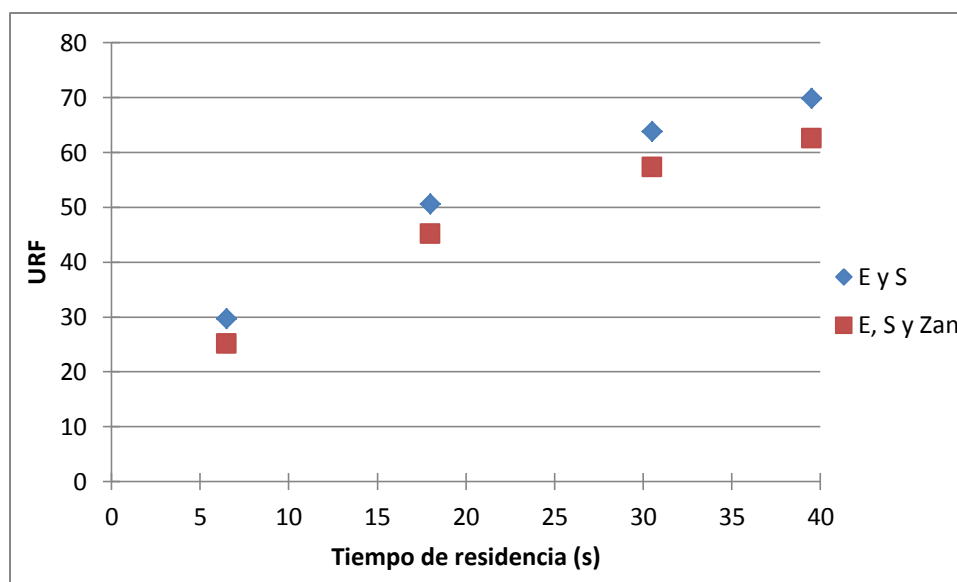


Figura 4-20. Resultados de inhibición de la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* debido a la presencia de Zanamivir. Los resultados aquí corresponden al promedio de intensidad de fluorescencia de las gotas que pasaron durante 220 s en cada una de las curvas en la cruz 5 de microchip.

Recordando el ejemplo de ensayos de inhibición de la neuraminidasa de *C. perfringens* que se mencionó en la sección de antecedentes (sección 2.4.1), el grupo de trabajo de Ishimoto *et al.*²⁸ logró inmovilizar la neuraminidasa y 4-MUNANA en un dispositivo de microfluídica y determinar la cinética de la reacción enzimática con y sin presencia de Zanamivir mediante microfluídica en flujo continuo. Ellos observaron una disminución apreciable de la fluorescencia en los ensayos que contenían Zanamivir en comparación con aquellos ensayos donde solo se tenía enzima y sustrato. El resultado reportado por Ishimoto *et al.* sobre la inhibición de neuraminidasa con Zanamivir concuerda con lo reportado en la Figura 4-20 donde se observa claramente la disminución en la fluorescencia de la microgotas que contienen enzima sustrato y Zanamivir (cuadros en la Figura 4-20), por lo tanto mediante el método utilizado se puede comprobar que el Zanamivir es un inhibidor de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*.

Cuando la disolución de Zanamivir se inyecta en el equipo pasa a través de la columna de HPLC, recorre el sistema y entra al microchip formando parte de la microgotas. El Zanamivir que viene acarreado en el flujo de HPLC se mezcla con las disoluciones de enzima y el sustrato formando parte de la microgotas. El Zanamivir interactúa con la enzima inhibiendo su actividad, observándose por lo tanto una disminución de la fluorescencia debido a una menor acumulación de 4-MU en las gotas.

4.7.1 Aproximación de la concentración de Zanamivir en las microgotas.

Recordando que se inyectaron 20 μ L de una disolución de Zanamivir 20 mg/mL en el equipo de HPLC y conociendo la masa molar del compuesto (332.31 mg/mol) es posible determinar el número total de mol de Zanamivir que se inyectaron en el HPLC y que por lo tanto entraron al microchip. Realizando el cálculo necesario se obtienen 1.204 μ mol de Zanamivir.

Así mismo, el Zanamivir que se inyecta eluye en un solo pico. Por lo tanto, el área total bajo el pico de Zanamivir en el cromatograma es equivalente al número total de moles de Zanamivir. De tal forma, que se puede tomar una fracción del área bajo el cromatograma y determinar a que fracción del número de moles totales corresponde (Figura 4-21).

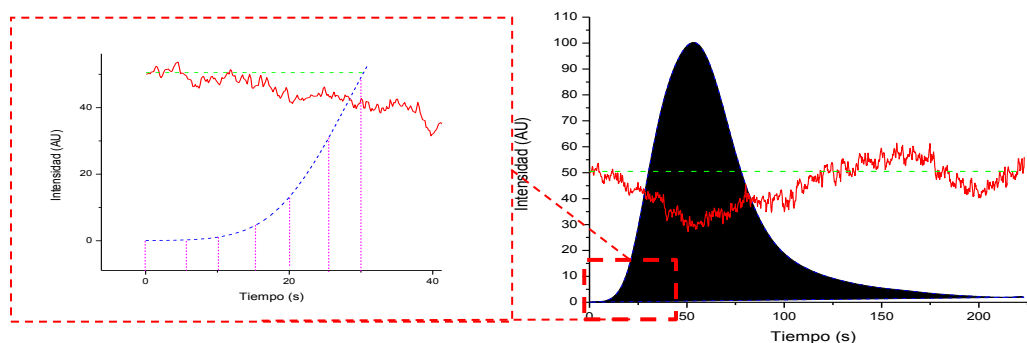


Figura 4-21. Ejemplo de la división del área bajo la curva del cromatograma para aproximar el número de moles de Zanamivir que entran al microchip en un intervalo de tiempo. Línea punteada azul, intensidad de la señal en el HPLC que genera la inyección de Zanamivir en unidades arbitrarias. Superficie negra; área que considera Origin Pro 8 debajo del cromatograma de Zanamivir. Línea roja; comportamiento de la fluorescencia en el microchip tras la inyección de Zanamivir. Línea verde; promedio de la fluorescencia durante 220 s en un punto del microchip debido solo a la actividad de la enzima sobre el sustrato.

Como se muestra en la Figura 4-21, para aproximar la concentración de Zanamivir en las microgotas se dividió el área bajo la curva del cromatograma en intervalos de 5 s, se determinó el área de esta sección se calculó el número de moles al que le corresponde. El número de moles obtenido se divide entre los 5 segundos que se consideraron de área, obteniéndose el número de moles por segundo que entraron al microchip en ese intervalo ($\mu\text{mol/s}$). Dividiendo entre el flujo total de la fase acuosa ($180 \mu\text{L/h}$), en las unidades correspondientes, se obtiene un aproximado de la concentración de Zanamivir en las microgotas durante esos 5 segundos.

Se determinó el área en el mismo intervalo de tiempo para las curvas de la actividad de la enzima sin y con presencia de Zanamivir. El cociente del área bajo la curva con Zanamivir (línea roja en las Figuras 4-16, 4-17, 4-18 y 4-19) sobre el área de la actividad de la enzima sin inhibidor (línea azul en la Figuras 4-16, 4-17, 4-18 y 4-19) por cien corresponde al % de actividad enzimática (Figura 4-22).

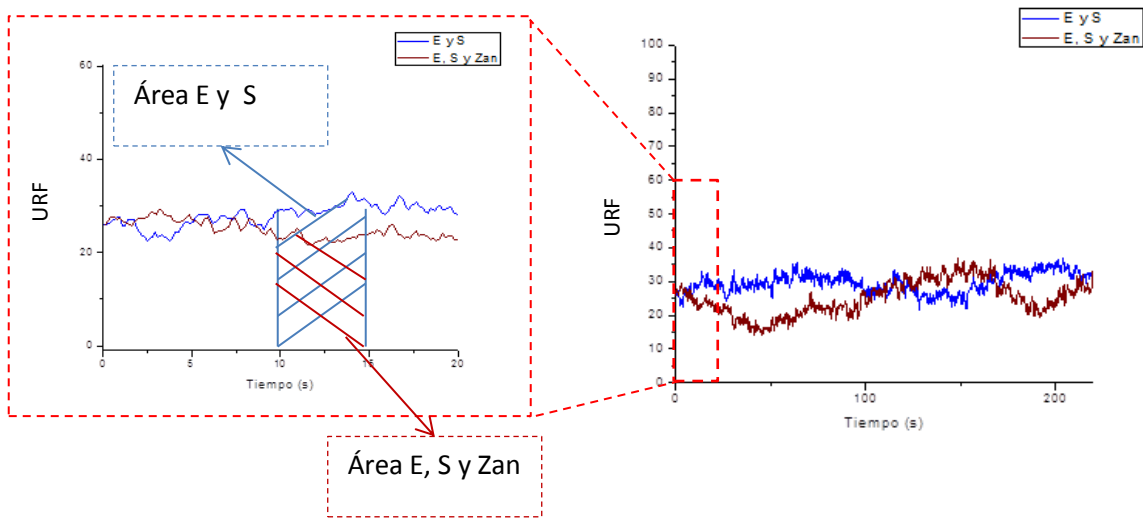


Figura 4-22. Ejemplo de división de área bajo las curvas para determinar el % de actividad enzimática. Las gráficas corresponden a los mismos datos que los presentados en la Figura 4-16. Las diagonales azules en el gráfico a la izquierda representan el área bajo la curva que indica la actividad de la enzima sobre el sustrato en un intervalo de 5 s en el video. Las diagonales rojas indican la actividad de la enzima sobre el sustrato en presencia de Zanamivir en un intervalo de 5 s en el video.

$$\% \text{ de Actividad} = \frac{\text{Area E, S y Zan}}{\text{Area E y S}} \times 100$$

Donde:

Área E, S y Zan: Área bajo la curva de la actividad de la enzima sobre el sustrato en presencia de Zanamivir en un intervalo de 5 s de video.

Área E y S: Área bajo la curva de la actividad de la enzima sobre el sustrato sin Zanamivir en un intervalo de 5 s de video.

Una vez obtenidos los datos de concentración de Zanamivir en la microgotas y el porcentaje de inhibición se logró obtener la Figura 4-23 que indica el % de actividad de la enzima a diferentes concentraciones de Zanamivir para las curvas “a, b y c” en el centro del microchip.

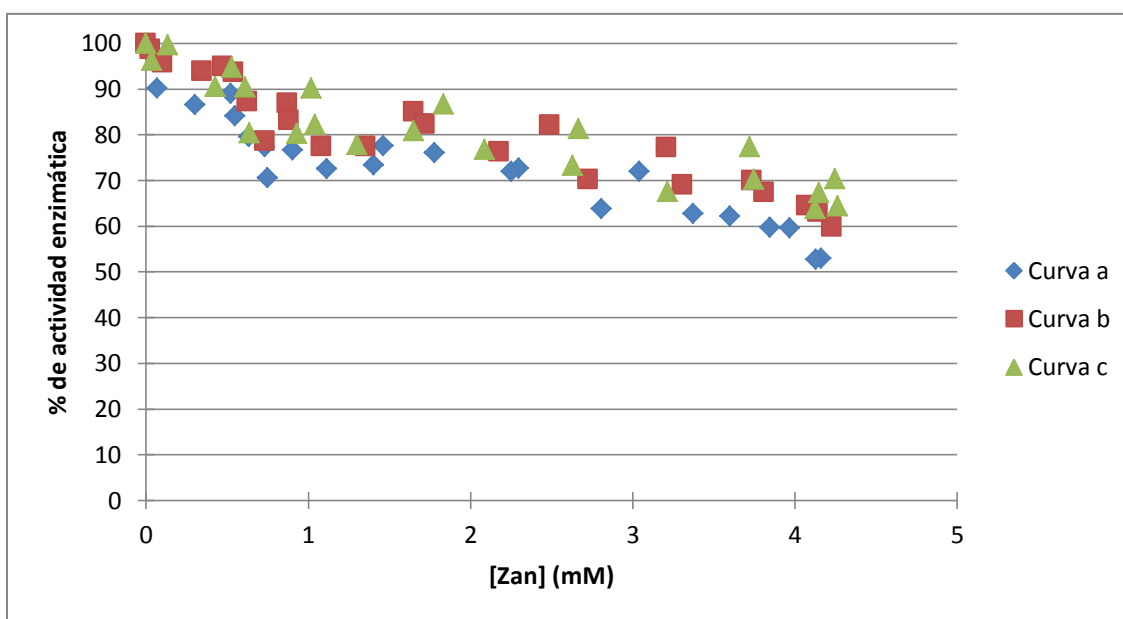


Figura 4-23. % de actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* con respecto a la concentración de Zanamivir para las curvas “a, b y c” en el centro del microchip.

En la Figura 4-23 se observa con claridad la disminución de la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* conforme va aumentando la concentración de Zanamivir en la microgotas, comprobándose la actividad como inhibidor de este compuesto. Así mismo con el método empleado, aprovechando el gradiente de concentración que genera el paso de Zanamivir a través del HPLC, se logró evaluar la actividad de Zanamivir de manera automatizada en un intervalo de concentraciones del inhibidor en las microgotas que abarca dos ordenes de magnitud , es decir desde 6.9×10^{-2} mM hasta 4.2 mM.

Este resultado es consistente con lo dicho por el grupo de trabajo Theberge *et al.*¹⁹, quien generó un gradiente de concentración de hasta 3 ordenes de magnitud de una mezcla de colorantes en un microchip acoplado a un equipo de Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). Ellos propusieron al final de su trabajo que la técnica sería útil

para llevar a cabo ensayos con fármacos a diferentes concentraciones. Nosotros logramos conservar en las microgotas el gradiente de concentración de Zanamivir que se genera en el HPLC y determinar su actividad inhibidora de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*, muestreando hasta dos ordenes de magnitud la concentración de Zanamivir de manera automatizada.

Así mismo, utilizando un método espectrofotométrico Enrique Álvarez ³⁸ reporta una disminución del 45 % de la actividad enzimática de la neuraminidasa de *C. perfringens* en presencia de 5 mM de Zanamivir. Como se observa en la Figura 4-23 a una concentración de Zanamivir de 4.2 mM (máxima concentración que se alcanzó en la microgotas) el % de actividad enzimática disminuye en un 48 %, esto concuerda con el trabajo realizado por Álvarez ³⁸.

4.7.2 Determinación del valor de K_i para Zanamivir

Para la obtención del valor de K_i para Zanamivir se realizó el ajuste del conjunto de todos los datos que se muestran en la Figura 4-23 a la siguiente ecuación ³⁴ :

$$a = \frac{K_M + [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

Donde:

a = fracción de actividad

K_i = Constante de inhibición

$[S]$ = concentración de 4-MUNANA en microgotas = 100 μ M

K_M = 111.19 μ M (Tomado de [37])

El ajuste se realizó utilizando Origin Pro 8 y los resultados se muestran en la Figura 4-24.

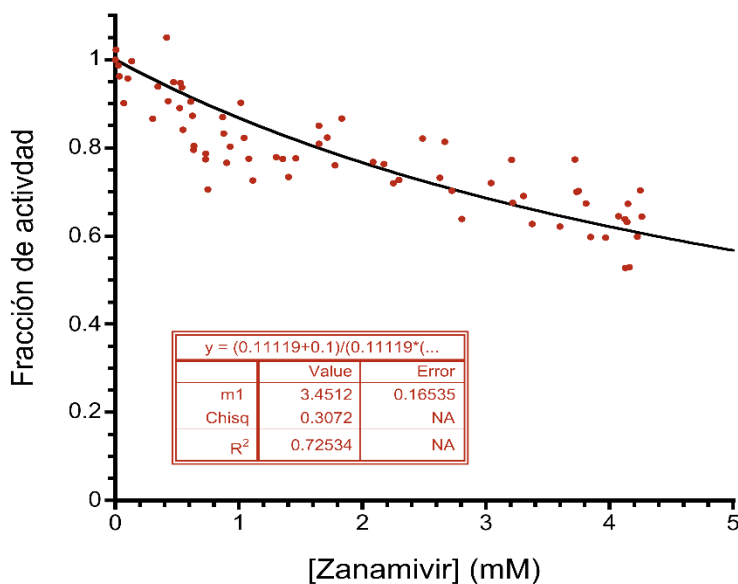


Figura 4-24. Resultados del ajuste para la fracción de actividad de la enzima neuraminidasa de *C. prefringens* a diferentes concentraciones de Zanamivir. El valor "m1" que se encuentra en la tabla sobre la figura corresponde al valor de K_i = 3.45 mM

El valor de K_i obtenido tras el ajuste es 3.45 mM este valor se encuentra dentro del mismo orden reportado por Enrique Álvarez ³⁸ (1.3 mM) quien lo obtuvo mediante ensayos espectrofotométricos.

4.8 Identificación de Inhibidores en el extracto natural

Umckaloabo

Para demostrar la utilidad de la técnica de microchips acoplados a un equipo de HPLC, se llevó a cabo la evaluación de los diferentes componentes que forman el producto Umckaloabo (UMK), extracto de la raíz de *P. sidoides*, como posibles inhibidores de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*. Para ello, se inyectó y separó en el HPLC una muestra del extracto de UMK y cada uno de los picos de la cromatografía fueron introducidos uno a uno conforme su tiempo de retención a un microchip para ser evaluados en el ensayo enzimático en microgotas como se hizo para el Zanamivir.

Primero se llevo a cabo la separación de 20 μ L de una disolución 3.2 mg/mL de UMK en una columna fase reversa C-18 con un detector de UV a 320 nm y se obtuvo el siguiente cromatograma:

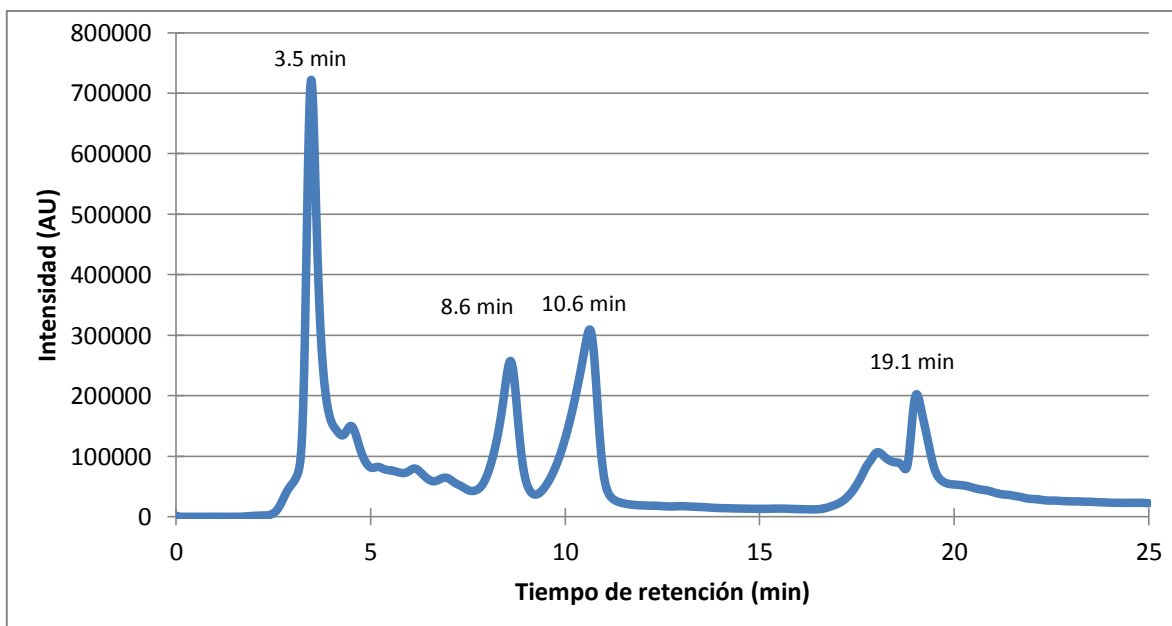


Figura 4-25. Cromatograma de separación de UMK en columna fase reversa C-18 (Raptor ARC-18, Restek). $C_{UMK} = 3.2$ mg/mL, $V_{iny} = 20$ μ L, Detector UV a $\lambda = 320$ nm, Flujo fase móvil = 0.1 mL/min. Programa de elución; 0 min-20 min (15 %B), 20 min-25 min (15 %B-100 %B), 25 min-35 min (100 %B).

El programa utilizado para llevar a cabo la separación de la muestra, permitió identificar cuatro picos relevantes (3.5 min, 8.6 min, 10.6 min y 19.1 min respectivamente). Los tres primeros eluyen a una composición de fase móvil de 15 % de MeOH en agua, mientras que el último pico eluye con un tiempo de retención de 19 min con 100 % de MeOH. Debido a que se utilizó agua destilada para solubilizar las grageas del extracto, es de esperarse que exista una mayor cantidad de compuestos que eluyen a concentraciones altas de la fase más polar (H₂O). Así mismo, como se explicó en la sección 2.5, UMK está compuesto principalmente por cadenas oligoméricas de polifenoles, las cuales son compuestos con varios grupos OH a los extremos que les confieren una elevada polaridad³³. Por tal razón, la mayoría de los compuestos presentan una retención baja en la columna de fase reversa utilizada para la separación del extracto.

Los compuestos que forman parte de UMK se separaron en la columna del HPLC y eluyeron de este equipo de forma continua con un perfil de concentración. Conforme van saliendo de la columna (ya separados) recorren el resto del sistema hasta llegar al microchip acoplado. En esta parte, los compuestos de UMK son arrastrados por la fase móvil del HPLC y se juntan con las disoluciones de enzima y sustrato en Buffer de Fosfatos que se están inyectando en el microchip, de tal forma que se generan microgotas con enzima, sustrato y concentraciones diferentes del compuesto de UMK.

A diferencia de los resultados obtenidos con el Zanamivir, algunos de los picos cromatográficos del UMK provocaron un aumento muy apreciable en la fluorescencia de las gotas (Figura 4-26) resultado inesperado si lo que se buscaba eran inhibidores enzimáticos.

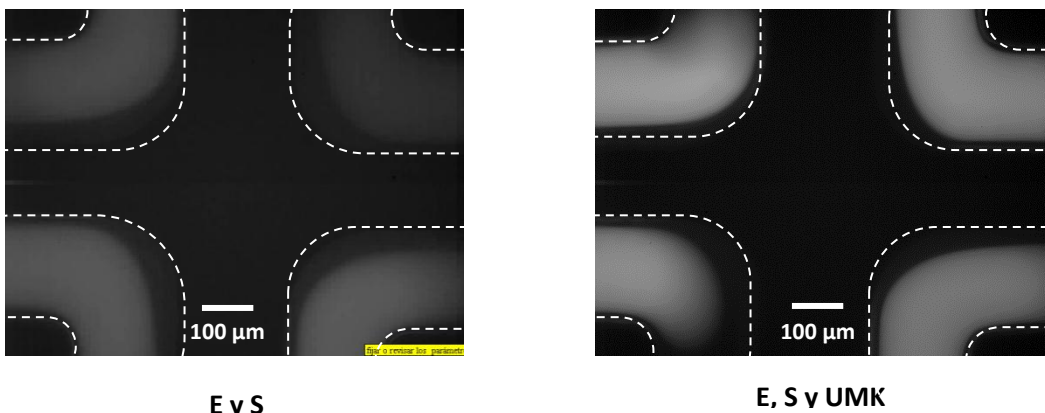


Figura 4-26. Comparación de la fluorescencia de las gotas en ausencia del primer pico de UMK y en presencia del mismo. A la izquierda, se observa una imagen de la actividad de la neuraminidasa sobre 4-MUNANA sin haber inyectado aún UMK. A la derecha se observa la actividad de la enzima sobre el sustrato en presencia del primer compuesto que eluye en la separación de UMK (t de retención= 3.5 min)

Como se observa en la Figura 4-27 las catequinas presentes en UMK contienen una estructura similar a la 4-MU, es decir contienen un anillo aromático unido a un heterociclo, estructura similar en las cumarinas tal como 4-MU, que como ya se ha mencionado presentan propiedades fluorescentes³². Por lo tanto, es de esperarse que las catequinas presentes en UMK tengan un espectro de absorción y emisión similar a la 4-MU. En consecuencia el aumento de fluorescencia en las microgotas podría deberse a que ha ingresado alguna catequina presente en UMK, observándose la suma de la fluorescencia de 4-MU debido a la hidrólisis de 4-MUNANA y la fluorescencia debida al compuesto de UMK.

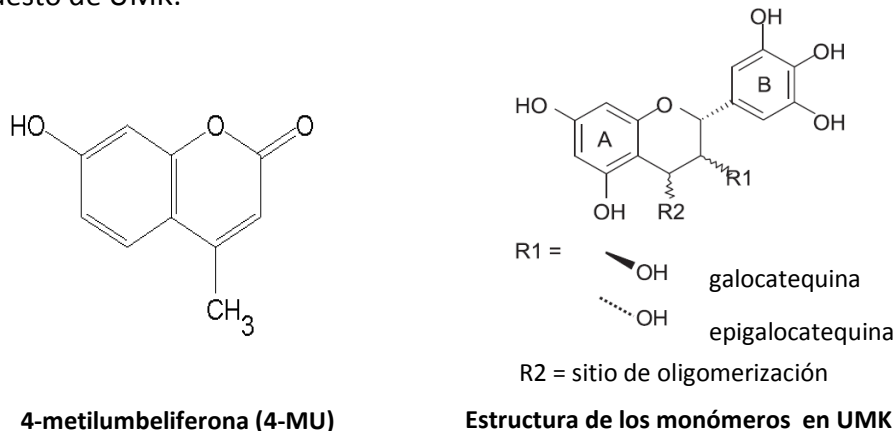


Figura 4-27. Estructura de la 4-metilumbeliferona (4-MU) y catequinas presentes en Umckaloabo® (UMK). Se observa la similitud entre ambas estructuras por lo que es de esperarse que ambos compuestos presenten espectros de fluorescencia muy similares.

Para verificar esta hipótesis se llevaron a cabo dos experimentos. El primero consistió en inyectar UMK en el HPLC acoplado a un microchip donde solo se introducen disoluciones de Buffer de Fosfatos sin enzima ni sustrato (Figura 4-28). El segundo consistió en inyectar UMK en el HPLC acoplado a un microchip con flujos de neuraminidasa y 4-MUNANA en Buffer de Fosfatos (Figura 4-29). En ambos casos se inyectó UMK a 3.2 mg/mL.

Para determinar cuanta fluorescencia en las gotas es debida al compuesto de UMK y cuanta debida a la 4-MU que se ha producido, se llevó a cabo el primer experimento. En la Figura 4-28 se puede observar el momento en el que el primer pico cromatográfico de UMK ingresa en el microchip y se junta con las disoluciones de Buffer de Fosfatos. Debido al aumento del pH de la disolución con el compuesto que proviene del UMK, se dibuja una línea de fluorescencia entre la intersección de los tres flujos de la fase acuosa. De tal forma que las microgotas que se forman en este experimento florecen debido solo al compuesto de UMK.

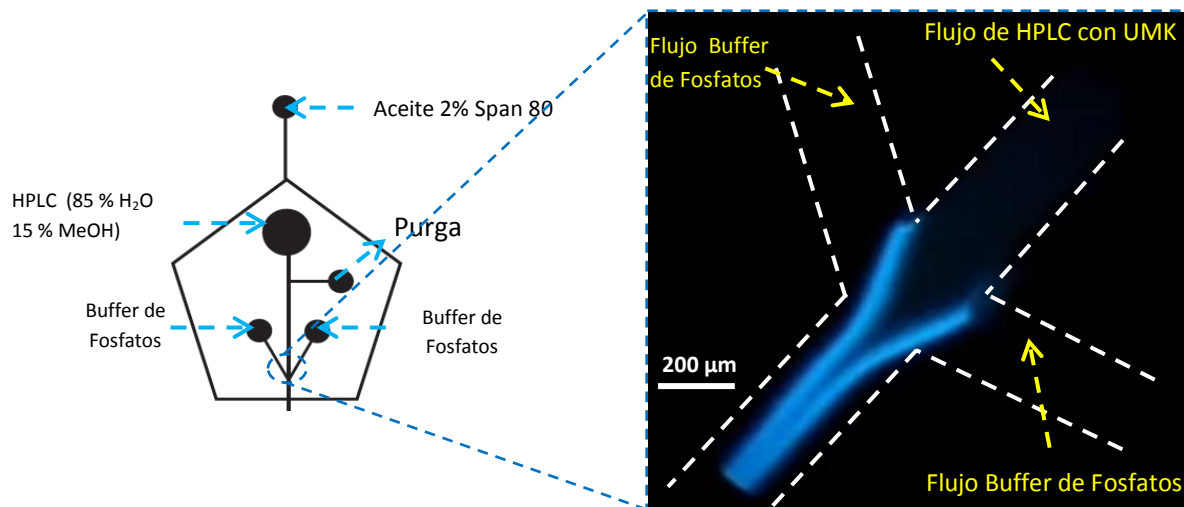


Figura 4-28. Entrada al microchip del primer pico cromatográfico del UMK en el microchip con disoluciones de Buffer de Fosfatos. Se hace un acercamiento a la zona donde se intersectan los tres flujos de la fase acuosa en el microchip. La línea de fluorescencia que se observa es debida al aumento del pH cuando el compuesto acarreado por la fase móvil de HPLC (pH 6.0) se mezcla con las disoluciones de Buffer de Fosfatos (pH 7.0).

En la Figura 4-29 se observan los resultados del segundo experimento, el cual consistió en introducir al microchip del primer pico cromatográfico que eluye del UMK en el HPLC junto con disoluciones de neuraminidasa y 4-MUNANA en Buffer de Fosfatos. Se puede observar que el comportamiento de aparición de la fluorescencia en el canal que trae el flujo de HPLC se repite cuando el compuesto de UMK se mezcla con las disoluciones de enzima y sustrato en Buffer de Fosfatos. De tal forma, que las microgotas que se forman en este microchip emiten la fluorescencia del compuesto fluorescente de UMK y la de 4-MU que irá acumulando conforme avance la reacción.

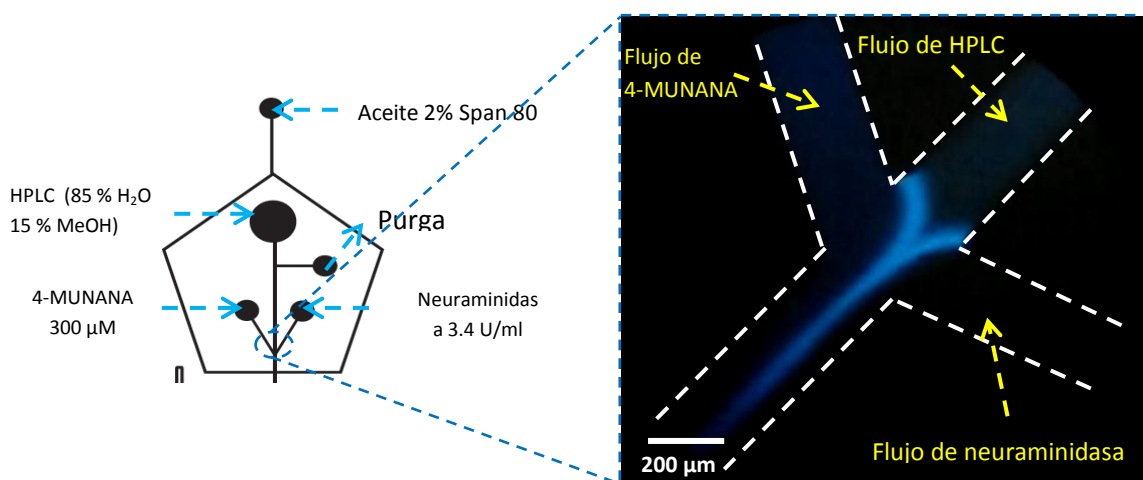


Figura 4-29. Entrada del primer pico cromatográfico del UMK en el microchip con disoluciones de enzima y sustrato. Se hace un acercamiento a la zona donde se intersectan los tres flujos de la fase acuosa en el microchip, la línea de fluorescencia que se observa es debida al aumento del pH cuando el compuesto acarreado por la fase móvil de HPLC (pH 6.0) se mezcla con las disoluciones de enzima y sustrato en Buffer de Fosfatos (pH 7.0).

Para ambos experimentos descritos anteriormente se tomaron videos siguiendo el primer pico de UMK que se observa en el cromatograma de separación (Figura 4-25). El análisis de videos y obtención de datos se realizó de la misma manera que se ha venido explicando haciendo uso de Tracker y Wolfram Mathematica, obteniéndose los siguientes resultados:

Figura 4-30. Comportamiento de la fluorescencia en la “curva d” de la cruz 5 del microchip (42.9 s de reacción) con diferentes composiciones de las microgotas. Línea negra, fluorescencia de las microgotas con neuraminidasa, 4-MUNANA y el 1er compuesto que eluye del extracto UMK. Línea Roja, fluorescencia de las microgotas solo con el 1er compuesto que eluye del extracto UMK y Buffer de Fosfatos. Línea Azul, resta de la línea roja a la línea negra, corresponde a la fluorescencia solo de la 4-MU que se acumula en la microgotas en presencia de enzima, sustrato y el 1er compuesto que eluye de UMK. Línea verde, fluorescencia de las microgotas debida solo a la actividad de la neuramnidasa sobre 4-MUNANA, sin presencia de ningún compuesto de UMK.

La Figura 4-30 muestra el comportamiento de la fluorescencia en la “curva d” de la cruz 5 del microchip durante 140 s para diferentes composiciones en la microgotas. La línea verde muestra la fluorescencia de microgotas solo con enzima y sustrato, se observa que la fluorescencia se mantiene constante durante todo el intervalo de tiempo debido a que en este punto del microchip la cantidad de 4-MU que se acumula en las microgotas no cambia si no hay presencia de algún inhibidor.

La línea negra en la Figura 4-30 muestra el comportamiento de la fluorescencia en microgotas que contienen enzima, sustrato y el primer compuesto de UMK, se observa como la fluorescencia aumenta conforme aumenta la concentración del primer compuesto de UMK en la microgotas (recordar que la separación de un compuesto por el HPLC genera un gradiente de concentración). Es importante observar como la línea negra parte de la misma intensidad de fluorescencia que la línea verde, en ese momento el

compuesto de UMK no ha ingresado al microchip y se tienen microgotas solo con enzima, sustrato y la 4-MU que se ha liberado.

La línea roja en la Figura 4-30 describe el comportamiento de la fluorescencia de las microgotas con el primer compuesto que eluye de UMK y Buffer de Fosfatos. Al tiempo cero hay ausencia de enzima, sustrato y UMK, por lo que las gotas no presentan fluorescencia y la línea comienza por debajo de las demás. Conforme va ingresando el compuesto del UMK en la microgotas la fluorescencia aumenta según el perfil de concentración que se genera en el HPLC.

Al restar los datos de la línea roja (fluorescencia solo de UMK) a los datos de la línea negra (fluorescencia de E, S y UMK) se obtiene solo la fluorescencia debida a la actividad de la enzima sobre el sustrato, es decir la fluorescencia de 4-MU, en presencia de diferentes concentraciones de UMK. Este resultado se representa con la línea azul en la Figura 4-30 la cual muestra un comportamiento muy similar al obtenido con Zanamivir, dando indicios de alguna actividad inhibitoria.

El tratamiento de los resultados se repitió para las cuatro curvas en la cruz 5 del microchip obteniéndose las gráficas de la Figura 4-31. La inhibición de la actividad enzimática es más evidente conforme se incrementa el tiempo de residencia de las microgotas en el microchip. Es decir en la "curva a" donde ha transcurrido un 15 % del tiempo total de residencia la cantidad de 4-MU que se ha producido es tan baja que la inhibición que produce el primer compuesto de UMK cae cerca del ruido del sistema. A mayor tiempo de residencia, la cantidad de 4-MU que se produce es mayor y la fluorescencia queda lejos del ruido del sistema, por la misma razón es más fácil identificar una disminución en la concentración de 4-MU a mayor porcentaje transcurrido del tiempo total de residencia de las microgotas es decir en las "curvas b, c y d".

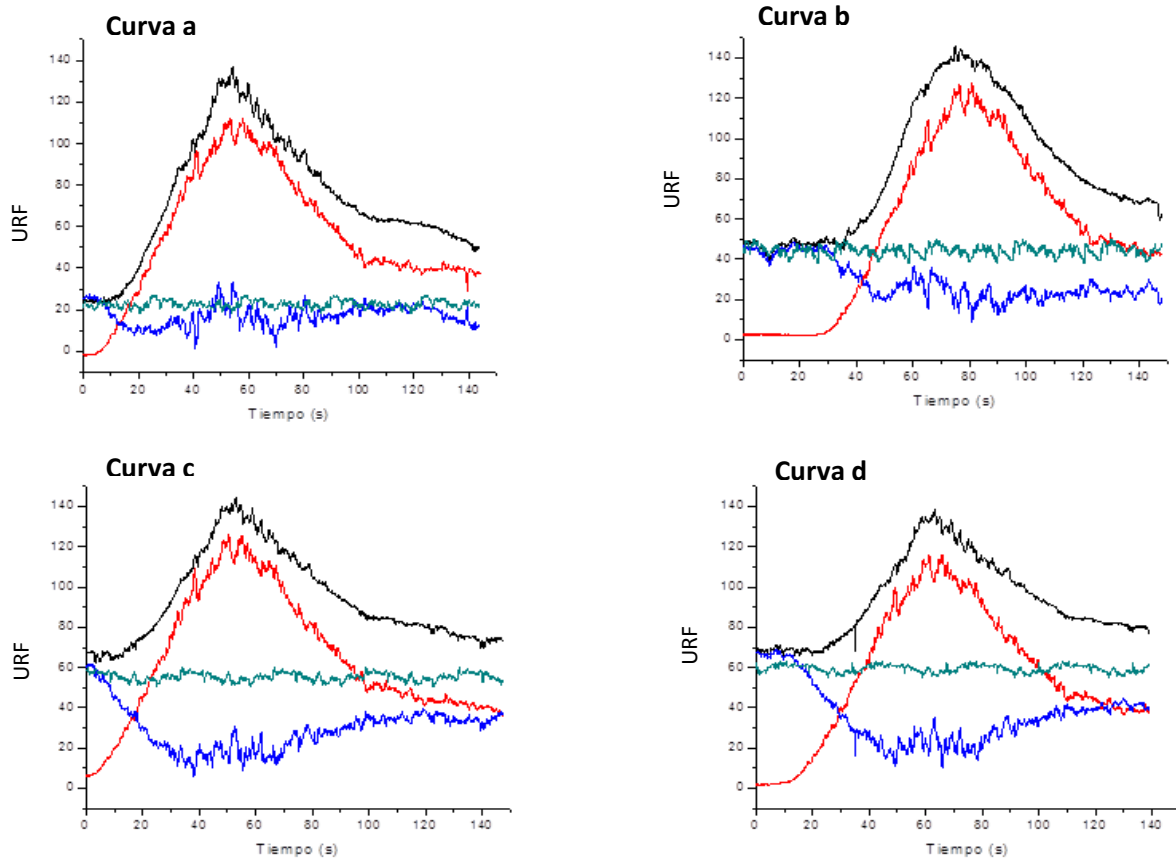


Figura 4-31. Comportamiento de la fluorescencia en las cuatro curvas de la cruz 5 del microchip a diferentes composiciones de las microgotas. La "curva a" corresponde a las gotas con menor tiempo de residencia en el microchip (6.9 s) mientras que la "curva d" corresponde a la de mayor tiempo de residencia (42.9 s), se observa como la inhibición es más cuantitativa a mayor tiempo de reacción. Línea negra; fluorescencia de las microgotas con neuraminidasa, 4-MUNANA y el 1er compuesto que eluye del extracto de UMK. Línea roja; fluorescencia de las microgotas solo con el 1er compuesto que eluye del extracto de UMK y Buffer de Fosfatos. Línea Azul; resta de la línea roja a la línea negra, corresponde a la fluorescencia solo de la 4-MU que se acumula en las microgotas en presencia de la enzima sustrato y el 1er pico de UMK. Línea verde; fluorescencia de las microgotas debida solo a la actividad de la neuraminidasa sobre 4-MUNANA sin presencia de ningún compuesto de UMK.

Aplicando la respectiva curva de calibración (obtenidas en la sección 4.4) sobre cada una de las líneas verde y azul que se muestran en las Figura 4-30 se obtienen las concentraciones de 4-MU en las gotas para cada una de las curvas en la cruz 5 del microchip. Los resultados se muestran en la Figura 4-32.

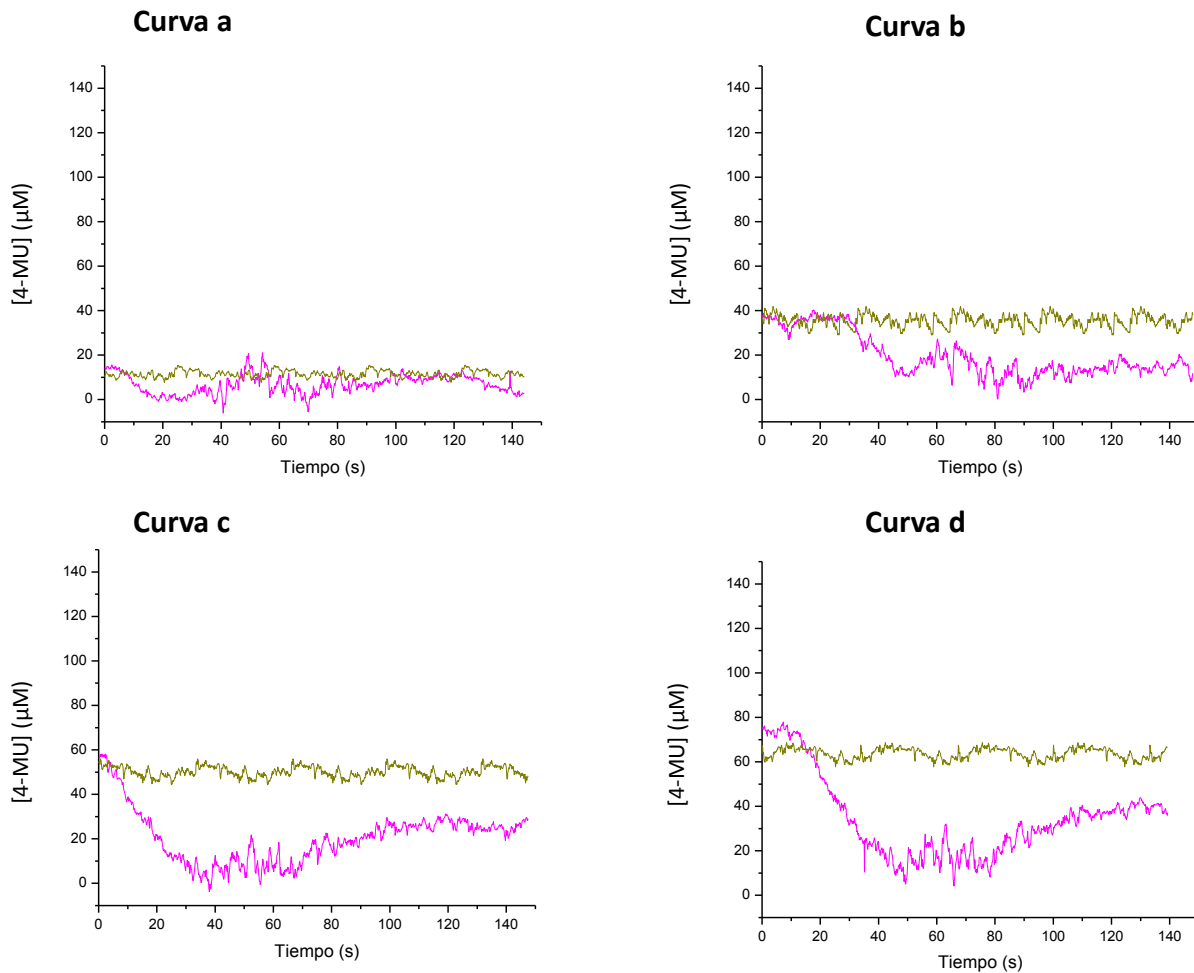


Figura 4-32. Concentración de 4-MU en las microgotas en cada una de las curvas de la cruz 5 del microchip. Línea rosa; muestra el comportamiento de la concentración de 4-MU en las microgotas que contienen enzima, sustrato y el 1er pico de UMK. Se monitoreó el comportamiento durante 145 s en cada una de las curvas. Conforme fue ingresando el 1er compuesto que eluye de UMK se observó una disminución en la concentración debido a la inhibición que este compuesto provoca sobre la actividad de la neuraminidasa. Línea dorada; muestra el comportamiento de la concentración de 4-MU en las microgotas que solo incluyen enzima y sustrato. La concentración permaneció constante durante el tiempo de monitoreo debido a que no hay actividad de ningún inhibidor. La curva A corresponde a la curva con menor tiempo de residencia (6.9 s), seguida de la curva b (18.9 s), curva c (30.9 s) y por último curva d (42.9 s).

De la Figura 4-32 se determinó el área bajo la curva de todas las líneas con Origin Pro 8. El valor obtenido se dividió entre el tiempo de video (145 s) obteniendo así la concentración promedio de 4-MU en las microgotas con y sin presencia del 1er compuesto de UMK para cada una de las cuatro curvas en el centro del microchip. Estos experimentos se repitieron

de forma independiente tres veces y el promedio de los resultados se muestran en la Figura 4-33.

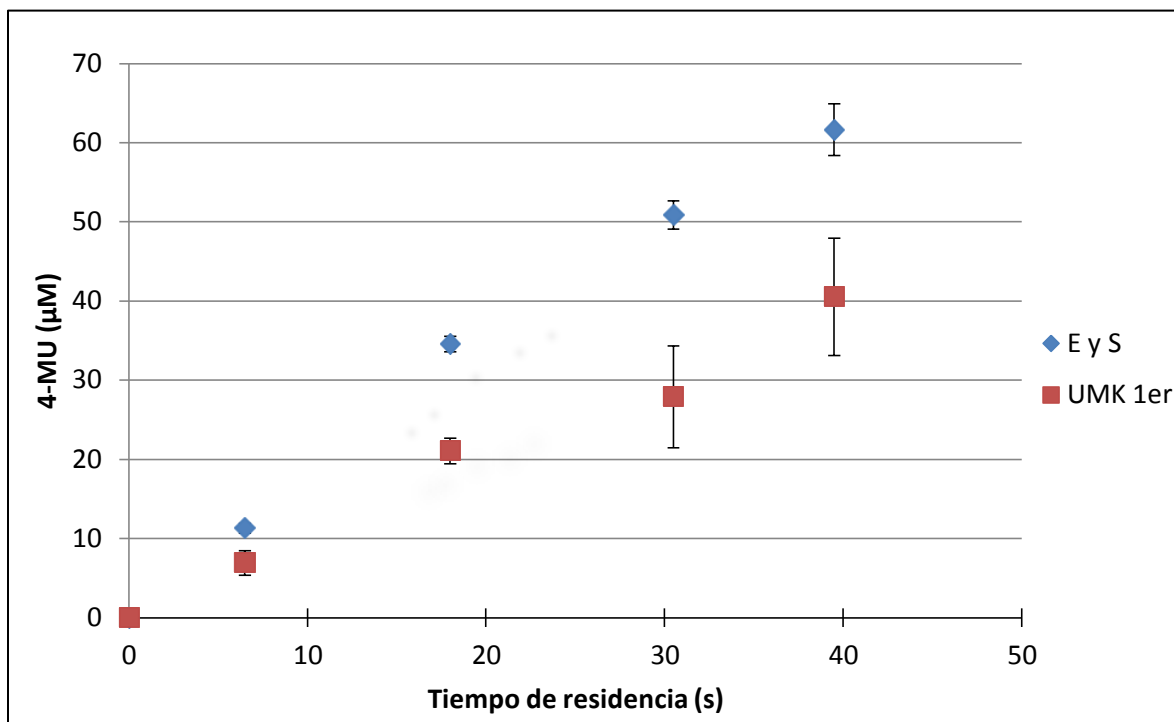


Figura 4-33. Concentración de 4-MU en función del tiempo de residencia de las gotas en el microchip. Los marcadores azules muestran la concentración de 4-MU que se acumula en las microgotas debido solo a la actividad de la neuraminidasa sobre 4-MUNANA. Los marcadores rojos muestran la concentración de 4-MU que se acumula en las microgotas que contienen neuraminidasa, 4-MUNANA y el 1er pico que eluye de UMK. Se observa una clara disminución en la concentración de 4-MU debido a la inhibición que el 1er pico de UMK provoca sobre la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*.

En la Figura 4-33 se observa claramente una disminución en la concentración de 4-MU en presencia de UMK, por lo tanto es posible concluir que se trata de un compuesto inhibidor de la neuraminidasa de *C. perfringens*.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Enrique Álvarez en nuestro laboratorio³⁸, quien demostró de manera espectrofotométrica la actividad inhibidora del extracto de UMK sobre la neuraminidasa de *C. perfringens*. Sin embargo, nosotros no solo comprobamos la actividad del extracto, sino que se logró separar el extracto en cuatro picos cromatográficos predominantes, evaluar el primero de ellos y hallar su actividad como

inhibidor de la enzima en estudio. Por cuestiones de tiempo no fue posible realizar el análisis para los siguientes picos que forman parte del extracto de UMK o identificar espectroscópicamente el primer pico cromatográfico de UMK. No obstante, lograr identificar uno es suficiente para demostrar que la técnica utilizada permite reconocer compuestos inhibidores de alguna enzima.

5 Resumen de Resultados

- Se logró evaluar la actividad enzimática de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* en un microchip de microfluídica basado en microgotas acoplado a un equipo HPLC.
- Tras la inyección en el HPLC de Zanamivir, un inhibidor conocido de la neuraminidasa de *C. perfringens*, se logró generar un gradiente de concentración del inhibidor y conservar dicho gradiente en las microgotas, de tal forma que fue posible evaluar el porcentaje de actividad de la enzima a diferentes concentraciones de Zanamivir y determinar el valor de la constante de inhibición ($K_i = 3.45 \text{ mM}$)
- Se logró resolver un pico cromatográfico que forma parte del extracto natural Umckaloabo y evaluar, dentro del microchip acoplado al HPLC, su actividad como inhibidor de la enzima en estudio.

6 Conclusiones

Es posible evaluar en un dispositivo de microfluídica asociado a un equipo HPLC, la actividad de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* siguiendo la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA a través de la técnica de fluorescencia y análisis de videos.

Así mismo, se puede llevar a cabo la separación de los componentes de una mezcla compleja, por ejemplo un extracto natural, en una columna de HPLC y mediante el acoplamiento de ésta a un dispositivo de microfluídica, evaluar la actividad inhibitoria de los componentes del extracto sobre la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*.

Por lo tanto, el método propuesto en esta tesis muestra ser eficiente para la identificación de moléculas clave a partir de las cuales se puedan desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de una enfermedad.

7 Perspectivas

Aumentar el tiempo de residencia de las gotas en los microchips favorecería el estudio de la actividad enzimática por un tiempo más prolongado, para ello se recomienda diseñar un arreglo de microcanales de mayor longitud por el cual puedan viajar las microgotas. Sin embargo, el fenómeno de migración de los compuestos hacia la fase orgánica sería muy cuantitativo, por ello, se recomienda sustituir el uso de aceite mineral en la fase orgánica por aceites fluorinados para la formación de microgotas en el diseño de fractales. Cabe mencionar que existen estudios que comprueban que el uso de aceites fluorinados en la fase orgánica con tensoactivos de la misma especie permite llevar a cabo ensayos químicos y biológicos en dispositivos de microfluídica basada en microgotas ⁴¹, en los cuales la difusión de los compuestos de la fase acuosa a la fluorinada es despreciable.

Así mismo el diseño para la inyección de disoluciones en el microchip utilizado presenta muchas fluctuaciones en los flujos y en ocasiones es difícil determinar el flujo real de HPLC que se junta con las demás disoluciones en fase acuosa. Integrar un dispositivo que permita medir el flujo de HPLC en la zona posterior a la purga permitiría regular adecuadamente y de manera automatizada el flujo de la purga y disminuir así las fluctuaciones del sistema debidas al flujo de HPLC. Una propuesta interesante para lograr esto sería integrar el trabajo de Fu, X *et al.* ⁴² el cual consiste en colocar un par de electrodos de galio en los alrededores del microcanal separados por una membrana delgada de PDMS. Los electrodos se activan mediante la aplicación de un voltaje externo permitiendo bombear y medir el flujo en el microcanal.

Una vez comprobada la eficiencia del sistema en este trabajo es recomendable utilizar la técnica para la búsqueda en diversos extractos naturales de compuestos inhibidores de la enzima neuraminidasa, ya sea de la bacteria o bien una enzima de origen viral, que funcionen como moléculas clave para el desarrollo de algún fármaco para el tratamiento de la influenza ya que sin duda es uno de los alcances de este proyecto.

8 Referencias

1. A., R. C., *Evaluation of enzymes inhibitors in drug discovery*. ed. W. Interscience ed.; ed. W. Interscience: 2005; Vol. 1, p 271.
2. Dove, A., Drug screening--beyond the bottleneck. *Nat Biotechnol* **1999**, *17* (9), 859-63.
3. Price, A. K.; Paegel, B. M., Discovery in Droplets. *Anal Chem* **2016**, *88* (1), 339-53.
4. Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature* **2006**, *442* (7101), 368-73.
5. Edgar, J. S.; Milne, G.; Zhao, Y.; Pabbati, C. P.; Lim, D. S.; Chiu, D. T., Compartmentalization of chemically separated components into droplets. *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48* (15), 2719-22.
6. deMello, J.; deMello, A., Microscale reactors: nanoscale products. *Lab Chip* **2004**, *4* (2), 11N-15N.
7. Damean, N.; Olguin, L. F.; Hollfelder, F.; Abell, C.; Huck, W. T., Simultaneous measurement of reactions in microdroplets filled by concentration gradients. *Lab Chip* **2009**, *9* (12), 1707-13.
8. Shim, J. U.; Olguin, L. F.; Whyte, G.; Scott, D.; Babbie, A.; Abell, C.; Huck, W. T.; Hollfelder, F., Simultaneous determination of gene expression and enzymatic activity in individual bacterial cells in microdroplet compartments. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (42), 15251-6.
9. Gerdts, C. J.; Elliott, M.; Lovell, S.; Mixon, M. B.; Napuli, A. J.; Staker, B. L.; Nollert, P.; Stewart, L., The plug-based nanovolume Microcapillary Protein Crystallization System (MPCS). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2008**, *64* (Pt 11), 1116-22.
10. Natarajan, S.; Katsamba, P. S.; Miles, A.; Eckman, J.; Papalia, G. A.; Rich, R. L.; Gale, B. K.; Myszka, D. G., Continuous-flow microfluidic printing of proteins for array-based applications including surface plasmon resonance imaging. *Anal Biochem* **2008**, *373* (1), 141-6.
11. Martinez-Duarte, R., Madou, M.J, SU-8 Photolithography and Its Impact on Microfluidics. *Microfluidics and Nanofluidics Handbook* **2011**, 231-268.
12. Benjamin, V. Implementación de un sistema laser para la detección continua de fluorescencia en microgotas. UNAM, Biofísicoquímica, 2012.
13. Ismagilov, R. F.; Ng, J. M.; Kenis, P. J.; Whitesides, G. M., Microfluidic arrays of fluid-fluid diffusional contacts as detection elements and combinatorial tools. *Anal Chem* **2001**, *73* (21), 5207-13.
14. Song, H.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F., A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42* (7), 768-72.
15. Song, H.; Ismagilov, R. F., Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (47), 14613-9.
16. Casadevall i Solvas, X.; Niu, X.; Leeper, K.; Cho, S.; Chang, S. I.; Edel, J. B.; deMello, A. J., Fluorescence detection methods for microfluidic droplet platforms. *J Vis Exp* **2011**, (58).
17. Han, Z.; Li, W.; Huang, Y.; Zheng, B., Measuring rapid enzymatic kinetics by electrochemical method in droplet-based microfluidic devices with pneumatic valves. *Anal Chem* **2009**, *81* (14), 5840-5.
18. Cai, L. F.; Zhu, Y.; Du, G. S.; Fang, Q., Droplet-based microfluidic flow injection system with large-scale concentration gradient by a single nanoliter-scale injection for enzyme inhibition assay. *Anal Chem* **2012**, *84* (1), 446-52.
19. Theberge, A. B.; Whyte, G.; Huck, W. T., Generation of picoliter droplets with defined contents and concentration gradients from the separation of chemical mixtures. *Anal Chem* **2010**, *82* (9), 3449-53.

20. Kim, J. Y.; Cho, S. W.; Kang, D. K.; Edel, J. B.; Chang, S. I.; deMello, A. J.; O'Hare, D., Lab-chip HPLC with integrated droplet-based microfluidics for separation and high frequency compartmentalisation. *Chem Commun (Camb)* **2012**, *48* (73), 9144-6.
21. Corfield, T., Bacterial sialidases--roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology* **1992**, *2* (6), 509-21.
22. Takada, K.; Hamada, T.; Hirota, H.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.; van Soest, R. W.; Fusetani, N., Asteropine A, a sialidase-inhibiting conotoxin-like peptide from the marine sponge *Asteropus simplex*. *Chem Biol* **2006**, *13* (6), 569-74.
23. Krug, R. M.; Aramini, J. M., Emerging antiviral targets for influenza A virus. *Trends Pharmacol Sci* **2009**, *30* (6), 269-77.
24. McKimm-Breschkin, J. L., Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses* **2013**, *7 Suppl 1*, 25-36.
25. Prevention, C. f. D. C. a., Update: Influenza activity -United States, September 28, 2008-January 31, 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly* **2009**, *rep. 58*, 115-119.
26. Newstead, S. L.; Potter, J. A.; Wilson, J. C.; Xu, G.; Chien, C. H.; Watts, A. G.; Withers, S. G.; Taylor, G. L., The structure of *Clostridium perfringens* NanI sialidase and its catalytic intermediates. *J Biol Chem* **2008**, *283* (14), 9080-8.
27. Chokhawala, H. A.; Yu, H.; Chen, X., High-throughput substrate specificity studies of sialidases by using chemoenzymatically synthesized sialoside libraries. *Chembiochem* **2007**, *8* (2), 194-201.
28. Ishimoto, T.; Jigawa, K.; Henares, T. G.; Endo, T.; Hisamoto, H., Integration of neuraminidase inhibitor assay into a single-step operation using a combinable poly(dimethylsiloxane) capillary sensor. *Analyst* **2013**, *138* (11), 3158-62.
29. Ho, H. Y.; Cheng, M. L.; Weng, S. F.; Leu, Y. L.; Chiu, D. T., Antiviral effect of epigallocatechin gallate on enterovirus 71. *J Agric Food Chem* **2009**, *57* (14), 6140-7.
30. Schotz, K.; Noldner, M., Mass spectroscopic characterisation of oligomeric proanthocyanidins derived from an extract of *Pelargonium sidoides* roots (EPs 7630) and pharmacological screening in CNS models. *Phytomedicine* **2007**, *14 Suppl 6*, 32-9.
31. Janecki, A.; Conrad, A.; Engels, I.; Frank, U.; Kolodziej, H., Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *Pelargonium sidoides* (EPs(R) 7630) for its activity against group A-streptococci adherence to human HEP-2 epithelial cells. *J Ethnopharmacol* **2011**, *133* (1), 147-52.
32. Beil, W.; Kilian, P., EPs 7630, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *Phytomedicine* **2007**, *14 Suppl 6*, 5-8.
33. Bao, Y.; Gao, Y.; Koch, E.; Pan, X.; Jin, Y.; Cui, X., Evaluation of pharmacodynamic activities of EPs(R) 7630, a special extract from roots of *Pelargonium sidoides*, in animals models of cough, secretolytic activity and acute bronchitis. *Phytomedicine* **2015**, *22* (4), 504-9.
34. Segel, I. H., *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*. 1 ed.; 1993; Vol. 1, p 955.
35. Katsuki, H. T., Fractal-shaped microchannel design for a kinetic analysis of biochemical reaction in a delay lin. *Microfluidics and Nanofluidics Handbook* **2012**, *2* (13), 273-278.
36. Haubert, K.; Drier, T.; Beebe, D., PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system. *Lab Chip* **2006**, *6* (12), 1548-9.
37. Castelleros, E. Acoplamiento de un instrumento HPLC para la identificación de inhibidores enzimáticos. Tesis, UNAM, Biofísicoquímica, 2015.
38. Álvarez, E. Evaluación de extractos naturales con posible efecto inhibitorio de la actividad enzimática de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* por medio de ensayos espectrofotométricos. Tesis, UNAM, Biofísicoquímica, 2013.
39. Database, P. O. C. Compound Summary for CID 60855, Zanamivir. (accessed 1-06-16).

40. Ge, J.; Liu, F.; Holmes, E. H.; Ostrander, G. K.; Li, Q. X., Aqueous normal phase liquid chromatography coupled with tandem time-of-flight quadrupole mass spectrometry for determination of zanamivir in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2012**, *906*, 58-62.
41. DeJournette, C. J.; Kim, J.; Medlen, H.; Li, X.; Vincent, L. J.; Easley, C. J., Creating biocompatible oil-water interfaces without synthesis: direct interactions between primary amines and carboxylated perfluorocarbon surfactants. *Anal Chem* **2013**, *85* (21), 10556-64.
42. Fu, X.; Mavrogiannis, N.; Doria, S.; Gagnon, Z., Microfluidic pumping, routing and metering by contactless metal-based electro-osmosis. *Lab Chip* **2015**, *15* (17), 3600-8.

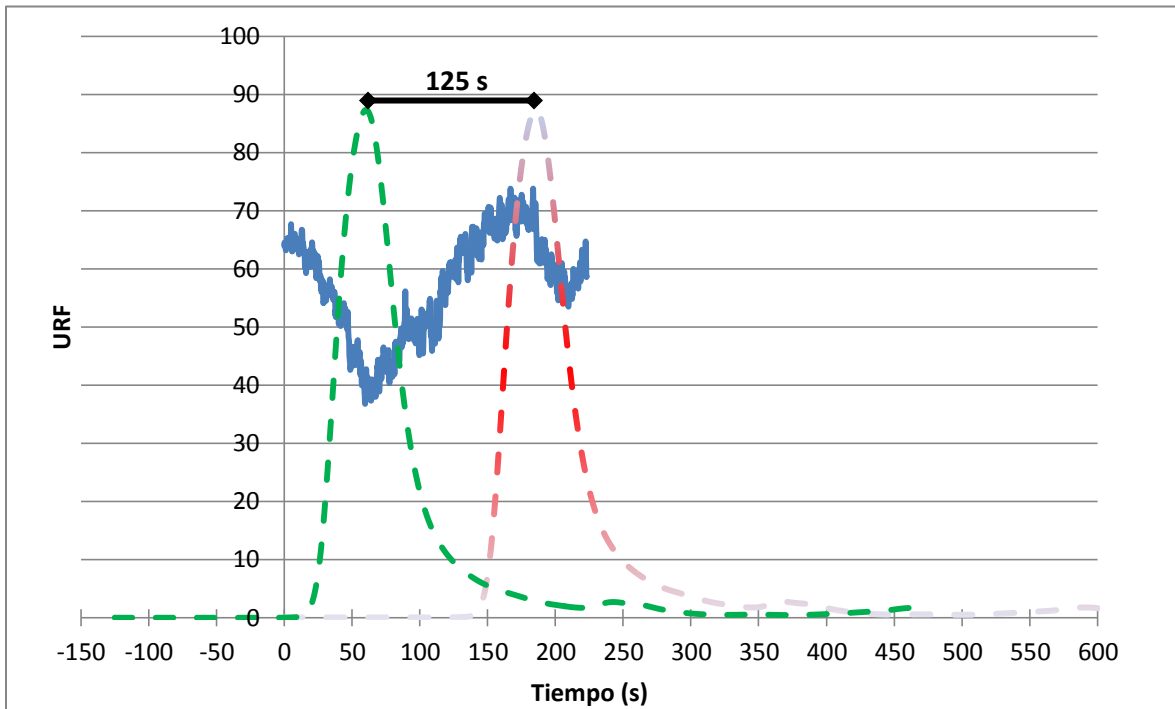
9 Anexo I

Ejemplo de la alineación del cromatograma de Zanamivir con las señales de fluorescencia obtenidas mediante el análisis de videos.

Para el análisis de los resultados obtenidos durante los ensayos enzimáticos en presencia de Zanamivir se llevó a cabo la alineación del cromatograma generado por el detector del HPLC con las señales de fluorescencia obtenidas mediante el análisis de videos.

Cuando se observa una señal en el detector del HPLC el compuesto que la genera tarda 95 s en recorrer el resto del sistema del HPLC, ingresar al microchip, llegar a la intersección de la fase acuosa y formar parte de las microgotas. Sin embargo para observar ese compuesto en algún punto del microchip es necesario esperar los 95 s ya descritos más el tiempo de residencia asociado a cada curva en el microchip. Por ejemplo, una vez que se observa una señal el detector del HPLC se deben esperar 125 s para observar ese compuesto en la “curva c” del centro del microchip, la cual tiene asociado un tiempo de residencia de 30 s.

En la siguiente figura, la línea azul muestra el comportamiento de la fluorescencia en la “curva c” del centro del microchip, la cual parte de cero debido a que arbitrariamente se fija como cero el momento en que se comienza a tomar el video. La línea roja es el tiempo real del cromatograma que se obtiene tras la inyección en el HPLC, esta se encuentra desfasada hacia delante por 125 s ($95 + 30$) con respecto a la línea azul, debido a que, el fijar como cero el tiempo de video genera un desplazamiento hacia la izquierda del eje del tiempo. De tal forma que para alinear el cromatograma con la señal de fluorescencia es necesario restar los mismos 125 s al tiempo del cromatograma, para generar un desplazamiento uniforme de ambas señales. Obteniéndose entonces la línea verde punteada que describe el aumento de la concentración de Zanamivir en las microgotas durante el tiempo de video.



Alineación del cromatograma obtenido en el detector del HPLC con la señal de fluorescencia en la “curva c” del centro del microchip (tiempo de residencia 30 s). La línea roja corresponde al tiempo de análisis real del cromatograma. La línea azul muestra el comportamiento de la fluorescencia durante el tiempo de video. El momento en que se comienza a tomar el video se fija arbitrariamente como cero generando un desplazamiento hacia la izquierda del eje x. Por lo tanto, es necesario desplazar también el cromatograma para su alineación. El cromatograma se debe desplazar 125 s que es el tiempo que tarda en llegar un compuesto que se observa en el detector a la “curva c” del microchip (95 del detector a la formación de microgotas más 30 s en llegar hasta la curva c), entonces se obtiene la línea verde que describe el aumento de la concentración de Zanamivir en las microgotas.