



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**EVALUACIÓN DE LA ENZIMA  $\beta$ -GLUCOSIDASA UTILIZANDO DISPOSITIVOS  
LAB-ON-CHIP**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. F. B. FRANCISCO MIGUEL HERNÁNDEZ MAYA

Tutor

DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

EVALUACIÓN DE LA ENZIMA  $\beta$ -GLUCOSIDASA UTILIZANDO DISPOSITIVOS  
LAB-ON-CHIP

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Q. F. B. FRANCISCO MIGUEL HERNÁNDEZ MAYA**



CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2016

### **Jurado Asignado**

Presidenta	Dra. Martha Patricia García Camacho
Vocal	Dra. Alejandra Hernández Santoyo
Vocal	Dr. Leopoldo Ruiz Huerta
Vocal	Dr. Luis Fernando Olguín Contreras
Secretario	Dra. Ana Lilia Ocampo Flores

### **Lugar donde se desarrolló la tesis**

Laboratorio 211 del edificio F perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutora de la tesis:

---

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

Este trabajo se presentó en el 50° Congreso Mexicano de Química 2015 de la Sociedad Química de México bajo la modalidad de cartel.

## **Agradecimientos**

Al CONACYT por la beca otorgada para manutención durante mis estudios de maestría con número de CVU 591876 y número de becario 308222.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, Proyecto IN218415 titulado “Diseño, construcción y evaluación de microdispositivos para aplicaciones químicas y biológicas” por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

Al COMECYT por la beca otorgada para la escritura de tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

A la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

A la Dra. María del Pilar Cañizares Macías por permitirme formar parte de su grupo de investigación, y brindarme su confianza, apoyo, paciencia y dirección durante los estudios de maestría.

Al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras por la asesoría brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho, a la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, al Dr. Leopoldo Ruiz Huerta, al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras y a la Dra. Ana Lilia Ocampo Flores por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus valiosas aportaciones al mismo.

## **Dedicatoria**

A mi esposa Gabriela y a mi hijo Santiago, quienes me acompañaron en este camino y son mi gran motivación, los amo.

# Contenido

<b>Símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>9</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>13</b>
2.1. Enzimas.....	13
2.1.1. Cinética enzimática .....	14
2.1.2. $\beta$ -glucosidasa .....	17
2.2. Microfluídica .....	19
2.2.1. Física de los microfluidos .....	20
2.2.1.1. Número de Reynolds.....	20
2.2.2. Mezclado de microfluidos.....	21
2.3. Métodos de fabricación de microchips.....	22
2.3.1. Fotolitografía .....	22
2.3.2. Litografía suave.....	24
2.3.3. Materiales para fabricación de microchips.....	25
2.3.3.1. Poli (dimetil siloxano) .....	25
2.4. Inmovilización de enzimas .....	27
2.4.1. Inmovilización covalente .....	27
2.4.2. Inmovilización de enzimas en poli (dimetil siloxano) .....	28
2.5. Métodos de detección .....	29
2.5.1. Absorbancia UV-vis.....	29
2.5.2. Detección óptica.....	30
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>33</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>33</b>
General.....	33
Específicos .....	33
<b>5. Metodología .....</b>	<b>34</b>
5.1. Equipos, instrumentos, reactivos y programas computacionales.....	34
5.2. Diseño de microchips .....	36
5.3. Fabricación de micromoldes .....	37
5.4. Fabricación de microchips.....	38
5.5. Inmovilización de la enzima $\beta$ -glucosidasa en poli (dimetil siloxano).....	41
5.6. Caracterización de microchips .....	42

5.7. Estudios preliminares .....	42
5.7.1. Comparativo entre la lámpara de halógeno y la lámpara LED .....	42
5.7.2. Verificación de bombas de jeringas .....	43
5.7.3. Evaluación de los sistemas de calentamiento de los microchips .....	44
5.7.4. Espectro de absorción de las sustancias involucradas en la reacción enzimática.....	46
5.8. Evaluación de las condiciones de análisis del p-nitrofenol .....	46
5.8.1. Volumen de inyección .....	47
5.8.2. Elaboración del diagrama de distribución de especies p-nitrofenol – p-nitrofenolato.....	47
5.8.3. Evaluación del pH, fuerza iónica y longitud del reactor para la cuantificación del PN ...	49
5.8.4. Validación del método para la cuantificación del p-nitrofenol.....	50
5.8.4.1. Linealidad e intervalo de concentración del p-nitrofenol.....	51
5.8.4.2. Precisión.....	51
5.8.4.2.1. Repetibilidad.....	51
5.8.4.2.2. Precisión intermedia, variación día-día .....	52
5.8.4.3. Robustez de los parámetros internos .....	52
5.8.4.4. Especificidad .....	53
5.8.4.5. Límite de detección y cuantificación .....	53
5.9. Optimización de las condiciones en el dispositivo Lab-On-Chip para la reacción enzimática de la $\beta$ -glucosidasa en su forma libre e inmovilizada .....	53
5.9.1. Temperatura, fuerza iónica y pH del medio de reacción .....	53
5.9.2. Evaluación del caudal y las dimensiones del reactor en el dispositivo LOC para la reacción enzimática.....	55
5.10. Evaluación de la actividad de la enzima $\beta$ -glu libre e inmovilizada en un dispositivo LOC.	56
5.11. Estimación de la cantidad de enzima inmovilizada en el dispositivo LOC .....	57
5.12. Estabilidad de la enzima $\beta$ -glu libre e inmovilizada.....	58
<b>6. Resultados y discusión .....</b>	<b>60</b>
6.1. Caracterización de los microchips.....	60
6.2. Estudios preliminares .....	61
6.2.1. Comparativo entre la lámpara de halógeno y la lámpara LED .....	61
6.2.2. Espectro de absorción de las sustancias involucradas en la reacción enzimática.....	63
6.2.3. Verificación de las bombas de jeringas.....	65
6.2.4. Evaluación del sistema de calentamiento .....	65
6.3. Evaluación de las condiciones de análisis del p-nitrofenol .....	67
6.3.1. Volumen de inyección .....	67
6.3.2. Diagrama de distribución de especies p-nitrofenol – p-nitrofenolato.....	68



6.3.3. Evaluación del pH, fuerza iónica y longitud del reactor para la cuantificación del p-nitrofenol .....	69
6.3.4. Validación del método para la cuantificación del p-nitrofenol .....	71
6.3.4.1. Linealidad e intervalo de concentraciones .....	71
6.3.4.2. Precisión .....	73
6.3.4.3. Robustez de los parámetros internos .....	74
6.3.4.4. Especificidad .....	75
6.3.4.5. Límite de detección y cuantificación .....	75
6.4. Optimización de las condiciones para la reacción enzimática de la $\beta$ -glu, libre e inmovilizada, en un dispositivo LOC .....	77
6.4.1. Enzima libre .....	78
6.4.2. Enzima inmovilizada .....	79
6.4.3. Evaluación del caudal y las dimensiones del reactor en el dispositivo LOC para la reacción enzimática .....	80
6.5. Evaluación de la actividad de la enzima $\beta$ -glu libre en un dispositivo Lab-On-Chip .....	81
6.6. Estimación de la cantidad de la enzima inmovilizada en un dispositivo LOC .....	85
6.7. Evaluación de la actividad de la enzima $\beta$ -glucosidasa inmovilizada en un dispositivo LOC .....	86
6.8. Comparativo de los parámetros cinéticos entre la enzima libre e inmovilizada .....	90
6.9. Estabilidad de la enzima $\beta$ -glu libre e inmovilizada .....	91
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>93</b>
<b>8. Perspectivas .....</b>	<b>94</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>95</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>100</b>

## Símbolos y abreviaturas

Id <sub>i</sub>	Diferencia absoluta
° C	Grados Celsius
ε	Coeficiente de absortividad molar
μCP	Micro-contact printing, impresión por micro-contacto
μM	Concentración micromolar
μm	Micrómetro
μL	Microlitro
μRM	Micro-replica molding, moldeo por micro-réplica
μTAS	Micrototal analysis system, micro-sistema de análisis total
μTM	Micro-transfer molding, moldeo por micro-transferencia
β-glu	β-glucosidasa
A	Absorbancia
APTES	(3-aminopropil) trietoxisilano
C	Concentración
cm	Centímetro
C.V.	Coeficiente de variación
D.E.	Desviación estándar
DGEBA	Diglicil éter de bisfenol-A
E	Enzima
ES	Complejo enzima-sustrato
FIA	Análisis por inyección en flujo (flow-injection analysis)
g	Gramo
GA	Glutaraldehído
GL	Grados de libertad
h	Hora
I	Intensidad de radiación emergente
I <sub>0</sub>	Intensidad de radiación incidente
kDa	Kilodalton
<i>k<sub>cat</sub></i>	Constante catalítica
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis-Menten
l	Longitud de paso óptico
LOC	Lab-On-Chip, laboratorio en un chip
LED	Light-emitting diode, diodo emisor de luz
M	Concentración molar
MIMIC	Micro-molding in capillaries, micro-moldeo en capilares
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar

mm	Milímetro
NaBH <sub>4</sub>	Borohidruro de sodio
nm	Nanómetro
P	Producto
PDMS	Poli (dimetil siloxano)
Pe	Número de Péclét
pH	Potencial de Hidrógeno
PNPG	p-nitrofenil β-D-glucopiranosido
PN	p-nitrofenol, 4-nitrofenol
PTFE	Poli (tetrafluoruro de etileno)
r	Coeficiente de correlación
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinación
Re	Número de Reynolds
rpm	Revolución por minuto
s	Segundo
S	Sustrato
SA	Solución amortiguadora de amoniaco
SF	Solución de fosfatos
UA	Unidades de absorbancia
UE	Unidades de enzima
UV	Ultravioleta
vis	Visible
V <sub>0</sub>	Velocidad inicial
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima

## Resumen

Se diseñó y fabricó un microdispositivo (microchip, dispositivo Lab-On-Chip) para evaluar la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, libre e inmovilizada, utilizando como sustrato el p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido en una solución de fosfatos 0.01 M, pH 5.0 y temperatura de 45 °C. Para la detección espectrofotométrica del p-nitrofenol, producto de la reacción, se debió ajustar el pH del medio a 10.0.

Los microdispositivos a base de poli (dimetil siloxano) se fabricaron por medio de las técnicas de fotolitografía y litografía suave. La configuración se formó por tres bombas de jeringas, un sistema de calentamiento, el microchip, el cual contenía tres secciones: la primera, donde se llevó a cabo la reacción enzimática; la segunda, donde se ajustó el pH para la detección del producto enzimático (p-nitrofenol); la tercera, paso óptico, donde se realizó la detección espectrofotométrica insertando dos fibras ópticas (una conectada a la fuente de luz y la otra al detector) en el microchip separadas por dicho paso óptico de 0.7 cm de longitud.

La inmovilización de la enzima en las paredes del microcanal de poli (dimetil siloxano) se logró de manera covalente por medio de glutaraldehído y 3-aminopropiltriethoxisilano.

Se optimizó y validó la cuantificación del p-nitrofenol en el dispositivo Lab-On-Chip, destacando un intervalo lineal de 17-500  $\mu$ M y límite de detección y cuantificación de 4  $\mu$ M y 17  $\mu$ M, respectivamente.

Se optimizaron las condiciones de la reacción de la enzima libre e inmovilizada siendo para ambas pH 5.0, fuerza iónica 0.01 M y temperatura de 45 °C. La actividad en estas condiciones fueron: para enzima libre,  $K_m$  de 9.4 mM,  $V_{max}$  0.7 mM/min,  $k_{cat}$  6538.5  $\text{min}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m$  693.5  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ; para enzima inmovilizada,  $K_m$  de 2.5 mM,  $V_{max}$  2.2 mM/min,  $k_{cat}$  908.3  $\text{min}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m$  363.3  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ .

Del presente estudio se demostró que es posible llevar a cabo la evaluación de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en dispositivos Lab-On-Chip, siendo esta una alternativa rápida, eficiente, confiable económica y amigable con el ambiente aunque la enzima inmovilizada (bajo las condiciones mencionadas) perdió alrededor del 50 % de su eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) con respecto a la enzima libre, su estabilidad fue mayor.

## 1. Introducción

Las  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -glu) son enzimas que se pueden encontrar en bacterias, hongos, plantas y animales, desempeñando diversas funciones fundamentales como: completar la hidrólisis de polisacáridos, convirtiendo a los oligosacáridos (intermediarios de la hidrólisis) en monosacáridos, catabolismo de glucoconjugados lisosomales, procesamiento de glucoproteínas y biosíntesis de oligosacáridos a glucoproteínas o glucolípidos [1–4].

El interés en las  $\beta$ -glucosidasas se ha incrementado debido a sus aplicaciones biotecnológicas e industriales tales como: intermediarios en el proceso de conversión de biomasa a etanol; obtención de isoflavonas a partir de soya; en la elaboración de jugos, vinos y té, ya que se encarga de liberar compuestos volátiles rompiendo los enlaces glucosa-terpeno lo que les confiere su aroma característico; obtención de fragancias a partir de flores; bioindicador de suelos; síntesis de oligosacáridos y alquil glicósidos utilizados como agentes terapéuticos, herramientas de diagnóstico y promotores del crecimiento [1,4–8]. Su aplicación se puede llevar a cabo con la enzima libre en el medio o inmovilizada en un soporte.

Debido a estas aplicaciones, resulta necesario el control de calidad de las enzimas, ya sea cuantificándolas o evaluando su actividad durante las diferentes etapas de los procesos por medio de métodos analíticos atractivos en cuanto a economía, impacto ambiental y tiempos de análisis, sin comprometer su eficiencia. Los dispositivos Lab-On-Chip (dispositivos LOC) reúnen tales características debido a que en ellos se miniaturizan e integran diferentes operaciones como el control de fluidos, control de temperatura, mezclado, reacción, separación, concentración, medición, etc. [9–11].

En el presente trabajo se evaluó la actividad de la enzima  $\beta$ -glu libre e inmovilizada (utilizando como sustrato el p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido, PNPG) en dispositivos LOC, hechos de poli (dimetilsiloxano), PDMS, los cuales ofrecen una opción sencilla desde el diseño y fabricación de microchips hasta el montaje y optimización de todo el aparato de análisis.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Enzimas

Los sistemas vivos presentan una gran variedad de reacciones bioquímicas, sin las cuales no

sería posible su existencia, casi la totalidad de dichas reacciones son mediadas por un conjunto de catalizadores biológicos llamados enzimas [12].

Las enzimas son en su mayoría proteínas que, como se mencionó anteriormente, tienen función catalítica transformando reactivos específicos (llamados sustratos) a productos. La catálisis se lleva a cabo en un lugar específico de la enzima, el cual se conoce como sitio activo. Las enzimas de tipo proteico están formadas por aminoácidos, los grupos sustituyentes de dichos aminoácidos unen al sitio activo con el sustrato y catalizan su transformación química. En dicha unión están implicados enlaces iónicos, interacciones de Van der Waals, electrostáticas, puentes de hidrógeno e hidrófobas [13–15]. Emil Fisher [14] estudió la especificidad de las enzimas y propuso que su sitio era estructuralmente complementario a su sustrato (modelo llave-cerradura), sin embargo, estudios de difracción de rayos X indican que el sitio activo de la mayoría de las enzimas se encuentra pre-formado, pero sufren cierto cambio en su conformación ante la unión del sustrato (ajuste inducido) [12–14].

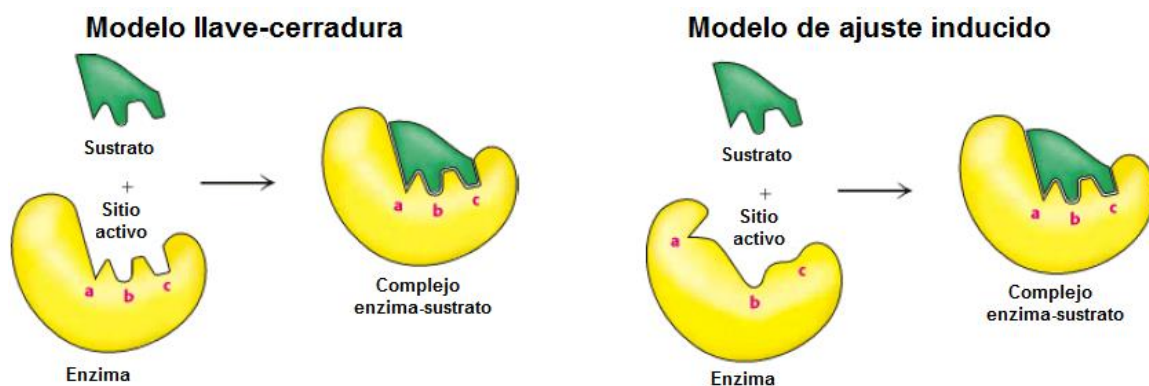


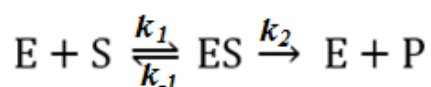
Figura 2.1. Modelo de llave-cerradura y ajuste inducido, imagen tomada de [14].

Una vez que se unen la enzima y el sustrato se llevan a cabo diferentes mecanismos para la catálisis. En primera instancia, la energía de fijación utilizada para formar el complejo enzima-sustrato colabora en el mecanismo catalítico, por otra parte, los grupos funcionales catalíticos situados adecuadamente ayudan en la ruptura o formación de enlaces por medio de diversos mecanismos como la catálisis ácido-base, catálisis covalente y catálisis de iones metálicos, ya sea de manera individual o conjunta. Por último el producto se libera y la enzima regresa a su forma original [12,13].

### 2.1.1. Cinética enzimática

Ya sea que las enzimas se unan a uno o varios tipos de sustrato, de forma covalente o no covalente, todas pueden analizarse de modo que sus velocidades de reacción y su eficiencia global pueda cuantificarse [12].

En 1902, Brown [16] en su investigación sobre la velocidad de la hidrólisis de la sacarosa por medio de la  $\beta$ -fructofuranosidasa encontró que cuando la concentración de la sacarosa es superior a la de la enzima, la velocidad de la reacción se hace independiente de la concentración de la sacarosa [12,16]. En 1913, Michaelis y Menten [13] describieron una teoría general de la acción enzimática, donde la reacción global estaba compuesta por dos reacciones elementales, en la primera, la enzima y el sustrato se unen reversiblemente y formar un complejo enzima-sustrato y, en la segunda, se libera el producto y la enzima queda en su forma original [12]. La ecuación 2.1 representa una reacción global sencilla para un sustrato, donde: E es la enzima; S es el sustrato; ES es el complejo enzima-sustrato; P es el producto;  $k_1$ ,  $k_{-1}$  y  $k_2$  son las constantes de velocidad de reacción [13,17].



Ecuación 2.1

La relación de concentración de enzima y sustrato es uno de los factores que afectan la velocidad de una reacción catalizada. En la mayoría de las enzimas,

incluida la  $\beta$ -glu, hay saturación por el sustrato u ocupación de los centros activos de la totalidad de las moléculas de enzima.

Un método común para estudiar los mecanismos de reacción enzimáticos consiste en la determinación de la velocidad de la reacción y el modo en que varía al modificar ciertos parámetros experimentales. La velocidad inicial ( $V_0$ ) se puede determinar por medio de una curva de progreso de una reacción enzimática, donde se mezcla la enzima y su sustrato, se mide la cantidad de producto generado al transcurrir el tiempo (gráfica de la concentración del producto contra el tiempo). La  $V_0$  se encuentra en la región lineal de la gráfica, mencionada anteriormente, o cuando menos del 10 % del sustrato se ha convertido en producto, esto se hace con la finalidad de minimizar el efecto de la reversibilidad de la reacción y la inhibición debida al producto [13,18]. Al graficar la velocidad inicial contra la concentración del sustrato se obtiene un comportamiento similar al presentado en la figura 2.2 (siempre que la enzima siga el modelo de Michaelis-Menten), donde, se pueden observar tres diferentes fases: cuando la concentración del sustrato es relativamente baja, muy inferior a la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), existe una relación lineal entre la velocidad de la reacción y la concentración del sustrato, por lo tanto, la cinética es de primer orden (región de color verde); a concentraciones del sustrato elevadas, con respecto a la concentración de la enzima, muy superior a la  $K_m$ , la velocidad de la reacción se hace prácticamente constante, semejante a la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), e independiente de la concentración del sustrato, la cinética se considera de orden cero (región de color amarillo); para concentraciones del sustrato intermedias la velocidad del proceso deja de ser lineal, y a esta zona se le denomina cinética mixta (región sin color) [17,19].



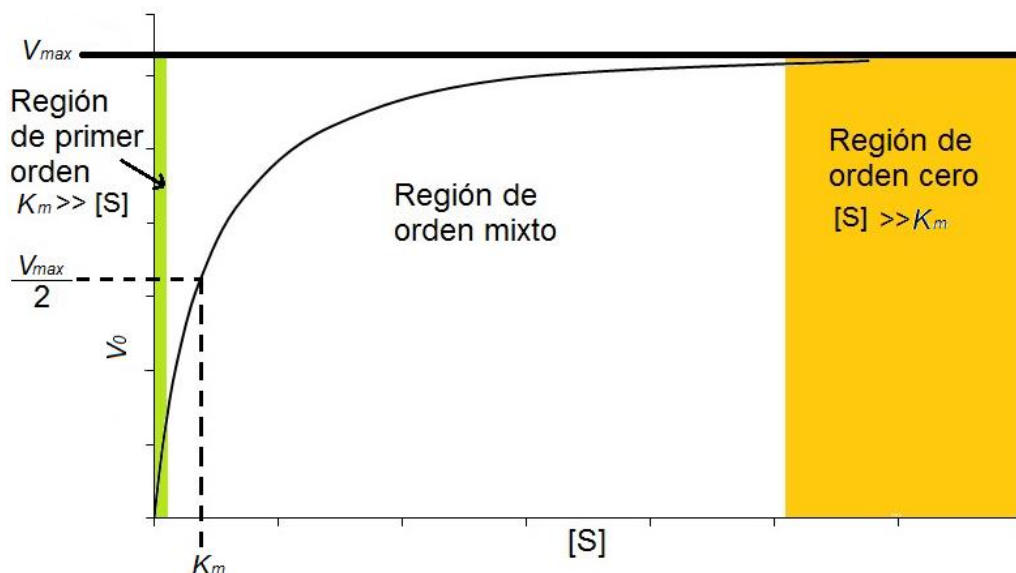


Figura 2.2. Cinética enzimática, modelo de Michaelis-Menten.

Este comportamiento se expresa algebraicamente con la ecuación de Michaelis-Menten, ecuación 2.2, la cual dedujeron a partir de la hipótesis de que el paso limitante de la velocidad en las reacciones enzimáticas es la descomposición del complejo enzima-sustrato para formar el producto libre y la enzima. Además se asume la existencia del estado estacionario introducida por Briggs y Haldane, que es una fase donde la concentración del complejo enzima-sustrato permanece constante con el tiempo [13,20].

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Al graficar la velocidad de reacción contra la concentración del sustrato no siempre es posible determinar la velocidad máxima, ya que se debe de llegar a la región de orden cero y esto se logra a concentraciones altas del sustrato, sin embargo, se pueden manipular los resultados obtenidos del modelo de Michaelis-Menten para lograr gráficos lineales donde la  $K_m$  y  $V_{max}$  se calculen a partir de sus pendientes e interceptos. Algunos métodos matemáticos desarrollados para esta finalidad son las representaciones de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes-Wolf, además de programas computacionales como Sigmaplot, Minitab, etc. [21,22].

### 2.1.2. $\beta$ -glucosidasa

Las  $\beta$ -glucosidasas, son un grupo de enzimas que pertenecen a la familia 1 de las glicósido-hidrolasas, catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos, rompiendo uniones entre dos carbohidratos o un carbohidrato y una aglucona, bajo condiciones específicas también pueden formar enlaces glucosídicos [3,23].

La enzima  $\beta$ -glucosidasa de las almendras es un homodímero que consiste de dos subunidades de 65 kDa y es una glicoproteína, tiene una solubilidad en agua de 1 mg/mL, en la figura 2.3 se muestra la estructura de la  $\beta$ -glucosidasa. No requiere de un activador, sin embargo es inhibida por la gluconolactona, fuconolactona, castanospermina, 1-deoxinojirimicina, eritritol, polioles, etc. [24].

La catálisis de las enzimas glicósido-hidrolasas involucra una reacción de doble desplazamiento, requiriendo un donador de protón y un nucleófilo. El sitio activo de las enzimas glicósido-hidrolasas de la familia 1 tiene forma de bolsillo, típico para la unión con carbohidratos, ya que contiene grupos cargados, aromáticos y polares. En él se encuentra el péptido Ile-Thr-Glu-Asn-Gly (isoleucina-treonina-ácido glutámico-asparagina-glicina), donde el Glu<sup>397</sup> con su grupo carboxilo ionizado actúa como nucleófilo, en otro péptido de la enzima se encuentra el Glu<sup>183</sup> que actúa como donador de un protón [25,26]. En la figura 2.4 se presenta el sitio activo de la enzima  $\beta$ -glucosidasa. La figura 2.5 muestra la reacción con el PNPG y la figura 2.6 muestra el mecanismo de reacción de la  $\beta$ -glu.



Figura 2.3. Estructura en tercera dimensión de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, familia 1 de las glicósido-hidrolasas. Imagen tomada de [27].

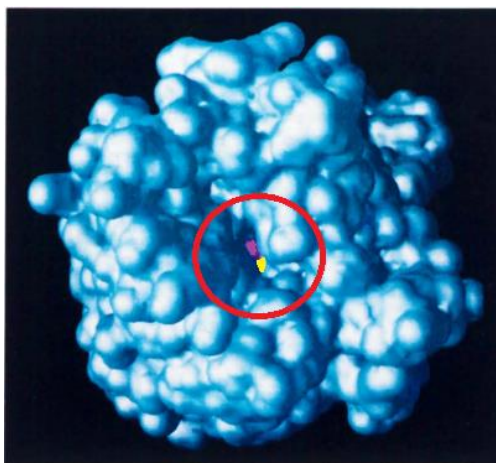


Figura 2.4. Sitio catalítico de la enzima  $\beta$ -glucosidasa (en forma de bolsillo, ubicado dentro de la circunferencia roja), la zona marcada de color morado representa al Glu<sup>397</sup> (nucleófilo) y la de color amarillo es el Glu<sup>183</sup> (donador de proton). Imagen tomada de [27].

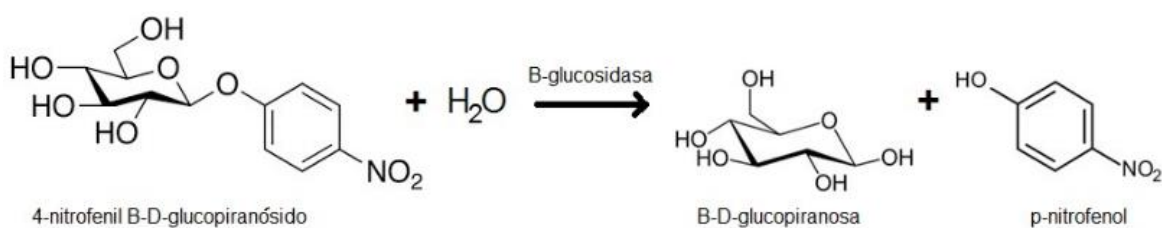


Figura 2.5. Reacción enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa con el p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido en medio acuoso. Imagen modificada de [28].

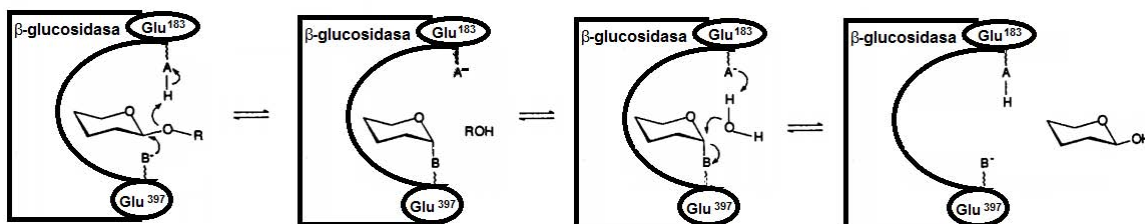


Figura 2.6. Mecanismo de hidrólisis del enlace  $\beta$ -glucosídico con retención de la estructura de la glucosa: el oxígeno del enlace glicosídico es protonado por el grupo carboxilo del Glu<sup>183</sup> (residuo de ácido glutámico), por otra parte el grupo carboxilo ionizado del Glu<sup>397</sup> actúa como nucleófilo sobre el enlace  $\beta$ -glucosídico, así se forma un intermediario enzima-sustrato y se libera un alcohol (R-OH), posteriormente dicho intermediario se hidroliza utilizando una molécula de agua, liberándose una molécula de carbohidrato. Figura y texto tomado de [26].

Se pueden encontrar en bacterias, hongos, plantas y animales, desempeñando diversos procesos biológicos como completar la hidrólisis de polisacáridos,

convirtiendo a los oligosacáridos (intermediarios de la hidrólisis) en monosacáridos, catabolismo de glucoconjugados lisosomales, procesamiento de glucoproteínas y biosíntesis de oligosacáridos a glucoproteínas o glucolípidos. Sin estos procesos no sería posible tener nutrientes, fitohormonas, mecanismos de defensa, formación y degradación de los componentes estructurales [1–3].

El interés en las  $\beta$ -glucosidasas ha ido en incremento debido a sus aplicaciones biotecnológicas e industriales, de las cuales se pueden destacar su uso en la producción de compuestos aromáticos en vinos, tés y jugos, conversión de biomasa a biocombustibles, obtención de fragancias de las flores, bioindicador de los suelos, etc. [1,5–7].

Los sustratos cromogénicos son los más utilizados para evaluar la actividad enzimática ya que sus productos dan un color distinto al del material inicial y se puede cuantificar fácilmente por métodos espectrofotométricos, por ejemplo, para los ensayos con hidrolasas es común el uso de los derivados del p-nitrofenil, incoloro, dando como producto el p-nitrofenol, de color amarillo [29,30].

## **2.2. Microfluídica**

La microfluídica estudia a los líquidos o gases confinados en volúmenes pequeños (con escalas micrométricas). Aun cuando los microfluidos se presentan en diversos sistemas naturales, las primeras investigaciones en microfluídica datan de los años 70's y fue hasta inicios de los 90's cuando se potenció su desarrollo a través de la idea de los sistemas de microanálisis total (micrototal analysis systems,  $\mu$ TAS), también conocidos como dispositivos Lab-On-Chip (dispositivos LOC) [11,31–33].

Idealmente, en los dispositivos LOC se llevan a cabo diversas operaciones unitarias de manera coordinada como son el bombeo, mezclado, medición y control de fluidos, así como la concentración, separación y detección de los analitos, etc. [10,34,35]. Comparados con las técnicas convencionales a gran escala o no fluídicas, los dispositivos LOC ofrecen ventajas como: volumen de muestras y reactivos menores, en consecuencia menor generación de residuos y mayor seguridad en el manejo de sustancias peligrosas; portabilidad, útil cuando se hacen

pruebas de campo; mayor velocidad de transferencia de masa y calor, dando menores tiempos de reacción; integración de diferentes operaciones en un solo dispositivo; capacidad de realizar análisis en paralelo [32,33].

### 2.2.1. Física de los microfluidos

El comportamiento de los líquidos es diferente a microescala y macroescala, en la primera los fenómenos superficiales van adquiriendo dominio sobre los fenómenos debidos al volumen. Dichos fenómenos son el flujo laminar, difusión, resistencia fluidica, relación del área superficial-volumen, y tensión superficial [9,10]. Para estudiar estos fenómenos en un sistema específico, se han propuesto números adimensionales como el número de Reynolds. [32].

#### 2.2.1.1. Número de Reynolds

El número de Reynolds ( $Re$ ) es la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas, es adimensional y describe el régimen de un fluido, ya sea laminar o turbulento [32]. El flujo laminar da la apariencia de capas o láminas en el fluido, el flujo turbulento es caótico e impredecible, la figura 2.7 ejemplifica ambos tipos de flujo, además del flujo transicional.

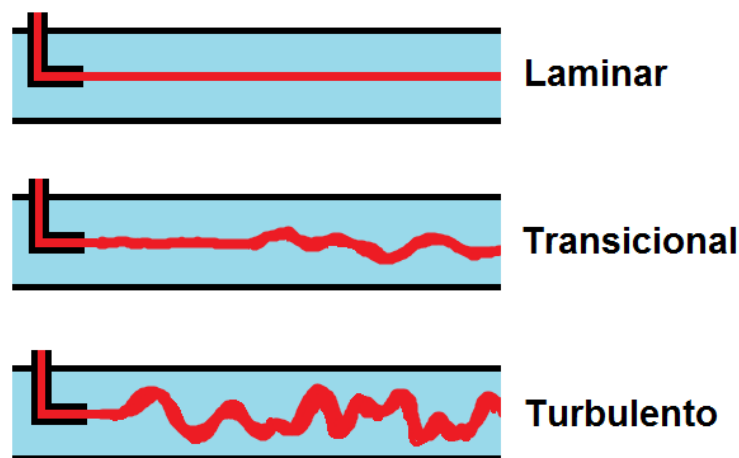


Figura 2.7. Experimento de Reynolds, se basa en hacer pasar agua u otro fluido a través de un tubo transparente, en la parte central de la tubería se libera un colorante. Para el caso de flujo laminar el colorante sigue un recorrido en línea recta, en el flujo turbulento el recorrido del colorante no es definido, impredecible. En el flujo transicional se observa un comportamiento intermedio [36].

El número de Reynolds se obtiene matemáticamente mediante la ecuación:

$$Re = \frac{\rho VD}{\mu} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Re: número de Reynolds

$\rho$ : densidad del fluido

V: velocidad del fluido

D: diámetro de la tubería

$\mu$ : es la viscosidad del fluido

Re < 2300 indica flujo laminar y Re > 4000 flujo turbulento. En los microfluidos regularmente se observa flujo laminar, con Re del orden de 1 o menor [33,37,38].

### **2.2.2. Mezclado de microfluidos**

Para ciertas aplicaciones es primordial el mezclado rápido de los microfluidos, como en los análisis bioquímicos, liberación de fármacos, síntesis química, etc. En procesos biológicos, específicamente las reacciones enzimáticas, se requiere el mezclado rápido de los reactivos para iniciar la reacción [39,40]. Debido a que en los microcanales predomina el flujo laminar, ausencia de turbulencia, la difusión de las moléculas es el único factor involucrado en el mezclado, sin embargo, este proceso se puede acelerar de manera activa o pasiva. Para el mezclado activo se debe aplicar fuerza externa al sistema pero su fabricación e integración a él puede ser difícil y costosa, algunas técnicas de mezclado activo son ultrasonido, vibraciones acústicas inducidas, por acción magneto-hidrodinámica, pequeños impulsores, microválvulas, etc. [40,41]. Por su parte, los mezcladores pasivos pueden constar de obstáculos dentro del microcanal, deflectores en las paredes, diseños en forma de serpentin o zigzag, configuraciones T y Y o diseños en tres dimensiones, etc. [41]. Existen fuerzas inerciales y centrifugas cuando los líquidos fluyen a través de serpentines o canales curvos, y esto acelera el mezclado a través del flujo transversal [42].

### **2.3. Métodos de fabricación de microchips**

Existen diversos métodos para la fabricación de microchips como el grabado húmedo, grabado con iones reactivos, micromecanizado, fotolitografía, litografía suave, estampado en caliente, moldeo por inyección, ablación láser, construcción “in situ” y el grabado en plasma. La elección del método de fabricación depende del material deseado para el microchip, la tecnología y el equipamiento disponible, costo, rapidez, etc. [33,43,44]. Solo se describirán los métodos de fotolitografía y litografía suave, debido a que son los que se utilizaron en la presente investigación.

#### **2.3.1. Fotolitografía**

La fotolitografía consiste en transferir un patrón a una superficie por medio de la exposición a la radiación UV de una resina fotosensible (pre-polímero), depositada en dicha superficie [32].

Un método general para fabricar un micromolde por fotolitografía consiste en cubrir la oblea con una fina película de fotoresina, por medio de un recubridor por rotación conocido por su nombre en inglés como “spin-coater”, posteriormente, se calienta la oblea durante cierto tiempo (horneado suave), se deja enfriar, se coloca una máscara sobre la fotoresina y se expone a radiación UV, en seguida, se vuelve a calentar (horneado post-exposición), se permite el enfriamiento de la oblea, y se revelan los microcanales, sumergiendo la oblea en un disolvente [45].

La superficie es regularmente una oblea de silicio, aunque también puede ser de vidrio, metales, etc. Las fotoresinas se clasifican en positivas y negativas, dependiendo del efecto de la radiación en ellas, en las de tipo positivo la reacción fotoquímica provoca que la resina se debilite y sea retirada con facilidad con algún disolvente, para las de tipo negativo la radiación fortalece al polímero y se remueve la fotoresina que no fue expuesta. Las fotoresinas se componen de un pre-polímero, un disolvente y, en algunos casos, puede contener un sensibilizador. El pre-polímero cambia su estructura cuando se expone a la radiación, el disolvente permite la aplicación y formación de una capa sobre la oblea (se debe evaporar previo a la exposición a la radiación por medio de calentamiento, horneado suave),

el sensibilizador controla la reacción fotoquímica en la fase polimérica [46]. El diseño deseado se obtiene colocando una máscara o retícula entre la fuente de luz y la superficie con la resina fotosensible, donde los microcanales son traslúcidos y lo demás opaco, o viceversa, las máscaras se deben imprimir en alta resolución. La fotoresina que se utilizó en el presente trabajo fue la SU-8, es de tipo negativa, cada estructura del pre-polímero está formado por cuatro unidades de diglicil éter de bisfenol-A (DGEBA), que contiene grupos epóxido en los extremos, y reaccionan entre ellos en presencia de radiación UV para formar un polímero muy estable [47,48]. En la figura 2.8 se presenta la estructura del pre-polímero de SU-8.

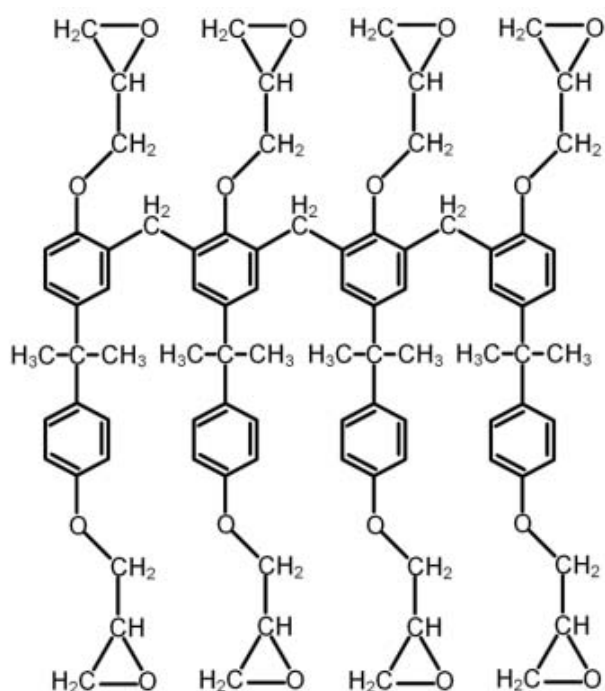


Figura 2.8. Estructura del pre-polímero de SU-8. Está conformado de cuatro subunidades de diglicil éter de bisfenol-A, figura tomada de [48].

En la figura 2.9 se ejemplifica de manera resumida el proceso de fotolitografía con ambos tipos de fotoresinas.



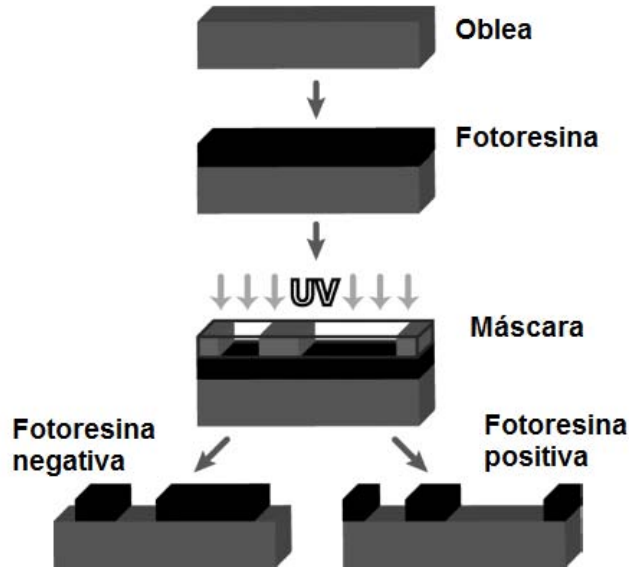


Figura 2.9. Proceso de fotolitografía con resina positiva y negativa. Se forma una capa de fotoresina (positiva o negativa) sobre una oblea, se coloca la máscara y se expone a la radiación UV, para el caso de la fotoresina negativa se remueve la parte no expuesta, y en la positiva se retira la que se expuso. Figura tomada de [32].

### 2.3.2. Litografía suave

La litografía suave representa a un conjunto de técnicas que utilizan un elastómero como molde, sello o máscara para generar microestructuras, entre las que se pueden destacar la impresión por micro-contacto (micro-contact printing,  $\mu$ CP), moldeo por micro-transferencia (micro-transfer molding,  $\mu$ TM), micro-moldeo en capilares (micro-molding in capillaries, MIMIC), y moldeo por micro-réplica (micro-replica molding,  $\mu$ RM), siendo el último el que más se utiliza [49,50].

El moldeo de micro-réplicas consiste en adicionar un pre-polímero (líquido) sobre un patrón, que al polimerizarse toma la forma de este último, la figura 2.10 muestra el método general de moldeo por micro-réplica. Regularmente se utilizan los micromoldes que se fabrican por fotolitografía. Es fundamental eliminar las burbujas en el pre-polímero, la polimerización se puede acelerar con temperatura de 40-70 °C, dependiendo del material [49,51,52]. Una gran ventaja de este proceso es que una vez que se tiene el micromolde se pueden hacer muchas réplicas del microchip [53].

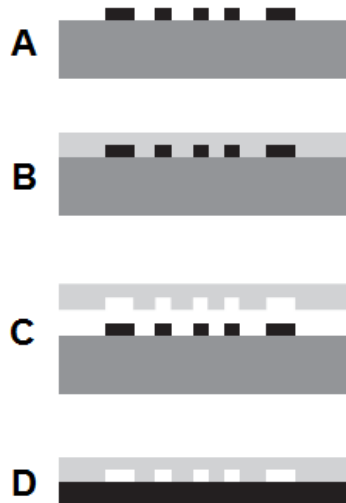


Figura 2.10. Proceso de moldeo por micro-réplica, donde: A) se tiene un micromolde; B) se cubre el micromolde con el pre-polímero; C) se separa el micromolde del bloque de polímero con las microestructuras grabadas; D) se une el bloque de polímero con una superficie plana para formar el microdispositivo. Figura tomada de [52].

### 2.3.3. Materiales para fabricación de microchips

Los materiales que se pueden utilizar en la fabricación de microchips son vidrio, silicio, papel, metales y polímeros como PDMS, poli (metacrilato de metilo), policarbonato, poliestireno, etc. Al momento de elegir un material para la fabricación de microchips se deben considerar diferentes criterios, dependiendo de la aplicación deseada, a continuación se mencionan algunos [32]:

- Protocolo de fabricación: disponibilidad y precio
- Propiedades ópticas
- Propiedades eléctricas
- Propiedades mecánicas
- Conductividad y estabilidad térmica
- Propiedades químicas
- Toxicidad y biocompatibilidad

#### 2.3.3.1. Poli (dimetil siloxano)

El PDMS es uno de los materiales más populares para la fabricación de microchips debido a que son flexibles, ópticamente transparentes de 300-2200 nm (compatible

con detectores ópticos), fáciles y rápidos de producir, además de económicos, estas últimas características son una clara ventaja sobre otros materiales cuando se realizan prototipos, ya que se deben evaluar gran variedad de diseños. Son compatibles con agua y la mayoría de solventes orgánicos polares, y se recomiendan para ensayos biológicos debido a que son casi impermeables al agua, no citotóxicos y permeables a gases [9,50,54,55]. Algunas propiedades fisicoquímicas del PDMS se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas del PDMS [55].

Propiedad	Característica
Densidad	Alrededor de 0.9 Kg/m <sup>3</sup>
Óptica	Transparente de 300 – 2200 nm
Eléctrica	Aislante
Mecánica	Elastomérica
Térmica	Aislante, conductividad térmica 0.2 W/m/K
Interfacial	Baja energía superficial (20 mN/m)
Permeabilidad	Permeable a gases, solventes apolares orgánicos, casi impermeable al agua.
Reactividad	Inerte, oxidable por plasma
Toxicidad	No tóxico

El PDMS pertenece a la familia de los polímeros, su fórmula es  $(-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}-)$ , la semi-estructura se muestra en la figura 2.11 [55].

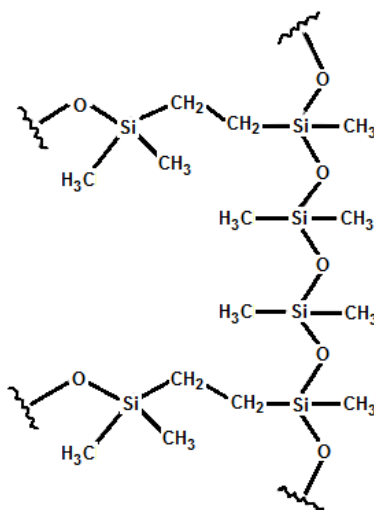


Figura 2.11. Semi-estructura del PDMS, tomada de [55].

En algunas aplicaciones la permeabilidad a gases es deseable en el PDMS, sin embargo, después de un largo tiempo de uso del microchip se incrementa la formación de burbujas, lo cual puede resultar molesto y contraproducente. Otra desventaja es que este material adsorbe moléculas hidrofóbicas afectando su calidad y resultados de experimentos, además no es estable con la mayoría de los solventes orgánicos y se hincha [55].

## **2.4. Inmovilización de enzimas**

Las enzimas en solución no son estables y durante su almacenamiento su actividad disminuye gradualmente, en cambio, los reactores con enzima inmovilizada son considerablemente más estables y catalíticamente activos durante más tiempo, esto permite su reutilización durante varios ciclos. La principal ventaja de la inmovilización radica en retener las enzimas en el reactor [56,57].

Existen varias técnicas de inmovilización de enzimas que se pueden clasificar de acuerdo al mecanismo de fijación, de las que se pueden destacar la adsorción, copolimerización, unión covalente, atrapamiento y encapsulamiento [57,58]. Ninguna de estas técnicas es universal, ya que la compatibilidad dependerá de la enzima en cuestión, del material del soporte, del proceso de inmovilización, de la aplicación deseada, etc. [57,59]. La forma en la que se fijan las proteínas en un soporte determinará si pierden o disminuyen su actividad debido a la orientación aleatoria o deformación de su estructura, lo ideal sería la unión de proteínas a superficies sin afectar su conformación y función [59].

### **2.4.1. Inmovilización covalente**

La inmovilización covalente es irreversible y se lleva a cabo por medio de la reacción de los grupos funcionales de las cadenas laterales de una proteína (grupos amino, carboxilo, anillo fenólico, tiol, hidroxilo, imidazol e indol) y los de un soporte, generado por un tratamiento químico [56,59]. La inmovilización puede provocar cambios en la actividad enzimática, pH óptimo, temperatura óptima y afinidad con el sustrato, además incrementa la estabilidad térmica de la enzima debido a que el soporte le da rigidez [56].

## 2.4.2. Inmovilización de enzimas en poli (dimetil siloxano)

La superficie del PDMS, en su estado natural, es hidrofóbica y no es adecuada para la inmovilización de biomoléculas, sin embargo, puede cambiar a hidrofílica con plasma de oxígeno o un tratamiento químico ácido-base, formando grupos silanol (estabilidad menor a 1 hora), los cuales pueden reaccionar con alcoxi- o cloro-silanos, por ejemplo el 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) [60–63]. La unión covalente entre una proteína con un soporte de PDMS modificado con APTES se realiza vía glutaraldehído (GA), esto debido a la reacción entre el grupo carbonilo del GA y los grupos amino de la enzima [61,64–66]. En la figura 2.12 se ejemplifica la inmovilización de una enzima en PDMS.

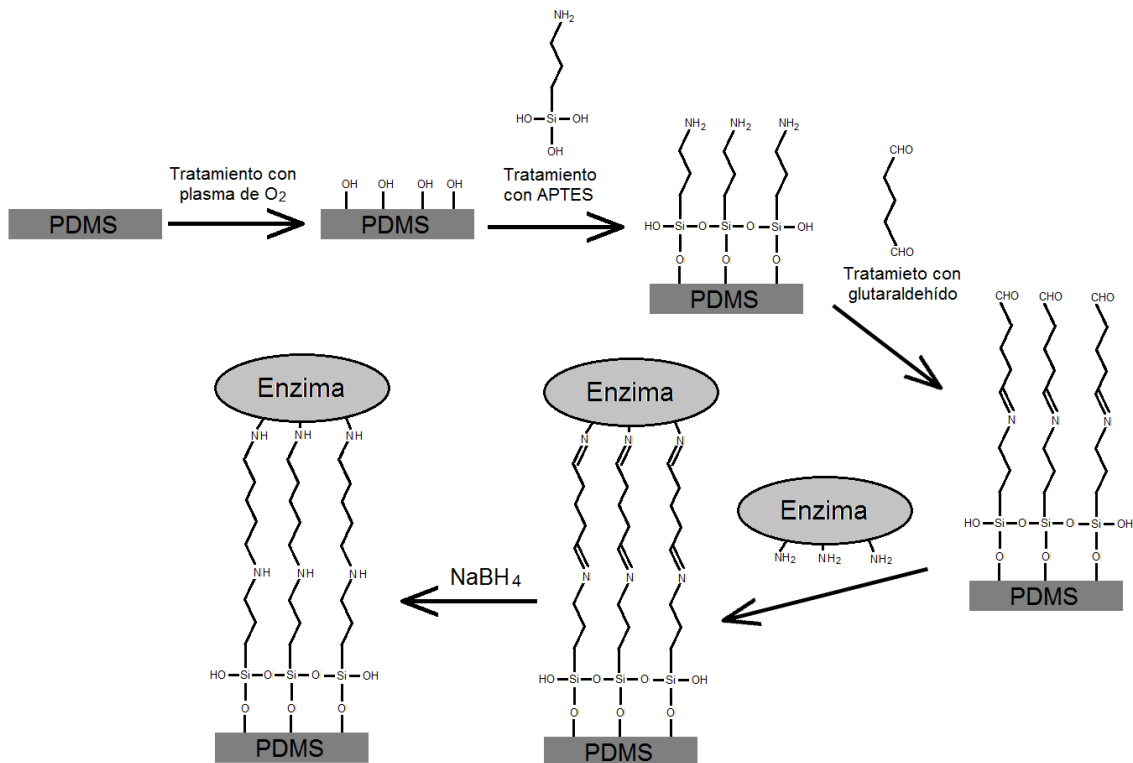


Figura 2.12. Tratamiento del PDMS para inmovilización de enzimas: (a) se aplica plasma de oxígeno al PDMS para formar los grupos silanol en la superficie; (b) tratamiento con APTES; (c) unión del GA a las terminales amino; (d) adición de la enzima, reacción entre grupos funcionales amino de la enzima con carbonilos del soporte tratado; (e) reducción de los grupos imina con borohidruro de sodio,  $\text{NaBH}_4$ . Figura modificada de [67].

## 2.5. Métodos de detección

Los detectores identifican y cuantifican al analito por diferentes métodos, de manera general consisten de transductores que reciben las señales físicas de la materia y las transforman en señales eléctricas para su análisis [34].

En microfluídica se utilizan varios tipos de detectores, los cuales se clasifican de la siguiente manera [34,43]:

- Ópticos (fluorescencia, absorbancia UV-vis, índice de refracción, quimioluminiscencia, electroluminiscencia)
- Electroquímica (amperometría, potenciometría, conductimetría)
- Espectroscopia de masas
- Magnetismo

Para elegir un tipo de detector se deben de considerar las propiedades del analito, selectividad, sensibilidad, compatibilidad y adaptabilidad con el material y diseño del microchip, costo, etc. [49,68,69].

### 2.5.1. Absorbancia UV-vis

La absorción selectiva de la radiación electromagnética de una molécula implica el paso de su estado fundamental de mínima energía a un estado excitado de mayor energía, específicamente, la radiación UV-vis promueve a los electrones de valencia a niveles de energía mayores. La intensidad de la radiación se atenúa debido a la interacción entre ésta y los grupos cromóforos de las moléculas [17,70,71].

La relación logarítmica entre la intensidad de la radiación que incide en una muestra ( $I_0$ ) y la intensidad emergente ( $I$ ), a una longitud de onda específica, se denomina absorbancia ( $A$ ), matemáticamente se expresa como:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

La absorbancia (A) depende de la longitud del paso óptico (L), de la concentración del analito (C), y del coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ ), de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, ecuación 2.5 [70]:

$$A = L \cdot C \cdot \epsilon \quad \text{Ecuación 2.5}$$

La absorbancia UV-vis se usa ampliamente debido a que la mayoría de los analitos absorben la radiación UV-vis. En los estudios a macroescala la longitud del paso óptico es regularmente de un centímetro, sin embargo su uso en microfluídica ha sido limitado debido a que las dimensiones de los microcanales son muy inferiores, la longitud del paso óptico específicamente, reduciendo la sensibilidad considerablemente. Se han ideado métodos para solucionar este problema como el incremento de la longitud del paso óptico (celda en forma de burbuja, celda en forma de U, T y Z, celda de absorción tipo prisma, etc.), medición en múltiples pasos (celda recubierta con espejo, celda de silicio, arreglo de espejos, etc.), etc. [43,72].

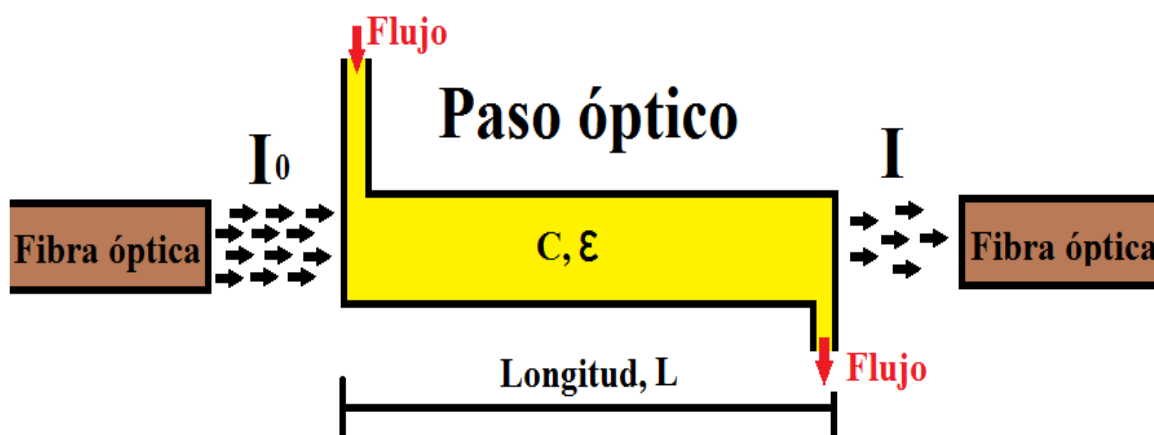


Figura 2.13. Demostración de la Ley de Lambert-Beer en un sistema de detección por absorbancia UV-vis con celda en forma de Z. Al cruzar el paso óptico (longitud L, que contiene una concentración de analito C, con absorptividad molar  $\epsilon$ )  $I_0$  es mayor que I.

### 2.5.2. Detección óptica

Los detectores ópticos tienen un papel importante en la química analítica a macroescala, esto ha generado interés en integrarlos a los dispositivos LOC. Para los

métodos ópticos se debe considerar que el material del microchip sea transparente a la luz (a las longitudes de onda específicas) ya sea para absorbancia, fluorescencia, etc. [73]. El sistema de detección óptica para el presente trabajo se formó con una fuente de luz visible (diodo emisor de luz, light-emitting diode, LED), detector UV-vis, celda de PDMS en forma de Z y fibras ópticas.

Una fibra óptica es una guía de onda hecha de un material dieléctrico, principalmente vidrio, que confina y dirige la energía electromagnética en dirección paralela a su eje por medio de la reflexión total interna, esto se logra debido a que el núcleo de la fibra tiene un índice de refracción mayor al del revestimiento, y si incide con ángulo lo suficientemente grande, entonces la luz se refleja totalmente en la unión del núcleo con el revestimiento, la figura 2.14 muestra la estructura y funcionamiento de la fibra óptica [74–77]. Las fibras ópticas se usan para percibir el efecto de un medio específico de manera intrínseca y extrínseca, figura 2.15. En la primera, el medio produce un efecto en la modulación de la luz en la fibra óptica tal como la intensidad, polarización, etc. En la segunda, una fibra acarrea la luz hacia el medio, donde es modulada, y otra fibra la lleva a un detector [76]. La figura 2.16 describe el modo de funcionamiento de un espectrómetro (Ocean Optics USB-4000).

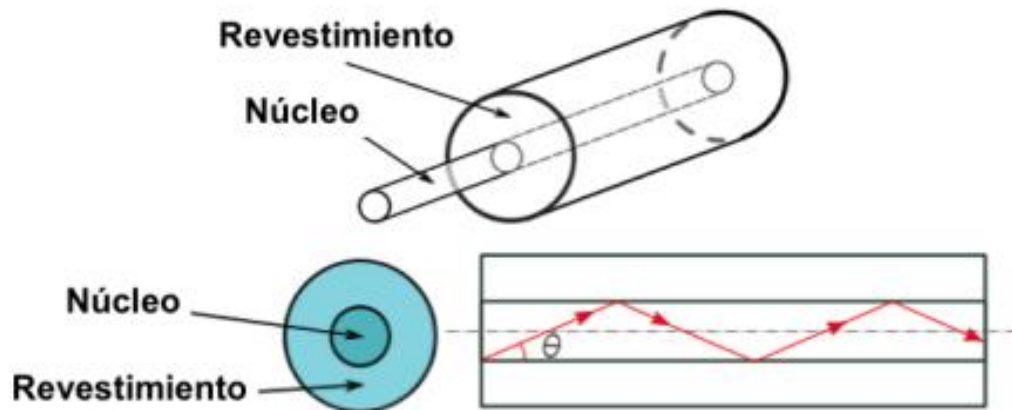


Figura 2.14. Estructura y funcionamiento de una fibra óptica. La energía electromagnética (flechas de color rojo) ingresa al núcleo de la fibra y se refleja totalmente por el revestimiento, debido a que su índice de refracción es menor que el del núcleo, tomado de [77].



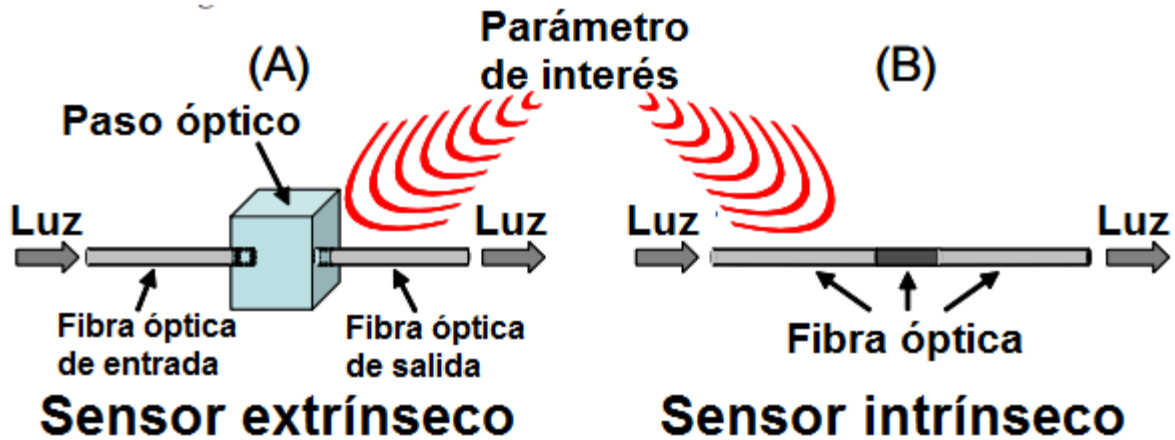


Figura 2.15. Tipos de sensores de fibra óptica: A) El sensor extrínseco o híbrido consiste de fibras ópticas de entrada y salida, hacia y desde un paso óptico (cavidad de medición), donde se modula la intensidad de la luz debido al parámetro de interés; B) En el sensor intrínseco la capacidad de confinar la luz en la fibra depende del medio circundante, ilustración adaptada de [78].

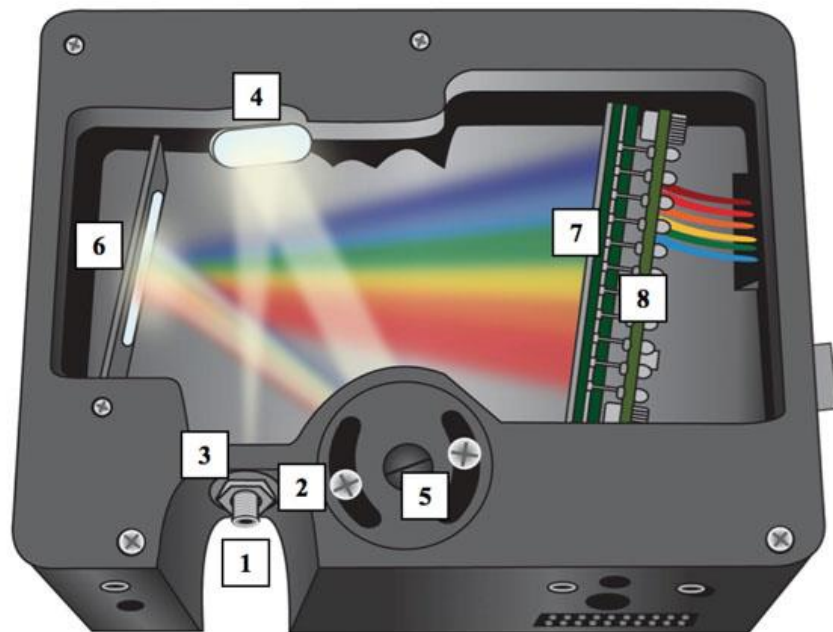


Figura 2.16. Funcionamiento del espectrómetro (Ocean Optics USB4000). Por medio de una fibra óptica, la luz ingresa al espectrómetro por la entrada (1). La cantidad de luz que entra se ajusta con el regulador (2) y el filtro (3) restringe el rango de longitud de onda. La luz filtrada se encuentra con el espejo colimador (4) y la enfoca a una rejilla de difracción (5). Como un prisma, esta rejilla dispersa las diferentes longitudes de onda a un espejo focalizador (6) que direcciona la luz vía lentes colectores (7) al detector (8). El detector convierte la señal óptica a un formato digital, figura y texto tomados de [79].

### **3. Hipótesis**

Será posible llevar a cabo la reacción enzimática entre la  $\beta$ -glucosidasa y el p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido y evaluar su actividad dentro de un dispositivo Lab-On-Chip de poli (dimetil siloxano) por medio de la cuantificación espectrofotométrica del p-nitrofenol.

### **4. Objetivos**

#### **General**

Evaluar la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en un dispositivo Lab-On-Chip.

#### **Específicos**

- Diseñar un dispositivo LOC para evaluar la actividad de la enzima  $\beta$ -glu libre utilizando PNPG como sustrato.
- Optimizar las condiciones para la cuantificación por espectrofotometría del p-nitrofenol (PN) como producto de reacción de la enzima  $\beta$ -glu en un dispositivo LOC.
- Validar el método para cuantificar PN en un dispositivo LOC.
- Estudiar la inmovilización de la enzima  $\beta$ -glu en el soporte de PDMS del dispositivo LOC.
- Optimizar temperatura, pH y fuerza iónica de la solución de fosfatos (SF) para evaluar la actividad enzimática de la enzima  $\beta$ -glu, libre e inmovilizada, en los dispositivos LOC.

## 5. Metodología

### 5.1. Equipos, instrumentos, reactivos y programas computacionales.

Las tablas 1, 2 y 3 muestran los equipos e instrumentos, reactivos y programas computacionales, respectivamente, que fueron utilizados en el presente trabajo.

Tabla 5.1. Equipos e instrumentos utilizados en la fabricación de microchips y evaluación de la actividad enzimática de la enzima  $\beta$ -glu en dispositivos LOC.

Equipo o instrumento	Marca	Modelo
Balanza analítica	Ohaus	E12140
Balanza	Scout Ohaus	SC2020
Bomba de jeringa	New Era Pump Systems	NE-300
Detector UV-vis	Ocean Optics	USB4000
Jeringa de vidrio 5 mL	Hamilton	59000-45
Parrilla de calentamiento	Cimarec	sp46925
Lámpara LED	AG Electronica	LED-UV-1W-405-410NM
Horno	Heating Incubator Prolab	DHP-9032
“Spin-coater”	Laurell Technologies	WS-650MZ-23NPPB
Generador de plasma	Electro-Technic Products	BD-20AC
Cámara	Phantom	Miro M110 Mono
Fibra óptica 200 $\mu$ m	Ocean Optics	FIBER-200-UV
Tubería PTFE, poli (tetrafluoruro de etilo) diámetro interno de 0.22 pulgadas	Cole Parmer	06417-21
Microscopio óptico	Steindorff	877.877.7274
Microscopio óptico	LEICA	DMI3000B
Cámara phantom	AMETEK	Phantom MIRO M110
Microscopio digital	Aven	Mighty Scope-1.3MP
Baño ultrasónico	Branson	2510R-MT
Potenciómetro	OAKTON	105762
Lámpara mercurio de 365 nm	SYLVANIA	H4465-100M
Lámpara de halógeno	OSRAM	64225, 10 W, 6 V
Termómetro	Branam	-20 a 110 °C
Micropipeta	BIOHIT	PROLINE 100-1000 $\mu$ L
Micropipeta	Brand	Transferpette 20-200 $\mu$ L

Tabla 5.2. Reactivos utilizados en la fabricación de microchips y evaluación de la actividad enzimática de la enzima  $\beta$ -glu en dispositivos LOC.

Reactivo	CAS	Marca	Pureza
Resina SU-8	-	Microchem	-
Kit silicon elastómero	-	Sylard 184	-
Propilenglicol monometil éter acetato	108-65-6	Sigma-Aldrich	99.5 %
2-propanol	67-63-0	J. T. Baker	99.8 %
Fosfato de potasio monobásico	7778-77-0	Sigma-Aldrich	99 %
Ácido cítrico	77-92-9	J. T. Baker	99 %
Cloruro de amonio	12125-02-9	J. T. Baker	99.98 %
Ácido clorhídrico	7647-01-0	J. T. Baker	36.8 %
Hidróxido de sodio	1310-73-2	Fermont	98 %
Hidróxido de amonio	1336-21-6	J. T. Baker	29.1 %
Ácido bórico	10043-35-3	Vetec	99.5 %
$\beta$ -glucosidasa, de almendras	9001-22-3	Sigma-Aldrich	> 2 unidades/mg de sólido
p-nitrofenil $\beta$ -D-glucopiranosido	2492-87-7	Sigma-Aldrich	98 %
p-nitrofenol	100-02-7	Sigma-Aldrich	99 %
(3-aminopropil) trietoxisilano	919-30-2	Sigma-Aldrich	99 %
Glutaraldehído	111-30-8	Sigma-Aldrich	25 %
Borohidruro de sodio	16940-66-2	J. T. Baker	98 %
D-glucosa	50-99-7	J. T. Baker	-

Tabla 5.3. Programas computacionales utilizados en la fabricación de microchips y evaluación de la actividad enzimática de la enzima  $\beta$ -glu en dispositivos LOC.

Programa	Versión
Adode Illustrator	CS6
Spectrasuite	6.1
Statgraphics Centurion XVI	16.1.18
Microsoft office	2013
Sigmaplot	12.3

## 5.2. Diseño de microchips

El diseño de los microchips se hizo a través del programa Adobe Illustrator CS6, dentro de una circunferencia de 6.5 cm de diámetro (1 cm menor que el diámetro de la oblea circular de silicio). Los diseños se imprimieron en negativos de acetato en la empresa Gráficos Digitales Denver. Cada diseño se identificó con el código FMHM-DDMMAA, donde: la primera parte, FMHM, fueron las iniciales de Francisco Miguel Hernández Maya; la segunda parte fueron DD (día), MM (mes) y AA (año, últimos dos dígitos).

Los microchips que fueron evaluados en esta investigación, presentados en el anexo A, tuvieron una configuración básica del diseño FMHM-250615 (diseño final), figura 5.1.

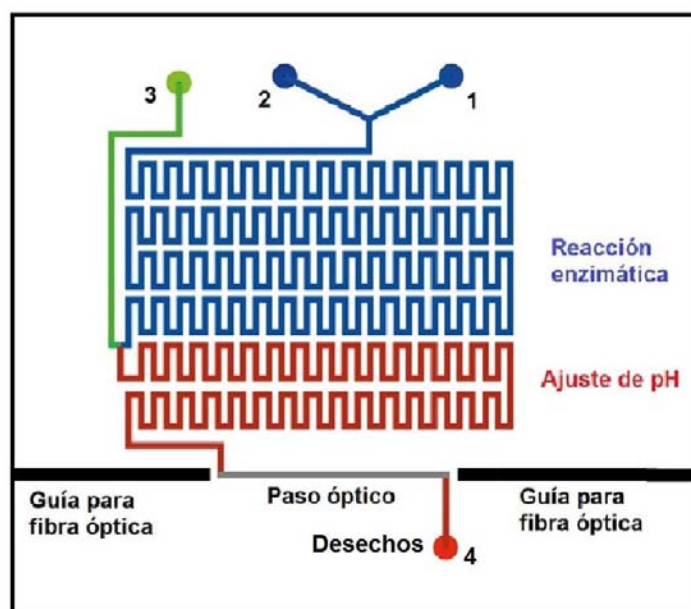


Figura 5.1. Diseño de microchip FMHM-250615 para la evaluación de la actividad de la  $\beta$ -glu. Se observan 4 orificios de 0.75 mm de diámetro, donde: 1) orificio para inyectar el p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopranósido o p-nitrofenol; 2) orificio para adición de solución  $\beta$ -glucosidasa en solución de fosfatos pH 4 o únicamente la solución de fosfatos (para el caso de la enzima inmovilizada); 3) orificio para solución amortiguadora de amoníaco pH 10; 4) salida de desechos. Presentó tres secciones: color azul, serpentina para la reacción enzimática; color rojo, serpentina para el ajuste de pH para cuantificar el p-nitrofenol; color gris, paso óptico de 0.7 cm de longitud, donde se detectó el p-nitrofenol en su forma aniónica. Para realizar la detección "in situ" se colocaron dos guías para insertar las fibras ópticas (200  $\mu$ m de diámetro) en los extremos del paso óptico.

### 5.3. Fabricación de micromoldes

Los micromoldes se elaboraron por medio de la técnica de fotolitografía, la cual se describe a continuación (procedimiento ilustrado en la figura 5.2) [45]:

1. Se colocó la oblea de silicio en el “spin-coater”, y se aplicó el ciclo 1, tabla 5.4, durante los primeros 5 segundos del ciclo se lavó a chorro con 2-propanol. Este primer paso fue con la finalidad de limpiar la superficie de la oblea.

Tabla 5.4. Ciclo 1 del “spin-coater” para el lavado de la oblea y creación de la película de resina de 100  $\mu\text{m}$  de altura.

Paso	Tiempo / s	Velocidad / rpm	Aceleración / (rpm / s)
1	10	500	100
2	40	550	300

2. Se calentó la oblea en una parrilla a 210 °C durante 5 minutos.
3. Se transfirió a un horno a 70 °C durante 10 minutos, posteriormente, se permitió que llegara a temperatura ambiente.
4. Nuevamente se colocó la oblea en el “spin-coater”, se adicionaron 3 mL de resina SU-8 2025 en el centro de la oblea, cuidando que no se formaran burbujas.
5. Se aplicó el ciclo 1, tabla 5.4. Con esta operación se formó una capa de resina de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de altura.
6. La oblea se calentó en la parrilla a 75 °C durante 5 minutos, inmediatamente después se transfirió a otra parrilla a 105 °C y se dejó durante 20 minutos, para evaporar los solventes de la resina, esta etapa se llama horneado suave.
7. Se colocó la máscara de acetato y se expuso a la luz de una lámpara UV durante 45 segundos a 30 cm de distancia; pasado el tiempo se retiró la máscara de acetato, dicha máscara tenía los microcanales transparentes y permitió el paso de la luz UV para polimerizar la resina.
8. Se retiró la máscara de acetato y se calentó la oblea en la parrilla a 75 °C durante 5 minutos, inmediatamente después se trasladó a otra parrilla a 105 °C durante 10 minutos. A esta etapa se le conoce como horneado post-exposición y permitió unir la resina polimerizada con la superficie de la oblea de silicio.

9. Se removió la resina no polimerizada, aquella que no estuvo expuesta a la luz UV, sumergiendo la oblea en propilenglicol monometil éter acetato durante 10 minutos y agitando durante 5 segundos cada 2 minutos.
10. Una vez impresos los microcanales, se lavó la oblea con 2-propanol.
11. Se secó en el horno a 70 °C durante 5 minutos.

#### **5.4. Fabricación de microchips**

A partir de los micromoldes fabricados en la sección anterior se elaboraron réplicas del diseño en PDMS, por medio de la técnica de litografía suave como se describe a continuación (procedimiento ilustrado en la figura 5.3) [45]:

1. Se mezclaron el prepolímero y el agente curante (para iniciar la polimerización) en proporción 100:9, hasta aproximadamente 30 g de mezcla.
2. Se colocó la oblea con los microcanales en una caja petri y se adicionó la mezcla sobre la misma, hasta obtener una altura aproximada de 5 mm. Por otra parte se agregó la mezcla en otra caja petri, vacía, hasta tener una altura de 2-4 mm.
3. Las cajas se colocaron en una cámara de vacío hasta que no se observaron burbujas en la mezcla.
4. Las cajas se transfirieron al horno a 70 °C durante 5 horas, como mínimo.
5. Las cajas se retiraron del horno y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente, se cortó el polímero con un bisturí a 5 mm de distancia de los microcanales, como mínimo. Así mismo, de la caja petri que solo tenía polímero se cortó una sección semejante al área de aquel que contenía los microcanales.
6. Se perforaron las entradas y salida de desechos con un horador de 0.75 mm de diámetro.
7. Las láminas de PDMS se limpiaron con cinta adhesiva (cinta mágica Scotch) y se expusieron a plasma de oxígeno (para formar los grupos silanol en la superficie) durante 30 segundos, cada una.
8. Las láminas se alinearon y juntaron los lados que fueron expuestos al plasma de oxígeno, se dejaron reposar por un tiempo mínimo de 30 minutos.
9. Se cortaron los extremos del microchip de tal forma que se pudieran insertar las fibras ópticas.

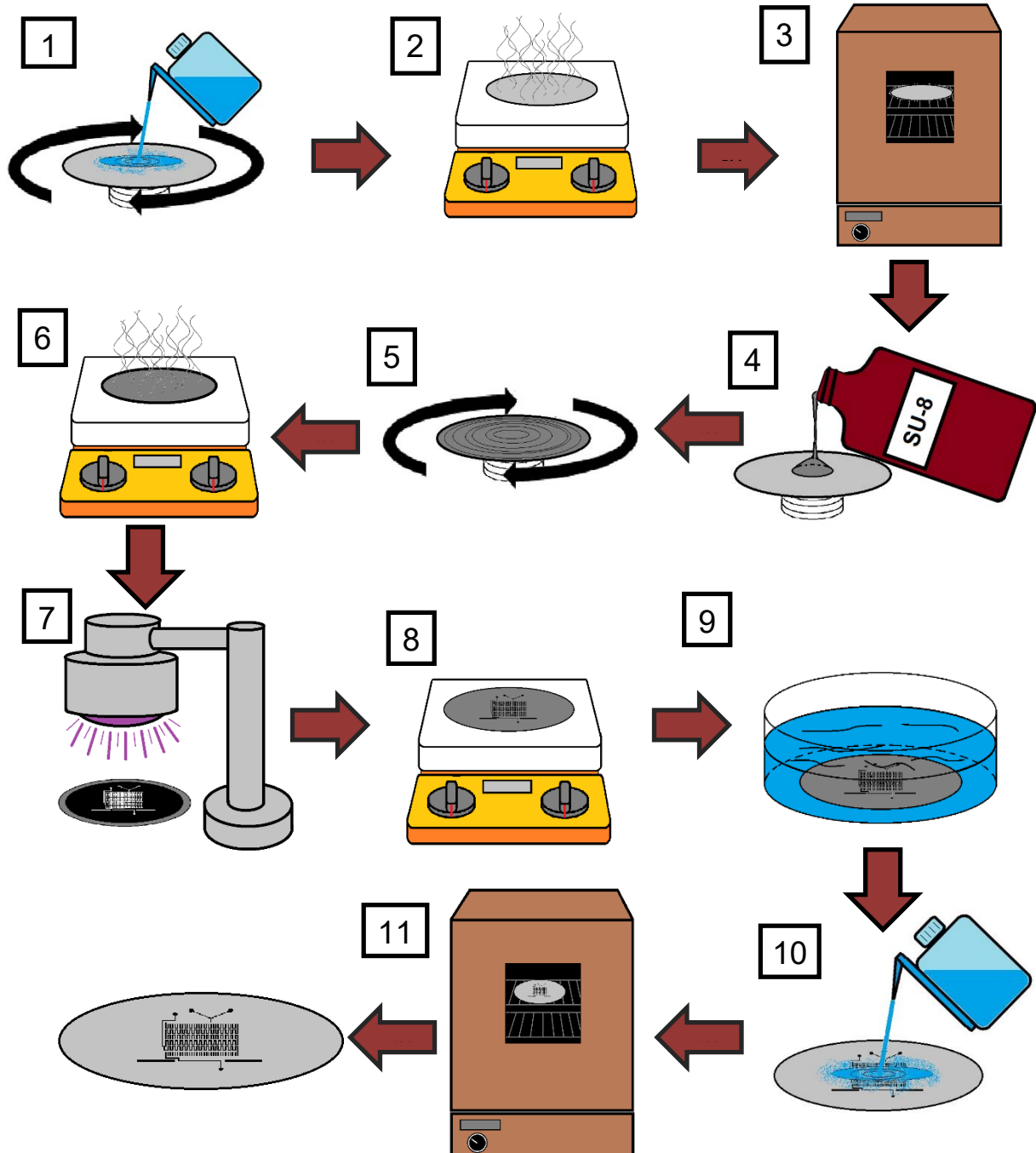


Figura 5.2. Procedimiento ilustrado de fotolitografía para fabricación de los micromoldes: 1) lavado de la oblea en el "spin-coater"; 2) calentamiento en la parrilla ; 3) calentamiento en el horno ; 4) adición de la resina; 5) creación de la película de 100 µm de altura en el "spin-coater"; 6) horneado suave; 7) colocación de la máscara de acetato y exposición a la luz UV; 8) retiro de la máscara de acetato y horneado post-exposición; 9) remoción de la resina no polimerizada; 10) lavado del micromolde; 11) secado del micromolde.



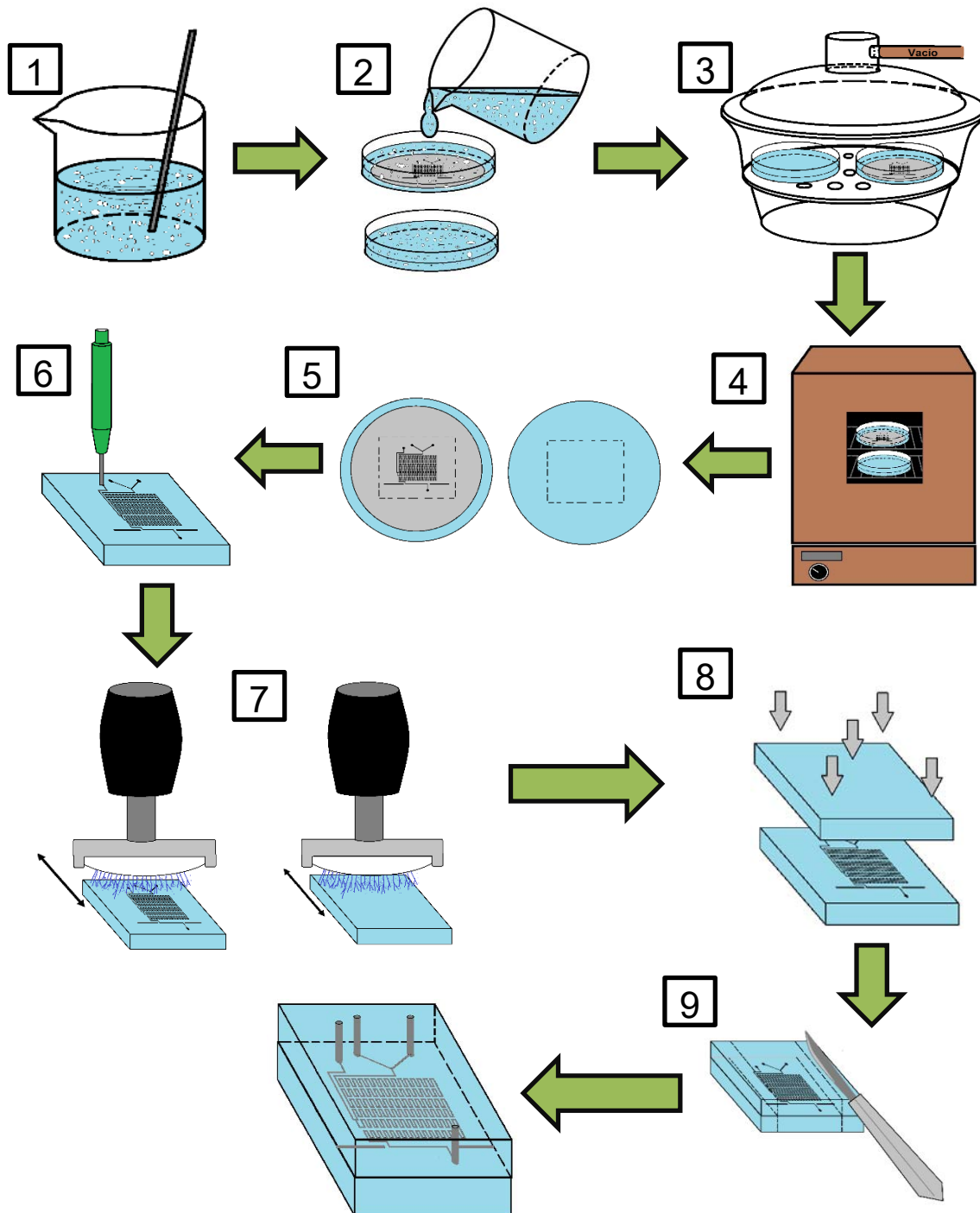


Figura 5.3. Procedimiento ilustrado de la litografía suave para la fabricación de microchips: 1) mezclado del pre-polímero y el agente curante; 2) adición de la mezcla en las cajas petri, vacía y con micromolde; 3) eliminación de burbujas por vacío; 4) aceleración de la polimerización por medio de calentamiento; 5) corte de las láminas de PDMS con un bisturí; 6) horadación para crear las entradas y la salida de desechos; 7) exposición de las láminas al plasma de oxígeno; 8) pegado de las láminas; 9) corte de los excesos del microchip.

### 5.5. Inmovilización de la enzima $\beta$ -glucosidasa en poli (dimetil siloxano)

La inmovilización se llevó a cabo por unión covalente entre el PDMS y la enzima, a través de varias técnicas conjugadas [61,63,80–82], dando como resultado el siguiente procedimiento:

1. 30 minutos después de la exposición de las láminas de PDMS al plasma de oxígeno y pegado de las mismas, se introdujo una solución de APTES al 1% en agua destilada durante 60 minutos a 20  $\mu$ L/min (solución preparada el mismo día que se usó) a través de los microcanales del microchip, en este paso reaccionaron los grupos silanol del PDMS con el silicio de la molécula del APTES.
2. Se lavaron los microcanales con agua destilada por 25 minutos en un baño ultrasónico a un caudal de 20  $\mu$ L/min.
3. Se introdujo una solución de GA al 2.5% en agua destilada durante 60 minutos a un caudal de 20  $\mu$ L/min, en este paso reaccionó el grupo amino terminal del APTES con el grupo carbonilo del GA, formando un grupo imina.
4. Se lavaron de los microcanales con solución de fosfatos (SF), 0.05 M y pH 7.0, durante 20 minutos a un caudal de 20  $\mu$ L/min.
5. Se introdujo una solución de  $\beta$ -glu a una concentración de 1 mg de proteína/mL en SF (0.05 M, pH 7.0) durante 12 horas a un caudal de 2  $\mu$ L/min, posteriormente se lavó con SF (0.05 M, pH 7.0) durante 30 minutos a un caudal de 20  $\mu$ L/min. En esta etapa se inmoviliza la enzima en el microchip por medio de la reacción entre el grupo carbonilo del glutaraldehído con el grupo amino de la enzima, formando grupos imina.
6. Con la finalidad de reducir los grupos imina y dar mayor estabilidad al enlace, se adicionó una solución de NaBH<sub>4</sub> 0.5% en agua destilada durante 40 minutos a un caudal de 20  $\mu$ L/min (solución preparada el mismo día).
7. Se lavó con SF (0.05 M, pH 7.0) durante 30 minutos a un caudal de 20  $\mu$ L/min. Este punto también se aplica al terminar de utilizar el microchip y previo a su almacenamiento.

Nota: Para almacenar el microchip se llenaron los microcanales con SF (0.05 M, pH 7.0) y se refrigeró a 4 °C.

## 5.6. Caracterización de microchips

Para este paso se hizo el corte transversal del microchip para obtener una tira de PDMS, como se muestra en la figura 5.4-A, posteriormente la tira se colocó en un microscopio de tal manera que se observara el área de los microcanales, figura 5.4-B con un objetivo 40X. Se compararon las dimensiones de los microcanales con una escala micrométrica y se calcularon su altura y ancho.

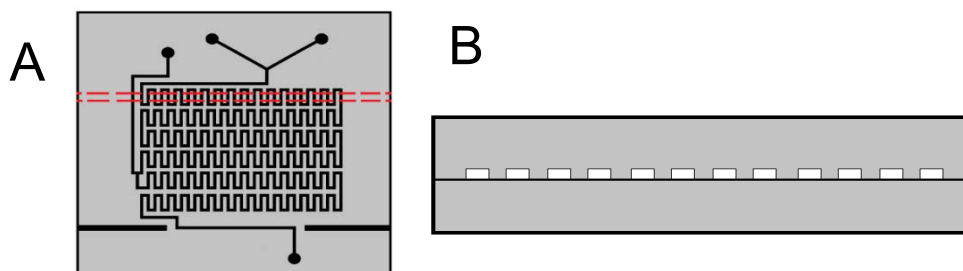


Figura 5.4. (A) corte transversal de microchips, sección entre las líneas discontinuas, (B) ejemplo de observación en el microscopio del corte transversal.

## 5.7. Estudios preliminares

Previo a realizar el estudio con la enzima  $\beta$ -glucosidasa, se armó la configuración evaluando lámparas para emisión de luz, aparatos de calentamiento, bombas de jeringas, etc.

### 5.7.1. Comparativo entre la lámpara de halógeno y la lámpara LED

En el presente trabajo se realizó la cuantificación del analito de interés por medio de espectrofotometría UV-vis, para ella es de gran importancia la fuente de luz, por lo tanto, se compararon dos tipos de lámparas: halógeno y LED. Los criterios para la selección de la fuente más adecuada fueron el ruido y la estabilidad de la lámpara, además de la vida media y el costo.

Para este estudio se utilizó el diseño FMHM-140115, que tiene un paso óptico de 0.7 mm y detección “in situ” por medio de fibras ópticas como se muestra en la figura 5.5.

Para la estimación del ruido se midió la absorbancia a 400 nm para cada lámpara a través de la celda (paso óptico únicamente con aire) durante 10 minutos. Se registró la diferencia de absorbancia pico-pico de mayor valor y se multiplicó por un factor

de 0.7, esta estimación del ruido se hace para espectrofotómetros que no tienen un programa computacional sofisticado que lo calcule exactamente [83].

La estabilidad de las lámparas se evaluó de manera similar a la estimación del ruido, pero esta se llevó a cabo durante 60 minutos, durante este lapso se registraron los valores de absorbancia máximo y se calculó la diferencia entre ellos [83].

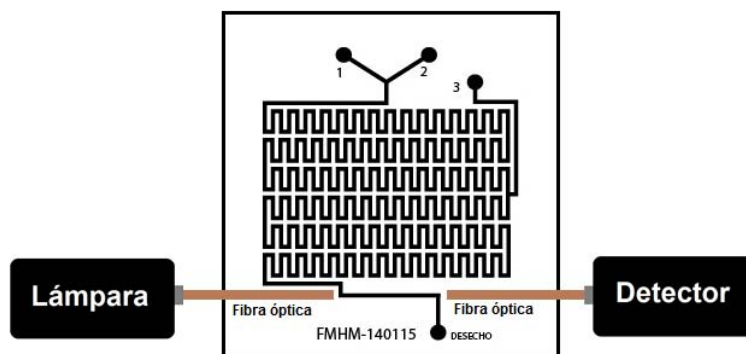


Figura 5.5. Dispositivo para la evaluación de las fuentes de luz insertando las fibras ópticas en las guías del microchip FMHM-140115: una se conecta a la fuente de luz y la otra a un detector.

### 5.7.2. Verificación de bombas de jeringas

En el presente trabajo se utilizaron tres bombas de jeringas, cada una fue verificada volumétricamente, lo cual consistió en tomar el tiempo que tardó en dosificar 1 mL de agua destilada y determinar si existían diferencias estadísticamente significativas [83]. Se evaluó el caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , dado que fue en esa condición a la cual se realizó la validación del método de cuantificación de p-nitrofenol (PN) y la evaluación de la actividad de la  $\beta$ -glu. Para la verificación se utilizaron jeringas de vidrio de 5 mL y un diámetro interno de 10.3 mm. Para determinar si en los microchips se modificaba el caudal, debido a la presión generada por el cambio de diámetro de la tubería a los microcanales, también se realizaron pruebas en ellos utilizando el diseño FMHM-140115. Algunas precauciones durante esta prueba fueron: mantener el agua a temperatura de  $20 \pm 1$  °C; eliminar cualquier burbuja formada durante el llenado de las jeringas y; permitir la estabilización del caudal 30 segundos antes de cada lectura [84,85].

### 5.7.3. Evaluación de los sistemas de calentamiento de los microchips

Se evaluaron tres sistemas de calentamiento de los microchips: 1) calentamiento directo sobre la parrilla; 2) baño de agua y; 3) baño de vapor, figuras 5.6, 5.7 y 5.8, respectivamente. La temperatura de los sistemas fue de aproximadamente 50 °C y se utilizó una parrilla de calentamiento.

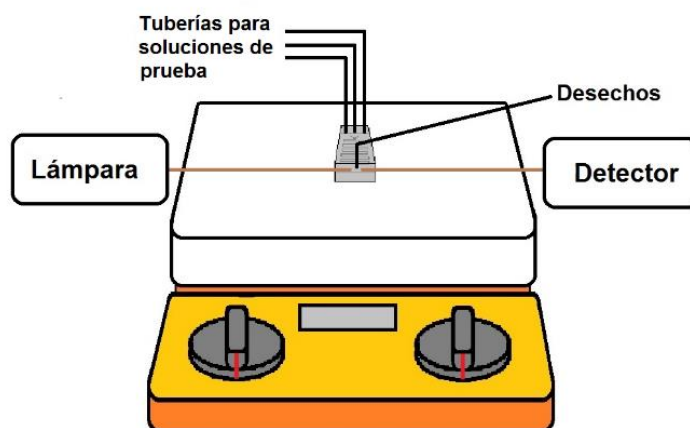


Figura 5.6. Sistema de calentamiento directo. Se colocó el microchip directamente en la parrilla y ésta se configuró a 60 °C para alcanzar aproximadamente 50 °C.

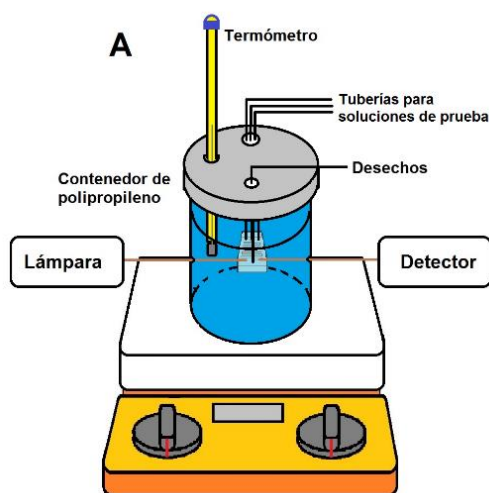


Figura 5.7. Sistema de calentamiento con baño de agua. Se acondicionó un contenedor cilíndrico de polipropileno con tapa (9 cm de diámetro de la base y 8 cm de altura, volumen aproximado de 500 mL) el cual se perforó en los extremos laterales para el paso de las fibras ópticas a 4 cm de altura, en la tapa se hicieron tres orificios para insertar el termómetro y las tuberías. Se colocó el microchip de tal manera que no tocara las paredes del contenedor, se adicionaron 400 mL de agua, cubriendo el microchip y el termómetro. La parrilla se configuró a 75 °C.

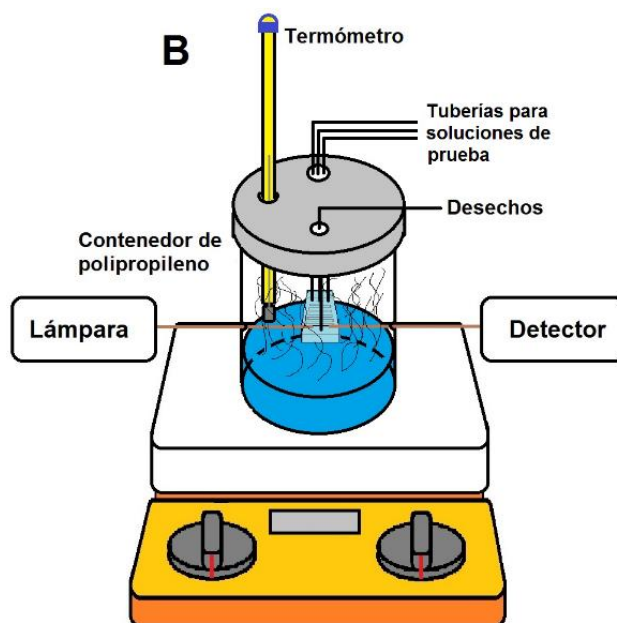


Figura 5.8. Sistema de calentamiento con baño de vapor. Se acondicionó un contenedor cilíndrico de polipropileno con tapa (9 cm de diámetro de la base y 8 cm de altura, volumen aproximado de 500 mL) el cual se perforó en los extremos laterales para el paso de las fibras ópticas a 4 cm de altura, en la tapa se hicieron tres orificios para insertar el termómetro y las tuberías. Se colocó el microchip de tal manera que no tocara las paredes del contenedor, se adicionaron 200 mL de agua, sin sumergir el microchip ni el termómetro. La parrilla se configuró a 95 °C para alcanzar 50 °C en el termómetro.

Para determinar el mejor sistema de calentamiento se observó el comportamiento del mismo durante 5 inyecciones de PN, 15-20 minutos. Las condiciones en el dispositivo LOC se muestran en la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Condiciones en el dispositivo LOC para la evaluación de los sistemas de calentamiento.

Parámetro	Condición
Temperatura	50 °C (aproximadamente)
Caudal para las tres bombas	10 $\mu\text{L}/\text{min}$
Canal 1	Solución de PN 0.2 mM, en agua destilada
Canal 2 y 3	SF 0.05 M pH 10.0
Volumen de inyección, canal 1	1.5 $\mu\text{L}$
Longitud de onda	400 nm
Diseño del microchip	FMHM-140115

#### 5.7.4. Espectro de absorción de las sustancias involucradas en la reacción enzimática

Con la finalidad de identificar interferencias por los reactivos se llevó a cabo el barrido de las sustancias involucradas en la reacción enzimática de la  $\beta$ -glu, en una región de 350-850 nm, utilizando agua destilada como blanco. Las sustancias de estudio fueron: solución de fosfatos (SF) 0.1 M pH 4.0; solución amortiguadora de amoniaco (SA) 0.1 M pH 10.0; p-nitrofenol (PN); p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (PNPG); D-glucosa;  $\beta$ -glu (las últimas 4 sustancias en SF pH 4.0 y SA pH 10.0). Se utilizó el diseño FMHM-140115 y la configuración a temperatura ambiente, figura 5.9. Las soluciones de prueba se agregaron a través del canal 1 y en los canales 2 y 3 se adicionó agua destilada. Se trabajó a temperatura ambiente a un caudal de 10  $\mu$ L/min para las tres bombas en continuo.

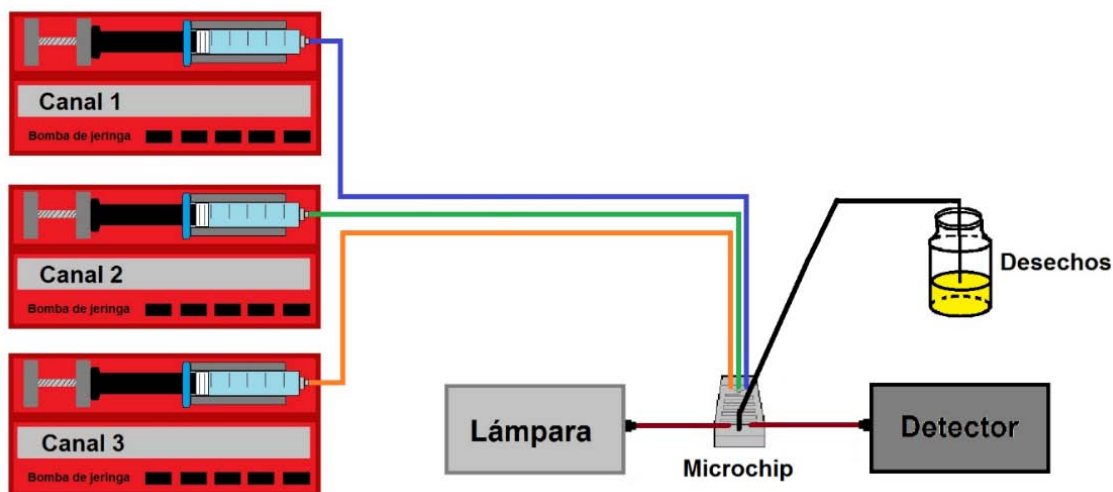


Figura 5.9. Configuración a temperatura ambiente. Se formó de tres bombas de jeringas que alimentaron a tres canales del microchip a través de jeringas de vidrio (volumen de 5 mL y diámetro interno de 10.3 mm) y tubería poli (tetrafluoruro de etileno), o PTFE por sus siglas, con un diámetro interno de 0.22 pulgadas, además de una salida de desechos, en el microchip se insertaron dos fibras ópticas conectadas a una lámpara (LED o de halógeno) por un lado y un detector (UV-visible) en el otro.

#### 5.8. Evaluación de las condiciones de análisis del p-nitrofenol

Para garantizar los resultados de la evaluación de la enzima  $\beta$ -glu, antes fue necesario hacer la cuantificación precisa del PN, ya que es el producto e indicador

del avance de la reacción cuando se utiliza el PNPG como sustrato, para ello se propuso el desarrollo y validación de un método analítico para determinar el PN en un dispositivo LOC, el cual se describe a continuación:

### 5.8.1. Volumen de inyección

La inyección de la solución de PN se realizó a través de una bomba de jeringas, a través del siguiente procedimiento:

1. Se ajustó a cero de volumen dosificado en la pantalla de la bomba de jeringa.
2. Se comenzó la inyección, oprimiendo el botón start.
3. Una vez que la bomba inyectó el volumen deseado, marcado en la pantalla, se detuvo y se registró el volumen inyectado, además de la altura de pico del PN.

Para cada nivel se calcularon la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.), se evaluaron diferentes volúmenes de inyección (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0  $\mu\text{L}$ ), y se determinó el más adecuado. Se utilizó la configuración a temperatura ambiente, figura 5.9, y las condiciones de la tabla 5.7.

Tabla 5.7. Condiciones en el dispositivo LOC para la evaluación del volumen de inyección.

Condición	Valor
Temperatura	20 °C, ambiente
Caudal para las tres bombas	10 $\mu\text{L}/\text{min}$
Canal 1	Solución de PN 0.264 mM, en agua destilada
Canal 2 y 3	SA 0.05 M pH 10.0
Volumen de inyección, canal 1	0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 $\mu\text{L}$
Longitud de onda	400 nm
Diseño del microchip	FMHM-250615

### 5.8.2. Elaboración del diagrama de distribución de especies p-nitrofenol – p-nitrofenolato

Utilizando la configuración a temperatura ambiente (figura 5.9) y el diseño de microchip FMHM-250615, se elaboró el diagrama de distribución de especies: p-nitrofenol – p-nitrofenolato. Para ello, se cuantificó el p-nitrofenolato a diferentes



valores de pH entre 6 y 11. Se prepararon soluciones de PN 0.264 mM en agua destilada y se ajustó el pH dentro del microchip con la solución adecuada.

Para el diagrama experimental, la absorbancia máxima observada en el intervalo de pH de 9-11 (a pH mayor de 9 la absorbancia sería constante, en teoría) se consideró como concentración 0.264 mM, 100 % de conversión de p-nitrofenol a p-nitrofenolato. Tomando como referencia a la absorbancia máxima, se calcularon las concentraciones de p-nitrofenolato por un factor de conversión para cada pH evaluado. Por otra parte, la concentración de p-nitrofenol se obtuvo por diferencia, ecuación 5.4. Las condiciones en el dispositivo LOC para esta prueba se muestran en la tabla 5.8.

Tabla 5.8. Condiciones en el dispositivo LOC para la elaboración del diagrama de distribución de especies.

Condición	Valor
Temperatura	20 °C, ambiente
Caudal para las tres bombas	10 $\mu$ L/min
Canal 1	Solución de PN 0.264 mM, en agua destilada
Canal 2 y 3	SA 0.05 M, pH 6.0-11.0
Volumen de inyección, canal 1	1.5 $\mu$ L
Longitud de onda	400 nm
Diseño del microchip	FMHM-250615

Para los valores teóricos del diagrama se calculó la concentración de p-nitrofenolato en el intervalo de pH 0-14, a través de las siguientes fórmulas [17]:

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = 10^{-\text{pH}} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

$$\alpha_1 = \frac{K_a}{[\text{H}_3\text{O}^+] + K_a} \quad \text{Ecuación 5.2}$$

$$[\text{p-nitrofenolato}] = 0.264 \text{ mM} \cdot \alpha_1 \quad \text{Ecuación 5.3}$$

$$[\text{p-nitrofenol}] = 0.264 \text{ mM} - [\text{p-nitrofenolato}] \quad \text{Ecuación 5.4}$$

Donde:

$\alpha_1$ : es la fracción de la concentración total del p-nitrofenol que se disocia

$K_a$ : es la constante de acidez del p-nitrofenol =  $7.08 \times 10^{-8}$  [86]

### 5.8.3. Evaluación del pH, fuerza iónica y longitud del reactor para la cuantificación del PN

Para esta etapa se diseñó y fabricó el microchip FMHM-050515, figura 5.10, y se utilizó la configuración a temperatura ambiente, figura 5.9. Este microchip se diferencia del diseño básico, en que posee guías para las fibras ópticas a diferentes longitudes de reactores con la finalidad de determinar, experimentalmente, la longitud óptima para ajustar el pH y llevar a cabo la detección del PN. En la optimización también se contemplaron el pH y la fuerza iónica en la SA a pH alcalino. Se propuso un diseño de experimento multifactorial  $3^3$  aleatorizado, los tres factores y sus tres niveles correspondientes se presentan en la tabla 5.9. Los factores cuyos valores se mantuvieron fijos se muestran en la tabla 5.10. Los datos se procesaron con el programa estadístico Statgraphics.

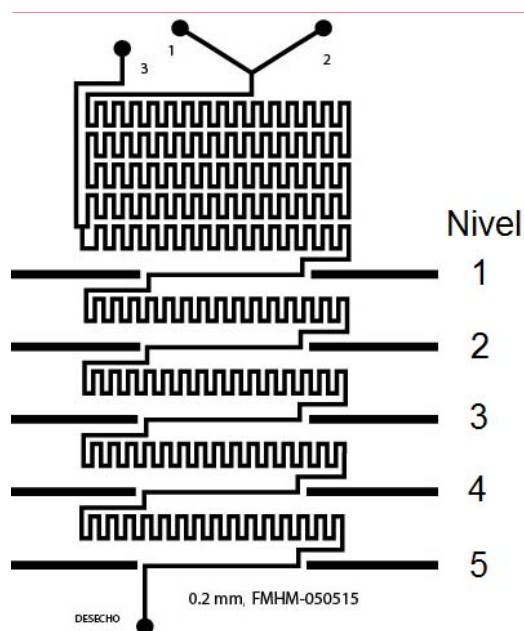


Figura 5.10. Diseño FMHM-050515 para la optimización en la cuantificación de PN. Para medir diferentes longitudes de reactor (4.5, 9.0, 13.5, 18.0 y 22.5 cm) las fibras ópticas fueron colocadas a diferentes distancias.

Tabla 5.9. Factores que se optimizaron en la cuantificación del PN.

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Concentración de amoníaco en la SA, M	0.025	0.05	0.1
pH de la SA para ajuste	9.5	10.0	10.5
Longitud del canal para el ajuste de pH, cm	4.5	9.0	13.5

Tabla 5.10. Condiciones en el dispositivo LOC para la optimización en la cuantificación del PN.

Parámetro	Condición
Temperatura	20 °C (ambiente)
Caudal para las tres bombas	10 $\mu$ L/min
Canal 1	Solución de PN 0.33 mM, en agua destilada
Canal 2	SF 0.05 M pH 4.0
Canal 3	SA, fuerza iónica y pH variable, de acuerdo con el diseño de experimentos
Volumen de inyección, canal 1	1.5 $\mu$ L
Longitud de onda	400 nm
Diseño del microchip	FMHM-050515

Del diseño de experimentos propuesto cabe destacar que: el pH óptimo para la actividad de la enzima  $\beta$ -glu más bajo encontrado en la bibliografía es 4.0 [87], así se definió tal valor para este experimento; la SF (solución a ajustar) se fijó a 0.05 M y se propusieron concentraciones de amoniaco en la SA de 0.025, 0.050 y 0.100 M (valor inferior, igual y superior a la fuerza iónica de la solución a ajustar), por otra parte, solo se evaluaron las longitudes de 4.5, 9.0 y 13.5 cm (nivel 1, 2 y 3) debido a que longitudes más elevadas (nivel 4 y 5) no se observó un incremento significativo de la señal del p-nitrofenol.

#### 5.8.4. Validación del método para la cuantificación del p-nitrofenol

Una vez que se optimizó el sistema para la detección del p-nitrofenol, se prosiguió a hacer la validación del método de cuantificación del mismo con la finalidad de obtener resultados confiables cuando se realizará la evaluación de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, para se utilizó el diseño del microchip FMHM-250615 y la configuración a temperatura ambiente, figura 5.9, con excepción de la robustez de parámetros internos, específicamente la temperatura, donde se adaptó el sistema de calentamiento con baño de vapor, mostrado en la figura 5.8. Dado que para cada etapa de la validación solo una condición fue variable a la vez (por ejemplo, para linealidad solo varía la concentración de PN, para la robustez varía temperatura o fuerza iónica de SF), se propusieron las condiciones en el dispositivo LOC, tabla

5.11, que solo se modificaron cuando así se especificó en cada etapa de la validación.

Tabla 5.11. Condiciones en el dispositivo LOC para la validación del método de cuantificación del PN.

Parámetro	Condición
Temperatura	20 °C (ambiente)
Caudal para las tres bombas	10 $\mu\text{L}/\text{min}$
Canal 1	Solución de PN en agua destilada, 333.5 $\mu\text{M}$
Canal 2	SF 0.01 M pH 4.0
Canal 3	SA 0.01 M pH 10.0
Volumen de inyección, canal 1	1.5 $\mu\text{L}$
Longitud de onda	400 nm
Diseño del microchip	FMHM-250615

#### 5.8.4.1. Linealidad e intervalo de concentración del p-nitrofenol

Para esta etapa se utilizó la configuración de la figura 5.9 y las condiciones de la configuración de la tabla 5.11, exceptuando la concentración del PN, donde se prepararon e inyectaron soluciones de PN en agua destilada, en un intervalo de 17.0-3335.0  $\mu\text{M}$ , por triplicado para cada nivel. Las inyecciones se realizaron por orden de concentración ascendente, comenzando con agua destilada (blanco). Los resultados obtenidos se procesaron con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI para obtener la ecuación de la recta, pendiente, intercepto y representación gráfica de la recta de regresión, coeficiente de correlación ( $r$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

#### 5.8.4.2. Precisión

Los parámetros evaluados fueron la repetibilidad y la precisión intermedia (únicamente para la variación día-día).

##### 5.8.4.2.1. Repetibilidad

A partir de una solución madre de PN en agua destilada con concentración (C) 3.3355 mM (3335.5  $\mu\text{M}$ ), se prepararon soluciones estándar a C de 250.1, 333.5, 416.9  $\mu\text{M}$ . Las soluciones estándar se hicieron por triplicado para cada nivel y se

inyectaron de manera aleatoria en la configuración de la figura 5.9 con las condiciones de la tabla 5.11, excepto para la concentración del PN. Se registraron los valores máximos de unidades de absorbancia (UA) de los picos y se analizaron los resultados.

#### **5.8.4.2.2. Precisión intermedia, variación día-día**

Se prepararon soluciones estándar con C de 333.5  $\mu\text{M}$  a partir de una solución madre con C de 3335.5  $\mu\text{M}$  en tres días diferentes, por triplicado para cada día. Las soluciones estándar se inyectaron en la configuración y las condiciones establecidas para la repetibilidad. Se registraron los valores máximos de UA de cada pico y se analizaron los resultados.

#### **5.8.4.3. Robustez de los parámetros internos**

Existen tres diferentes tipos de parámetros para evaluar la robustez como son: los parámetros internos (pH, temperatura, fuerza iónica, caudal, etc.); parámetros externos (para comparar diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, etc.); y parámetros básicos (estabilidad de soluciones de prueba). En el presente trabajo solo se evaluaron algunos parámetros internos en el dispositivo LOC que fueron la temperatura (20, 35 y 50  $^{\circ}\text{C}$ ), pH (4.0, 5.5 y 7) y fuerza iónica en la SF para la reacción enzimática (0.01 y 0.1 M). Las modificaciones se analizaron una a la vez, respecto a las condiciones de la tabla 5.11, excepto para las condiciones a evaluar. El estudio se realizó con la configuración de la figura 5.9, excepto para la modificación de la temperatura, donde se trabajó con el sistema de calentamiento con baño de vapor. Para cada condición se inyectaron las soluciones estándar de PN (333.5  $\mu\text{M}$ ), haciendo la inyección por triplicado. Se calculó la diferencia absoluta entre la media aritmética de la concentración  $\mu\text{M}$  de PN para las condiciones de la tabla 5.11 con respecto a las medias obtenidas cuando se modificaron dichas condiciones (temperatura, pH y fuerza iónica), una a la vez, por medio de la fórmula [88]:

$$\%|d_i| = 100 \times \left( \frac{|y_0| - |y_i|}{|y_0|} \right) \quad \text{Ecuación 5.5}$$

Donde:

% Idil : por ciento de diferencia absoluta

Iyol : Media aritmética de la concentración  $\mu\text{M}$  de PN en las condiciones de la tabla 5.11 y la configuración de la figura 5.9

Iyil : Media aritmética de la concentración  $\mu\text{M}$  de PN para cada condición modificada

#### **5.8.4.4. Especificidad**

Se analizaron los resultados de la sección 5.7.4 “espectro de absorción de las sustancias involucradas en la reacción enzimática”.

#### **5.8.4.5. Límite de detección y cuantificación**

Estos parámetros se determinaron basados en el ruido observado en la sección 5.7.1 “comparativo entre la lámpara de halógeno y la lámpara LED”. Se inyectaron soluciones estándar a concentraciones bajas de PN (4, 8, 12 y 17  $\mu\text{M}$ ), preparadas por triplicado, utilizando la configuración de la figura 5.9 y las condiciones de la tabla 5.11, excepto para la concentración del PN. Con los valores de la absorbancia de cada inyección se calcularon la media aritmética, D.E. y C.V. para cada nivel de concentración. El límite de detección se obtuvo a partir de una relación de señal-ruido de 2:1 o 3:1, y de 10:1 para el límite de cuantificación, para este último el coeficiente de variación debió ser menor que 10 % [89].

### **5.9. Optimización de las condiciones en el dispositivo Lab-On-Chip para la reacción enzimática de la $\beta$ -glucosidasa en su forma libre e inmovilizada**

Una vez que se optimizó y validó el método para la cuantificación del PN, se comenzó a trabajar con la reacción enzimática, en primera instancia se optimizaron las condiciones de la reacción enzimática entre la  $\beta$ -glu y el PNPG (temperatura, fuerza iónica y pH del medio), para lo cual se llevó el seguimiento de la señal del PN (producto de la reacción).

#### **5.9.1. Temperatura, fuerza iónica y pH del medio de reacción**

Se estudiaron diferentes factores que, de acuerdo con las observaciones preliminares, fueron los que afectaban a la reacción enzimática de la  $\beta$ -glu tal como

el pH, la fuerza iónica y la temperatura del medio. Para evaluar su efecto en la reacción se propuso un diseño de experimentos factorial multinivel  $2 \times 3^2$ , los valores para cada nivel se presentan en la tabla 5.12. Cabe destacar que se evaluaron las mismas condiciones para la enzima libre así como para la inmovilizada, debido a que se observó un comportamiento similar.

Las condiciones fijas para la optimización de la actividad de la enzima  $\beta$ -glu libre se muestran en la tabla 5.13 y se utilizó la configuración de la figura 5.12.

Tabla 5.12. Diseño de experimentos para la optimización de las condiciones de la reacción de la  $\beta$ -glu libre e inmovilizada.

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
pH de la SF para la reacción enzimática	4.0	5.0	6.0
Fuerza iónica en la SF para la reacción enzimática, M	0.01	0.05	-
Temperatura, °C	40	45	50

Tabla 5.13. Condiciones en el dispositivo LOC para la optimización de la reacción enzimática de la  $\beta$ -glu libre e inmovilizada.

Condición	Enzima en solución	Enzima inmovilizada
Temperatura, °C	Varía de acuerdo con el diseño de acuerdo con experimentos	Varía de acuerdo con el diseño de experimentos
Caudal para las tres bombas, $\mu\text{L}/\text{min}$	10	10
Canal 1	Solución de PNPG 0.33 mM	Solución de PNPG 0.33 mM
Canal 2	Solución enzimática a concentración de 1.0 UE/mL en SF con fuerza iónica y pH variables*	SF con fuerza iónica y pH variables*
Canal 3	SA 0.05 M pH 10	SA 0.05 M pH 10
Volumen de inyección en canal 1 (PNPG), $\mu\text{L}$	1.5	1.5
Longitud de onda, nm	400	400
Diseño del microchip	FMHM-250615	FMHM-250615 con enzima inmovilizada

\* El pH y la fuerza iónica en la SF varían de acuerdo con el diseño de experimentos.

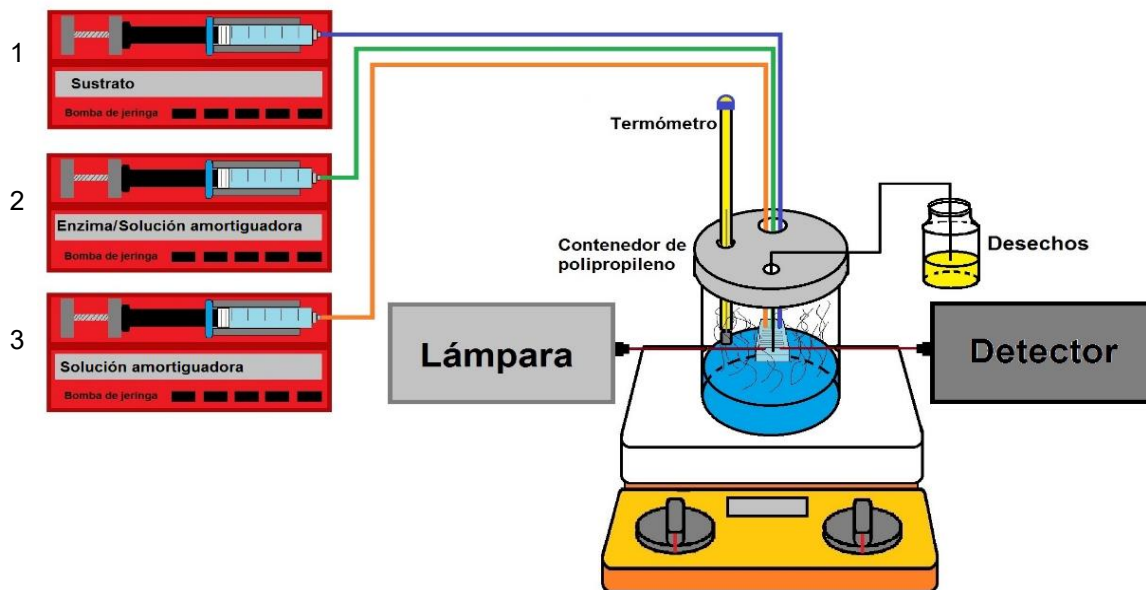


Figura 5.12. Configuración para la evaluación de la actividad enzimática de la  $\beta$ -gluc libre e inmovilizada. Se formó con tres bombas de jeringas que alimentan al microchip, a través de jeringas de vidrio (volumen de 5 mL y diámetro interno 10.3 mm) y tubería PTFE (diámetro interno del 0.22 pulgadas), donde: 1) dosifica la solución de PNPG; 2) adiciona únicamente SF, para la enzima inmovilizada o  $\beta$ -gluc disuelta en SF, para el estudio con la enzima libre; 3) adiciona la SA para el ajuste de pH. Además, el microchip contó con una salida de desechos y guías donde se insertaron fibras ópticas conectadas a una lámpara (LED o de halógeno) por un lado y un detector (UV-visible) en el otro. El calentamiento se hizo con el sistema con baño de vapor.

### 5.9.2. Evaluación del caudal y las dimensiones del reactor en el dispositivo LOC para la reacción enzimática

Se evaluaron algunos diseños de microchips, variando ancho, longitud y recorrido de microcanales. En ellos realizó el seguimiento de la reacción enzimática, a través de la concentración de PN (producto de reacción) contra tiempo de reacción. Para seleccionar el tiempo de reacción enzimática más adecuado se varió el caudal de las tres bombas. Se utilizó la configuración de la figura 5.12 y las condiciones de la tabla 5.14.



Tabla 5.14. Condiciones en el dispositivo LOC para la evaluación del volumen de inyección.

Condición	Valor
Temperatura	40 °C
Caudal para las tres bombas	2.5-40.0 $\mu\text{L}/\text{min}$
Canal 1	Solución de PNPG 0.333 mM en agua destilada
Canal 2	Solución enzimática con concentración de 1 UE/mL en SF 0.05 M pH 4.0
Canal 3	SA 0.05 M pH 10.0
Volumen de inyección	No aplica, todas las bombas trabajaron en continuo
Longitud de onda	400 nm
Diseño del microchip	FMHM-231014, FMHM-241014, FMHM-251014, FMHM-041114

### 5.10. Evaluación de la actividad de la enzima $\beta$ -glu libre e inmovilizada en un dispositivo LOC

Se prepararon soluciones estándar de PNPG en un intervalo de concentración de 0.1-33.3 mM en agua destilada. Para el caso de enzima libre, se prepararon 5 mL de una solución de enzima  $\beta$ -glu con concentración de 0.03 UE/mL en SF 0.01 M pH 5.0. Para la enzima inmovilizada, en lugar de la solución enzimática, únicamente se adicionó la SF 0.01 M pH 5.0 como medio de reacción y acarreador del PN (producto de la reacción). La evaluación de la actividad de la enzima libre e inmovilizada se llevó a cabo por triplicado con la configuración de la figura 5.12 y las condiciones de la tabla 5.15. Se obtuvieron las señales analíticas (UA) y se transformaron a unidades de concentración mM por interpolación en la curva de calibración del PN. Se graficó la  $V_0$  (mM/min) contra la concentración de PNPG (mM) y se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados en el programa Sigmaplot para obtener los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $k_{cat}$ .

Tabla 5.15. Condiciones en el dispositivo LOC para la evaluación de la actividad enzimática, libre e inmovilizada. Estudio por triplicado para cada tipo de enzima.

Condición	Enzima en libre	Enzima inmovilizada
Temperatura, °C	45	45
Caudal para las tres bombas, $\mu\text{L}/\text{min}$	10	10
Canal 1	Solución de PNPG 0.1-33.3 mM	Solución de PNPG 0.1-33.3 mM
Canal 2	Solución enzimática con concentración de 0.03 UE/mL en SF 0.01 M pH 5.0	SF 0.01 M pH 5.0
Canal 3	SA 0.01 M, pH 10	SA 0.01 M, pH 10
Volumen de inyección en canal 1 (PNPG), $\mu\text{L}$	1.5	1.5
Longitud de onda, nm	400	400
Diseño del microchip	FMHM-250615	FMHM-250615 con enzima inmovilizada

### 5.11. Estimación de la cantidad de enzima inmovilizada en el dispositivo LOC

Se estimó la cantidad de enzima inmovilizada haciendo una curva con la enzima  $\beta$ -glu libre (0.02-2.00 UE/mL en SF 0.01 M, pH 5.0) inyectando una solución de PNPG a concentración de 0.33 mM (disuelto en agua destilada) en la configuración de la figura 5.12 y las condiciones de la tabla 5.16 para la enzima libre, por otra parte se inyectó la misma solución en el microchip con enzima inmovilizada con las condiciones de la tabla 5.16 para la enzima inmovilizada, posteriormente se interpoló la señal obtenida para la enzima inmovilizada en la curva generada para la enzima libre.

Tabla 5.16. Condiciones en el dispositivo LOC para la estimación de la cantidad de enzima inmovilizada.

Condición	Curva de enzima libre	Análisis con enzima inmovilizada
Temperatura, °C	45	45
Caudal para las tres bombas, $\mu\text{L}/\text{min}$	10	10
Canal 1	Solución de PNPG 0.33 mM	Solución de PNPG 0.33 mM
Canal 2	Intervalo de concentración de la solución enzimática 0.02-2.00 UE/mL en SF 0.01 M, pH 5.0	SF 0.01 M, pH 5.0
Canal 3	SA 0.01 M, pH 10	SF 0.01 M, pH 10
Volumen de inyección en canal 1 (PNPG), $\mu\text{L}$	1.5	1.5
Longitud de onda, nm	400	400
Diseño del microchip	FMHM-250615	FMHM-250615 (enzima inmovilizada)

### 5.12. Estabilidad de la enzima $\beta$ -glu libre e inmovilizada

Empleando la configuración de la figura 5.12 y las condiciones establecidas en la tabla 5.17 se llevó a cabo el seguimiento de la estabilidad de la  $\beta$ -glu inmovilizada, así como la libre, en un lapso de 30 días. Para el primer caso, se inyectó diariamente la solución de PNPG a concentración de 0.33 mM en agua destilada. Para la enzima libre, se preparó una solución enzimática con concentración de 0.5 UE/mL en SF 0.01 M, pH 5.0 y se inyectó diariamente la solución de PNPG a concentración de 0.33 mM en agua destilada (en un microchip sin enzima inmovilizada). El estudio se suspendió los sábados y domingos. Después de cada sesión se lavaron y almacenaron los microchips como se especifica en el método descrito en la sección 5.5 “inmovilización de la enzima  $\beta$ -glu”. La solución enzimática se almacenó a 4 °C.

Tabla 5.17. Condiciones en el dispositivo LOC para el estudio de la estabilidad de la enzima libre e inmovilizada.

Condición	Estabilidad de la enzima libre	Estabilidad de la enzima inmovilizada
Temperatura, °C	45	45
Caudal para las tres bombas, $\mu\text{L}/\text{min}$	10	10
Canal 1	Solución de PNPG 0.33 mM	Solución de PNPG 0.33 mM
Canal 2	Solución enzimática a concentración de 1.0 UE/mL en SF 0.01 M pH 5.0	SF 0.01 M pH 5.0
Canal 3	SA 0.01 M pH 10	SA 0.01 M pH 10
Volumen de inyección en el canal 1 (PNPG), $\mu\text{L}$	1.5	1.5
Longitud de onda, nm	400	400
Diseño de microchip	FMHM-250615	FMHM-250615 con enzima inmovilizada

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Caracterización de los microchips

Los diseños de los microchips evaluados se presentan en el anexo A, donde se especifican sus dimensiones.

En esta sección se hizo la caracterización del diseño FMHM-250615 con y sin enzima inmovilizada, los cuales se utilizaron para la evaluación de la actividad de la  $\beta$ -glu. Para ambos casos los microcanales mostraron forma rectangular bien definida, la figura 6.1 muestra los microcanales del microchip sin enzima. En cuanto a las dimensiones no se observó una diferencia significativa entre ambos microchips (tabla 6.1). En la figura 6.2-A se muestra la máscara del diseño FMHM-250615 para la fotolitografía, donde no hay imperfecciones considerables, como manchas o puntos negros en la parte traslúcida, también se observaron los microchips de PDMS del diseño FMHM-250615, figura 6.2-B, tampoco se encontraron imperfecciones en los microcanales.

El PDMS es incoloro y traslúcido, sin embargo apareció un color naranja, apenas distinguible, en la superficie durante el proceso de inmovilización de la enzima, observado inmediatamente después de la reacción entre un grupo carbonilo del glutaraldehído con un grupo amino libre en la superficie modificada del PDMS [61].

Tabla 6.1. Dimensiones de los microchips, diseño FMHM-250615 con y sin enzima inmovilizada.

Dimensión	Microchip sin enzima	Microchip con enzima inmovilizada
Ancho del microcanal	205.8 $\pm$ 3.7 $\mu$ m (n = 5)	204.4 $\pm$ 4.7 $\mu$ m (n = 5)
Altura del microcanal	108.2 $\pm$ 4.6 $\mu$ m (n = 5)	109.8 $\pm$ 3.7 $\mu$ m (n = 5)
Longitud del serpentín para la reacción enzimática	18.3 cm	18.3 cm
Longitud del serpentín para el ajuste de pH	9.0 cm	9.0 cm
Longitud del paso óptico	7 mm	7 mm

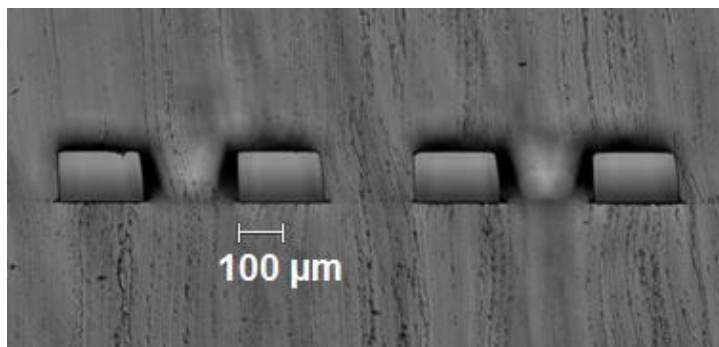


Figura 6.1. Corte transversal del microchip FMHM-250615 observado al microscopio con un objetivo 40X y una cámara phantom. Los rectángulos que se observan son los microcanales (ancho de 205.8  $\mu\text{m}$  x altura de 108.2  $\mu\text{m}$ ).

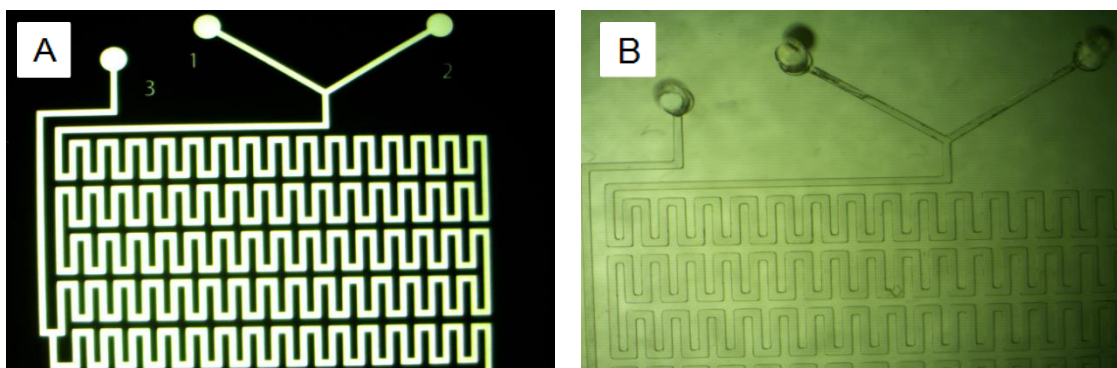


Figura 6.2. A) Máscara de acetato del diseño FMHM-250615; B) Microchip de PDMS, diseño FMHM-250615. Observaciones en el microscopio digital con acercamiento de 10X y un microscopio óptico con un objetivo 10X, respectivamente.

## 6.2. Estudios preliminares

En el presente trabajo se desarrolló una configuración adecuada para la evaluación de la enzima  $\beta$ -glucosidasa que consistió de un microchip, sistema de detección, bombeo, calentamiento e inyección. Estos estudios preliminares tuvieron como finalidad comparar las alternativas disponibles para cada sistema, así como determinar las características de dichos sistemas y tener mejor control de ellos.

### 6.2.1. Comparativo entre la lámpara de halógeno y la lámpara LED

La verificación completa de los espectrofotómetros para los análisis químicos involucra diversas pruebas como la precisión de la longitud de onda, luz extraviada,

reproducibilidad de la longitud de onda, resolución, precisión fotométrica, reproducibilidad fotométrica, ruido, llanura de la línea base, estabilidad y linealidad [83]. La mayoría de estas pruebas se llevan a cabo para evaluar al detector y no a las lámparas en sí. Los parámetros que tienen relación con las lámparas y que permitieron hacer un estudio comparativo fueron el ruido y la estabilidad de la lámpara. El ruido es generado, principalmente, por la fuente de luz y los componentes, tanto electrónicos como ópticos, del espectrofotómetro. Las variaciones de la intensidad de luz en la fuente se deben al desgaste y al tipo de material incandescente, dichas variaciones influyen en mayor medida cuando las mediciones de la absorbancia son bajas. Por otra parte, la estabilidad de la señal se ve reflejada en el grado del desgaste de las lámparas [83].

Durante la determinación del ruido y la estabilidad de ambas fuentes de luz se realizó el seguimiento de la señal generada durante 10 y 60 minutos, respectivamente, en la celda del microchip vacía. En la figura 6.3 solo se presenta el monitoreo de ambas lámparas durante 10 minutos. De dichas observaciones se generó la tabla 6.2.

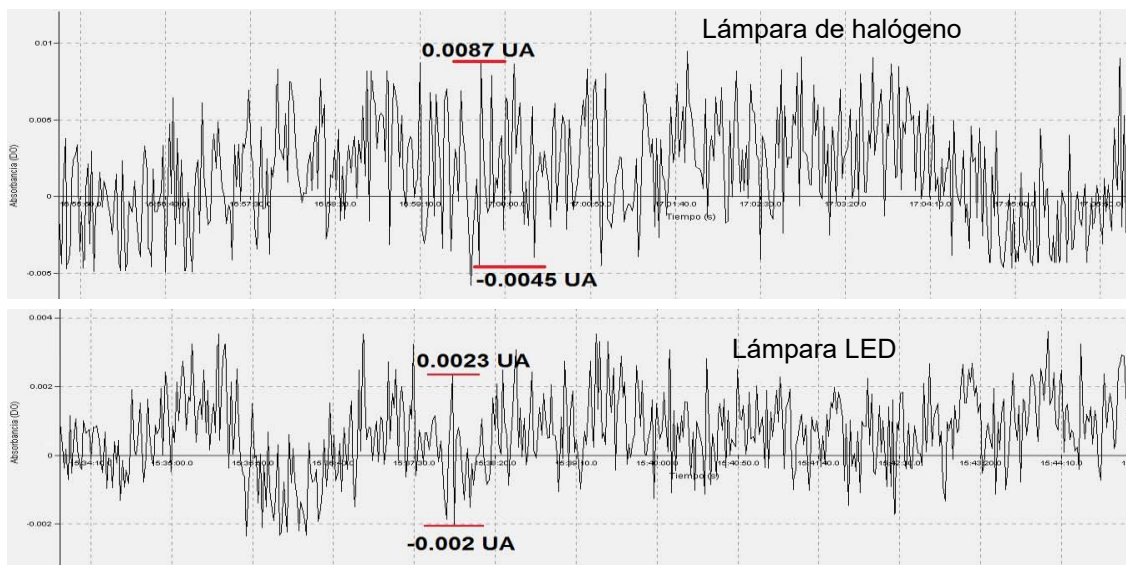


Figura 6.3. Monitoreo de las señales (UA) de las lámparas de halógeno y LED durante 10 minutos.

Tabla 6.2. Comparativo del ruido y la estabilidad de las lámparas de halógeno y LED en la celda vacía del microchip FMHM-140115.

Lámpara	Diferencia de la absorbancia máxima pico-pico, UA	Ruido, UA	Diferencia entre el valor máximo y el mínimo de la absorbancia/UA	Estabilidad, (UA/h)
Halógeno	0.0131	0.0092	0.0192	0.0192
LED	0.0044	0.0031	0.0062	0.0062

Se observó que el ruido es menor y la estabilidad mayor para la lámpara LED respecto a la lámpara de halógeno. En cuanto al tiempo de vida media y costos, las lámparas LED se pueden utilizar hasta 50,000 h, mientras que las lámparas de halógeno duran alrededor de 100 h y sus precios son semejantes por unidad [90].

Debido a que en el presente trabajo se realizó la detección del PN, y por lo tanto solo una longitud de onda, se propuso el uso de la lámpara LED. Sin embargo, al ser una fuente de luz monocromática, cuando se requiere hacer la detección a dos o más longitudes de onda, es recomendable otro tipo de fuente de luz, por ejemplo, la lámpara de halógeno.

### 6.2.2. Espectro de absorción de las sustancias involucradas en la reacción enzimática

El espectro de absorción de los reactivos y productos involucrados en la reacción enzimática se determinó en la celda de un microchip (FMHM-140115) a flujo continuo en un intervalo de longitud de onda de 350-850 nm con el objetivo de identificar si existían interferencias entre ellos. Como blanco se utilizó agua destilada. Para este estudio se utilizó la lámpara de halógeno evaluada anteriormente, debido a que se requiere un intervalo más amplio del que ofrece la lámpara LED. Los espectros se muestran en la figura 6.4.

Las SF, SA, enzima y D-glucosa no absorben en la región de 350-850 nm. Sin embargo, a pH 4.0 el PN y el PNPG presentan absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 350 nm, y por lo tanto hay interferencia entre ellas. Por otra parte, a pH de 10.0 el PN cambia a su forma aniónica y absorbe a 400 nm, no así el PNPG que se mantiene a 350 nm, por lo cual se decidió llevar a cabo la detección



espectrofotométrica del PN a pH 10.0 y una longitud de onda de 400 nm, donde no presenta interferencias con los demás reactivos y productos de la reacción enzimática empleados en la presente investigación.

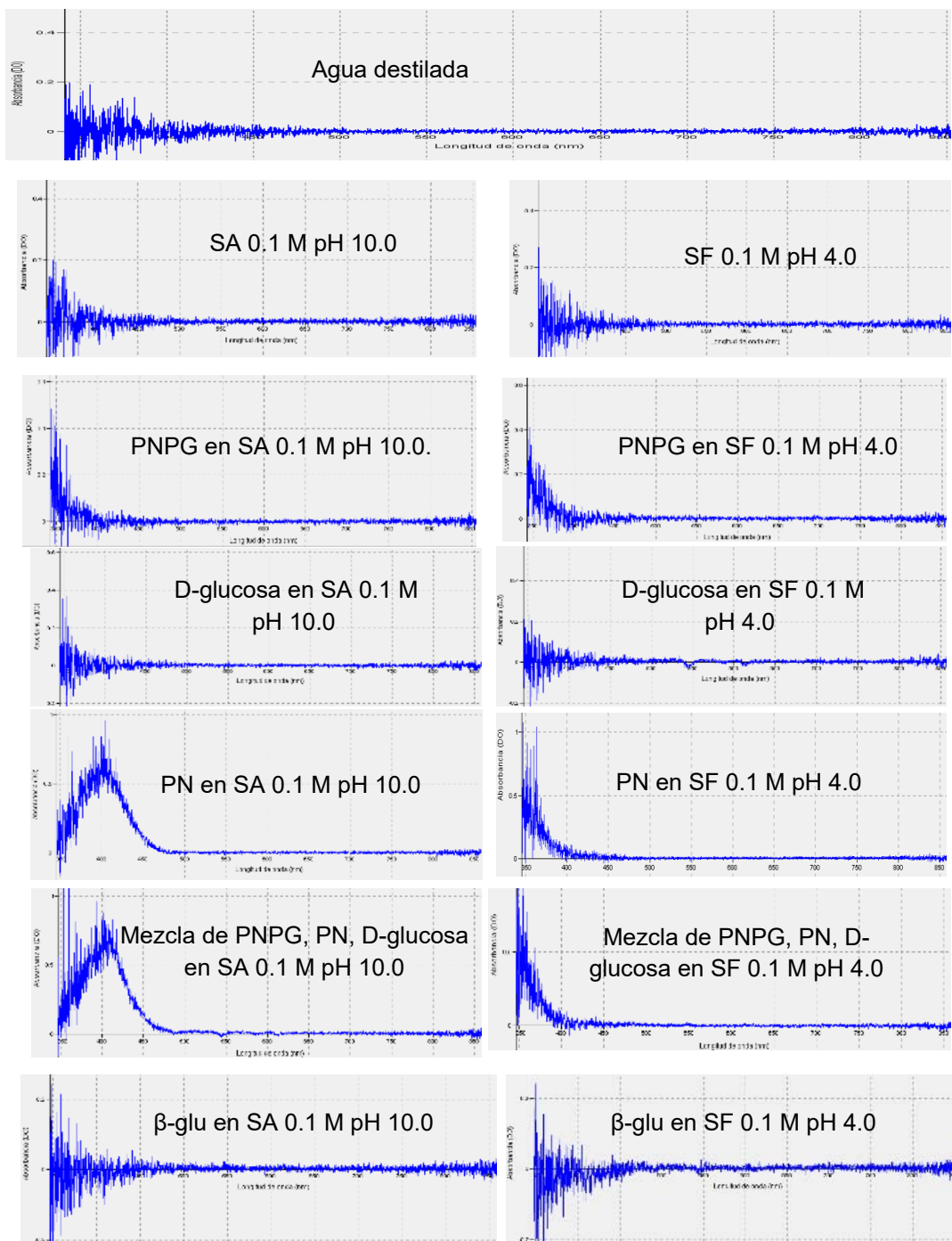


Figura 6.4. Barrido de las sustancias involucradas en la reacción enzimática de la  $\beta$ -glu, en un intervalo de longitud de onda de 350-850 nm.

### 6.2.3. Verificación de las bombas de jeringas

Se verificaron las tres bombas (para tener la certeza del volumen que dosificaban y si cumplían con la especificación del fabricante) únicamente a flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , dado que en esta condición se llevó a cabo la cuantificación del PN y la evaluación de la actividad enzimática. La tabla 6.3 muestra los resultados para las tres bombas.

Tabla 6.3. Verificación de las bombas de jeringas a 10.00  $\mu\text{L}/\text{min}$ , utilizando agua destilada a  $20 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ , con y sin microchip. Estudio realizado por triplicado.

Bomba	Caudal programado ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Caudal real ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Desviación estándar ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )
1	10.00	9.94	0.02
2	10.00	10.04	0.01
3	10.00	9.97	0.01
1*	10.00	9.95	0.02
2*	10.00	9.98	0.01
3*	10.00	10.01	0.01

\* Verificación con el microchip FMHM-140115

El fabricante de las bombas (New Era Pump Systems) indica una variación máxima permitida de  $\pm 1$  %, lo cual se cumple para las tres bombas, incluso cuando se conectan al microchip y cambia la presión del sistema, teniendo la desviación estándar máxima de 0.02  $\mu\text{L}/\text{min}$ , que representa el 0.2 %.

### 6.2.4. Evaluación del sistema de calentamiento

Algunas enzimas tienen mayor actividad a temperaturas superiores a 30  $^{\circ}\text{C}$ , tal es el caso de la  $\beta$ -glu [87]. Por dicha razón fue necesario calentar los microchips y así optimizar las condiciones de reacción de la enzima. Se evaluaron tres diferentes métodos, para los cuales se requerían ciertas características como: el calentamiento uniforme y constante del microchip, además de que no se formaran burbujas durante los análisis. En los microchips elaborados con PDMS las burbujas son un problema frecuente, sobre todo cuando se trabaja a temperaturas por encima de 30  $^{\circ}\text{C}$ , estas pueden afectar la cuantificación ya que el espectrofotómetro las detecta o pueden obstruir los microcanales, dificultando el mezclado y la reacción enzimática [91].

Se hizo el seguimiento de la formación de burbujas a lo largo de 5-6 inyecciones consecutivas del PN (las inyecciones se hicieron dejando 3 minutos entra cada una) para cada tipo de calentamiento (directo en la parrilla, en baño de agua y en baño de vapor, utilizando el microchip FMHM-140115) las secuencias de inyecciones se muestran en la figura 6.5. Las burbujas se identifican como los picos finos que sobresalen de los picos de PN. Durante el calentamiento directo en la parrilla se observó que 4 de los 6 picos presentaron burbujas, en el calentamiento en el baño de agua disminuyó la presencia de burbujas, 2 de cada 5 inyecciones, y el calentamiento en el baño de vapor no presentó burbujas durante la prueba, sin embargo, puede aparecer alguna en cada 10 o 15 inyecciones. Durante las pruebas el termómetro presentó valores constantes en la temperatura. Así se tomó la decisión que de los tres métodos, el calentamiento en el baño de vapor era el más adecuado para desarrollar el presente trabajo. Cabe destacar que todas las soluciones de prueba se desgasificaron durante 10 minutos en un baño ultrasónico.

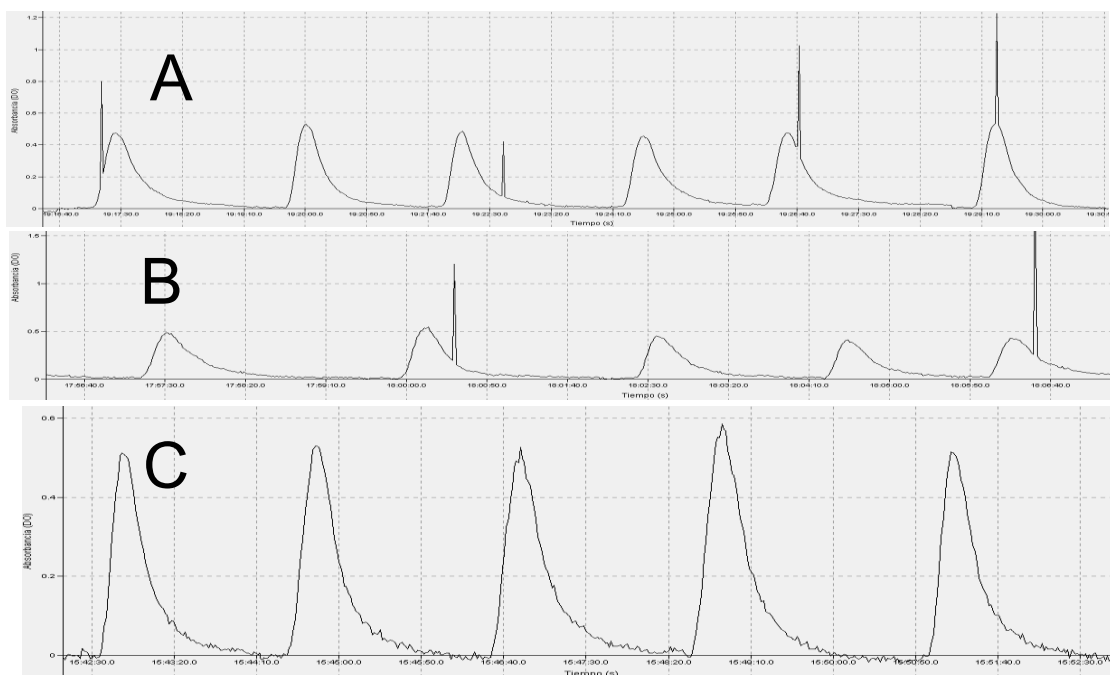


Figura 6.5. Seguimiento de la formación de burbujas en los diferentes tipos de calentamiento, donde: A) Secuencia de inyecciones con calentamiento directo; B) Secuencia de inyecciones con calentamiento en el baño de agua; C) Secuencia de inyecciones con calentamiento en el baño de vapor. Los picos finos que sobresalen de los picos principales (p-nitrofenol) son las burbujas formadas en el microchip.

### 6.3. Evaluación de las condiciones de análisis del p-nitrofenol

Una vez que se diseñó la configuración que constó de un microchip, sistemas de detección, bombeo, calentamiento e inyección, se definieron las condiciones para cuantificar al p-nitrofenol, dado que es el analito de interés, las señales analíticas que se obtuvieron de él debieron ser confiables.

#### 6.3.1. Volumen de inyección

Se evaluó el volumen de inyección del PN en las condiciones establecidas en la metodología, sección 5.8.1, con un caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Analizando los resultados de la tabla 6.4 se puede observar que la D.E. del volumen de inyección es de alrededor de 0.02  $\mu\text{L}$  (para todos los niveles evaluados) pero al disminuir el volumen de inyección se incrementa el C.V. y la altura del pico. El volumen de inyección de 1.5  $\mu\text{L}$  presenta un C.V. de 1.1 % y a volúmenes más elevados éste no disminuye de manera significativa. Además, a 1.5  $\mu\text{L}$  se obtienen picos bien definidos como el que se muestra en la figura 6.6. Al incrementar el volumen de inyección, el pico se ensancha y la altura no varía proporcionalmente a dicho ensanchamiento. Cabe destacar que los resultados de esta prueba dependen en gran medida de la habilidad del analista, debido a que la inyección no es automatizada.

Tabla 6.4. Análisis estadístico del volumen de inyección del PN ( $n = 10$  para cada nivel), caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , en el dispositivo LOC presentado en la figura 5.9 con el microchip FMHM-250615.

Volumen de inyección deseado, $\mu\text{L}$	Promedio del volumen de inyección registrado en la bomba, $\mu\text{L}$	C.V. para el volumen de inyección, %	Tiempo de inyección aproximado, segundos	Altura promedio del pico, UA	C.V. para la altura del pico, %	Promedio del ancho del pico, segundos	C.V. para el ancho del pico, %
0.5	0.505 $\pm$ 0.019	3.8	3.3	0.219	4.6	46	4.1
1.0	0.996 $\pm$ 0.023	2.3	6.6	0.426	2.4	71	1.8
1.5	1.510 $\pm$ 0.016	1.1	10.0	0.615	1.3	105	1.2
2.0	2.015 $\pm$ 0.021	1.0	13.3	0.736	1.4	143	1.2
3.0	3.007 $\pm$ 0.020	0.7	20.0	0.893	0.9	185	1.0

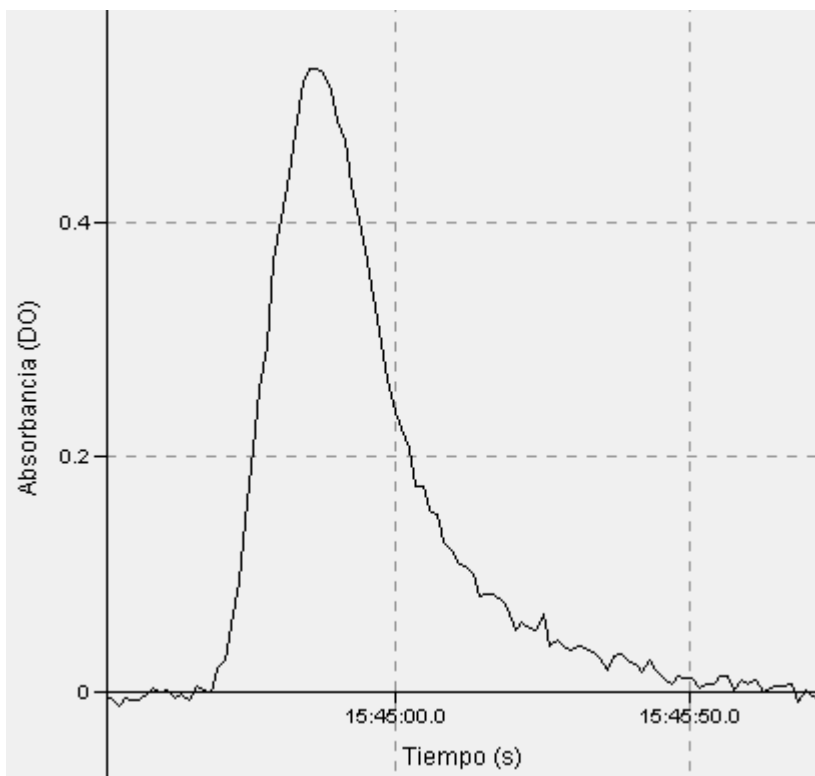
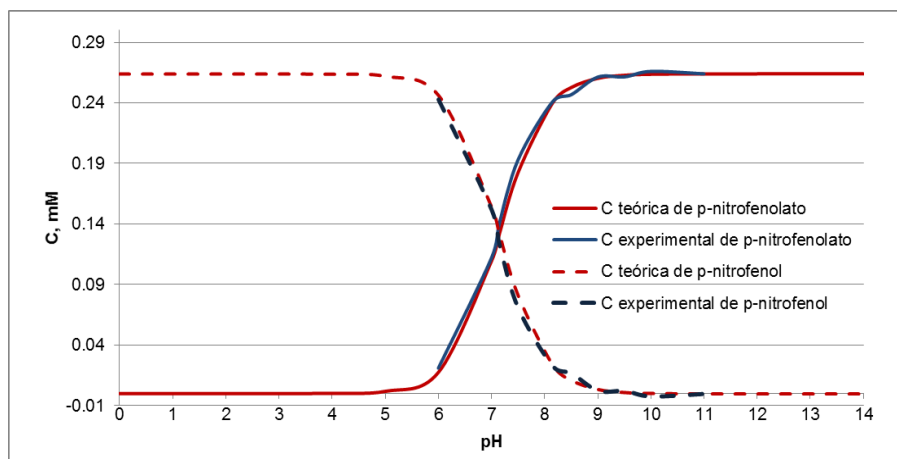


Figura 6.6. Pico del PN (0.264 mM) detectado en el dispositivo LOC presentado en la figura 5.12 con el microchip FMHM-250615, a un caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  y un volumen de inyección de 1.5  $\mu\text{L}$ .

### 6.3.2. Diagrama de distribución de especies p-nitrofenol – p-nitrofenolato

Para determinar el pH adecuado para cuantificar al p-nitrofenol se elaboró un diagrama de distribución de especies (p-nitrofenol – p-nitrofenolato) teórico y experimental, gráfica 6.1, en el cual se puede observar un comportamiento semejante entre ambos casos. El pKa del PN es de 7.15 [86], teóricamente a partir del pH de 8.15 se tiene el 90 % de p-nitrofenolato y 10 % de p-nitrofenol, semejante al valor experimental. A partir del pH 9.0 no existieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración del p-nitrofenolato, ya que se había convertido más del 98 % del p-nitrofenol a p-nitrofenolato. Por medio de este diagrama se determinó que la solución que llegara al paso óptico del microchip debería tener un pH mínimo de 9.0.

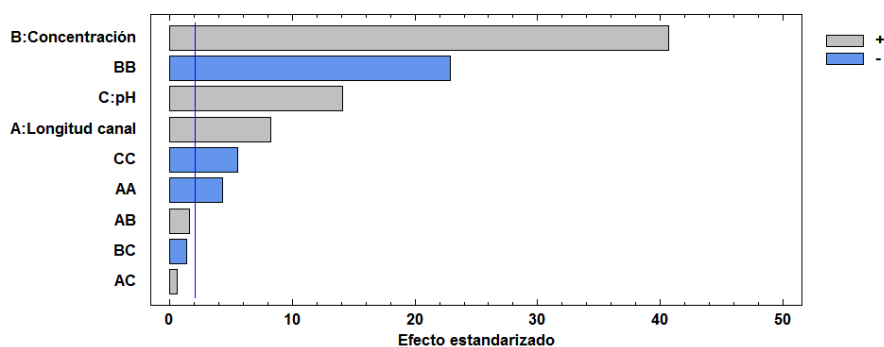


Gráfica 6.1. Diagrama de distribución de especies teórico y experimental para el p-nitrofenol - p-nitrofenolato en la configuración de la figura 5.9 y con microchip FMHM-250615.

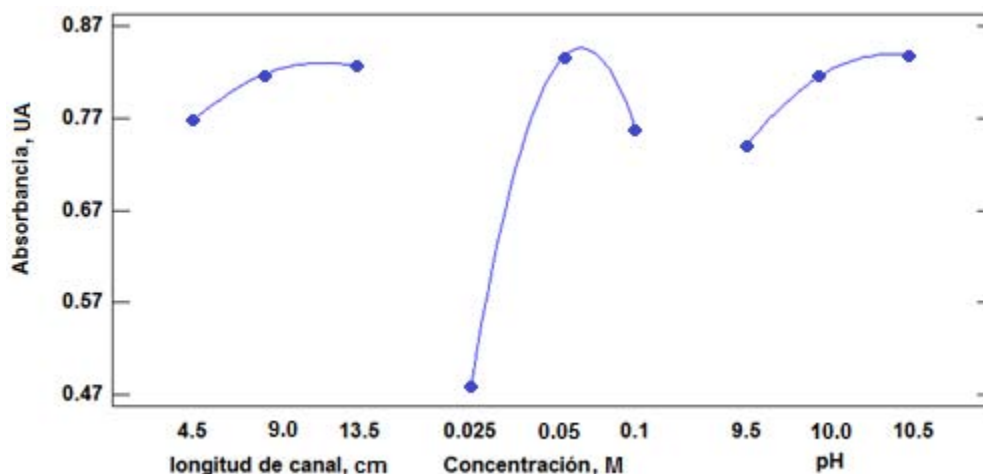
### 6.3.3. Evaluación del pH, fuerza iónica y longitud del reactor para la cuantificación del p-nitrofenol

Dado que la reacción enzimática entre la  $\beta$ -glu y el PNPG se realizó en un medio ácido y la detección del producto (PN) se llevó a cabo en un medio básico, se debió hacer el ajuste con una solución amortiguadora de amoniaco y alcanzar un pH en la mezcla superior a 9.0. En dicho ajuste están involucrados factores como el pH y fuerza iónica de la solución amortiguadora de amoniaco, así como las dimensiones del reactor para mezclar el medio de reacción y la solución amortiguadora.

Del diseño de experimentos propuesto en la sección 5.8.3 de la metodología se obtuvieron las gráficas 6.2 y 6.3.



Gráfica 6.2. Diagrama de Pareto estandarizado para la absorbancia, del diseño de experimentos  $3^3$  (sección 5.8.3 de la metodología) para la optimización del ajuste del pH para la cuantificación del PN en la configuración de la figura 5.9 y con el microchip FMHM-050515, figura 5.10.



Gráfica 6.3. Efectos principales (longitud del reactor, fuerza iónica y pH de la SA para el ajuste del pH) para la absorbancia, diseño de experimentos  $3^3$  (sección 5.8.3 de la metodología) para la optimización del ajuste del pH para la cuantificación del PN en la configuración de la figura 5.9 y con el microchip FMHM-050515, figura 5.10.

Durante la optimización se observó que el mayor efecto lo tuvo la fuerza iónica (concentración M) en la SA, ya que afecta directamente a la capacidad de mantener un pH determinado. Por lo tanto, se alcanza la señal máxima cuando la fuerza iónica en la solución amortiguadora para el ajuste de pH (SA) es igual o mayor que la fuerza iónica en la solución de fosfatos (SF) para la reacción enzimática.

El pH de la SA para ajustar el pH para la detección del PN también mostró efecto, cuando se trabajó a pH de 10.0 y 10.5 los valores fueron estadísticamente iguales, sin embargo a 9.5 disminuyó la absorbancia, posiblemente porque el pH final de la mezcla de las soluciones para la reacción enzimática (SF) y para el ajuste del pH (SA) estaría por debajo de 8.15, donde habría alrededor del 90 % del compuesto colorido.

La longitud del canal para el ajuste del pH para la detección del PN presentó menor efecto, aunque también significativo, la longitud teórica de los microcanales para lograr la difusión completa del PN debería ser de 36.8 m (el cálculo se presenta en el anexo B), tomando en cuenta que el número de Reynolds en el microchip FMHM-250615 (utilizando agua destilada a 20 °C, un caudal de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) es de 25.35, teniendo flujo laminar (el cálculo de Re se presenta en el anexo C) y solo hubiera

difusión axial de los componentes. Sin embargo no fue necesario fabricar un microchip con dicha longitud ya que los diseños evaluados cuentan con un serpentín y esto ayuda al mezclado de los compuestos. Se observó menor absorbancia con el serpentín de 4.5 cm comparado con los valores obtenidos con los serpentines de 9.0 cm y 13.5 cm, los cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Cabe destacar que no se observaron interacciones entre los tres factores optimizados. Las condiciones óptimas para la cuantificación del PN y sus especificaciones se muestran en la tabla 6.5.

Tabla 6.5. Valores de la fuerza iónica, pH y longitud del reactor para la cuantificación del PN en la configuración de la figura 5.9 y con el microchip FMHM-050515, figura 5.10.

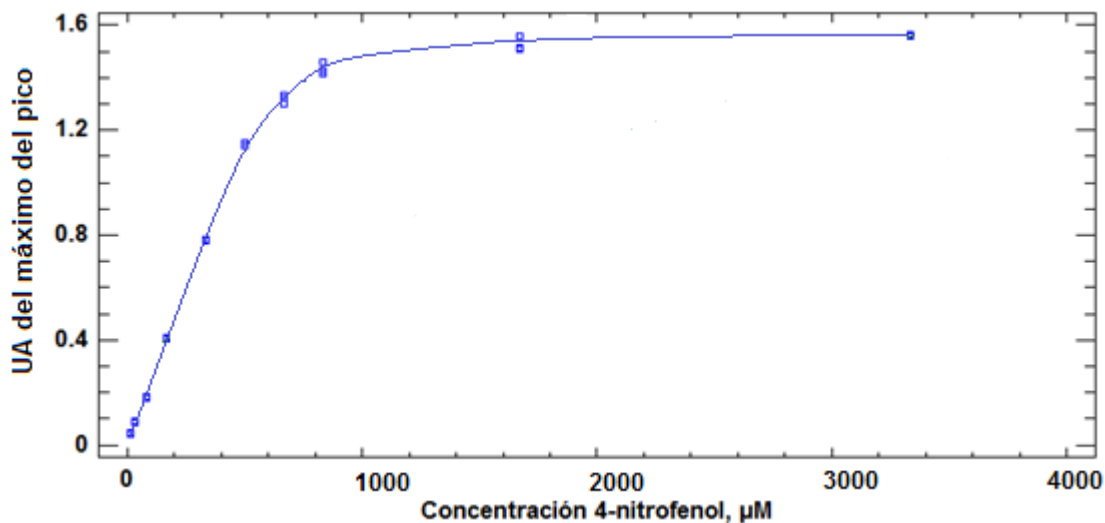
Factor optimizado	Valor óptimo	Especificación
Fuerza iónica en la SA para el ajuste	0.05 M	La fuerza iónica (concentración de amoníaco) en la SA pH 10.0 debe ser mayor o igual que la concentración de fosfatos en la SF pH 4.0 (o mayor pH)
pH de la SA para el ajuste	10.0	Esta solución es capaz de modificar el pH (arriba de 9) de una SA con pH 4, o mayor, y con fuerza iónica similar.
Longitud del serpentín para el ajuste del pH	9.0 cm	Para un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ en cada uno de los tres microcanales y un volumen de inyección de 1.5 $\mu\text{L}$

### 6.3.4. Validación del método para la cuantificación del p-nitrofenol

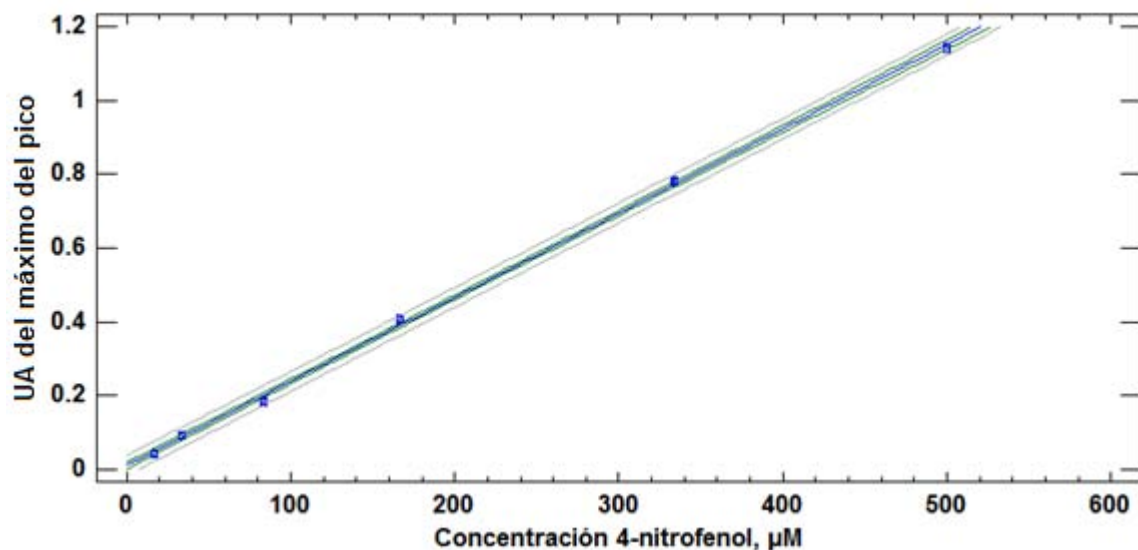
#### 6.3.4.1. Linealidad e intervalo de concentraciones

Se obtuvieron las gráficas 6.4 y 6.5, para las unidades de absorbancia (UA) del máximo del pico vs el intervalo de concentración de 17-3334  $\mu\text{M}$  e intervalo lineal de 17-500  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Además se calcularon los parámetros estadísticos mostrados en las tablas 6.6 y 6.7.





Gráfica 6.4. UA del máximo del pico vs concentración del PN, en el intervalo de concentración 17-3334  $\mu\text{M}$  en la configuración de la figura 5.9 con el microchip FMHM-250615.



Gráfica 6.5. Curva de calibración del PN, UA del máximo del pico vs concentración del PN, intervalo lineal para la cuantificación del PN de 17-500  $\mu\text{M}$  en la configuración de la figura 5.9 con el microchip FMHM-250615.

Tabla 6.6. Coeficientes de la regresión lineal, para la cuantificación del PN en la configuración de la figura 5.9 con el microchip FMHM-250615, en el intervalo 17-500  $\mu\text{M}$  de PN,  $n = 3$ .

	Mínimos Cuadrados	D.E.	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.0091085	0.00421526	2.16084	0.0462
Pendiente	0.00228648	0.000016372	139.658	0.0000

Tabla 6.7. Análisis de varianza para la cuantificación del PN en la configuración de la figura 5.9 con el microchip FMHM-250615, intervalo de 17-500  $\mu\text{M}$ ,  $n = 3$ .

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2.8762	1	2.8762	19504.25	0.0000
Residuo	0.00235945	16	0.000147466		
Total (Corr.)	2.87856	17			

La pendiente y el análisis de varianza presentaron un valor-p  $<0.05$  con lo cual se demuestra que hay una relación significativa entre la absorbancia y la concentración del PN. El intercepto con valor-p  $<0.05$  es estadísticamente significativo.

Para cumplir con el criterio de la linealidad se requiere que  $r^2$  sea  $>0.98$  [89,92], para el intervalo de 17-667  $\mu\text{M}$  se cumple este criterio, siendo  $r^2 = 0.989$ . Sin embargo, en la gráfica 6.4 se observa que el comienzo de la pérdida de la respuesta lineal se da a partir de 667  $\mu\text{M}$ , por lo que se decidió que el intervalo lineal apropiado para la cuantificación del PN fuera de 17-500  $\mu\text{M}$  con un mejor  $r^2$  (0.999). Los blancos no dieron respuesta en el espectrofotómetro.

### 6.3.4.2. Precisión

La precisión incluye parámetros como la repetibilidad, precisión intermedia (variación entre analistas, días, equipos, etc.) y reproducibilidad (estudio interlaboratorio). Para fines prácticos de la presente investigación sólo se evaluaron la repetibilidad y la precisión intermedia (día-día), y se eligieron tres concentraciones intermedias del intervalo lineal, los resultados se muestran en las tablas 6.8 y 6.9.

Tabla 6.8. Prueba de la repetibilidad para el método para la cuantificación del PN en la configuración de la figura 5.9 con el microchip FMHM-250615, estudio se realizó por triplicado para los tres niveles de concentración.

Número de análisis	250.1 $\mu\text{M}$		333.5 $\mu\text{M}$		416.9 $\mu\text{M}$	
	UA	C ( $\mu\text{M}$ )	UA	C ( $\mu\text{M}$ )	UA	C ( $\mu\text{M}$ )
1	0.578	248.81	0.765	330.59	0.981	425.06
2	0.589	253.62	0.782	338.03	0.965	418.06
3	0.576	247.93	0.771	333.22	0.971	420.69
Media		250.99		333.94		421.27
D. E.		3.06		3.77		3.54
C. V. (%)		1.22		1.13		0.84
C.V. global (%)	1.06					

C: concentración

Tabla 6.9. Prueba de la precisión intermedia para el método para la cuantificación del PN en la configuración de la figura 5.9 con el microchip FMHM-250615, para la variación día-día, prueba realizada por triplicado durante tres días.

Número de análisis	Día 1		Día 2		Día 3	
	UA	C ( $\mu$ M)	UA	C ( $\mu$ M)	UA	C ( $\mu$ M)
1	0.765	330.59	0.780	337.15	0.778	336.28
2	0.782	338.03	0.769	332.34	0.773	334.09
3	0.771	333.22	0.772	333.65	0.766	331.03
Media		333.94		334.38		333.80
D. E.		3.77		2.49		2.64
C. V. (%)		1.13		0.74		0.79
C.V. global (%)	0.88					

Para la repetibilidad y la precisión intermedia de los métodos espectrofotométricos se recomienda que el C. V. sea  $\leq 3$  %, para un mínimo de tres niveles de concentración y 3 repeticiones por cada nivel, así mismo para la variación día-día [88]. Se puede observar que esta condición se cumple para ambos casos. En la precisión intermedia (variación día-día) se llevó a cabo un análisis de varianza y se determinó que no hubo diferencias estadísticamente significativas para las medias y D.E. de los tres días, esto con un nivel de confianza del 95 %. El método mostró ser preciso.

#### 6.3.4.3. Robustez de los parámetros internos

Para este estudio se obtuvieron los resultados de la tabla 6.10. Se compararon las medias y desviaciones estándar; no se observaron diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95 %. El mayor valor del porcentaje de diferencia absoluta fue a una temperatura de 50 °C, 2.45 %, sin embargo cumple con el criterio de aceptación que es  $\leq 3$  % [88]. El método es robusto para estos parámetros y se puede trabajar dentro de los intervalos evaluados.

Tabla 6.10. Resumen de los resultados del estudio de la robustez de los parámetros internos para el método para la cuantificación del PN en la configuración de la figura 5.9 con el microchip FMHM-250615.

Condición	Valor	Media, $\mu\text{M}$	D. E, $\mu\text{M}$	No. de muestras	% Idil
Normales	*1	333.94	3.77	3	-
pH	5.5	338.32	3.40	3	1.31
	7	336.57	3.82	3	0.79
Temperatura, $^{\circ}\text{C}$ *2	35	332.49	4.47	3	0.43
	50	342.11	3.28	3	2.45
Concentración, M	0.01	337.88	4.82	3	1.17

\*1 Temperatura 20  $^{\circ}\text{C}$ ; pH 4.0; C 0.05 M.

\*2 Se utilizó la configuración de la figura 5.12 (varía en que tiene una cámara de vapor) con el microchip FMHM-250615.

#### 6.3.4.4. Especificidad

En la sección 5.7.4 “espectro de absorción de las sustancias involucradas en la reacción enzimática” se observa que no existen interferencias para el PN a una longitud de onda de 400 nm y un pH de 10.0, en las condiciones de análisis, con los reactivos y productos establecidos en este estudio.

#### 6.3.4.5. Límite de detección y cuantificación

Existen diferentes métodos para determinar el límite de detección y cuantificación: uno de ellos es la evaluación visual, que se emplea para métodos no instrumentales aunque también puede utilizarse con métodos instrumentales; otro es basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente; el que se utilizó para este estudio se basa en la relación de la señal-ruido, este se aplica a los métodos analíticos que exhiben ruido en la línea base, como es el caso de los métodos espectrofotómetros [89]. El análisis de las soluciones estándar evaluadas se muestra en la tabla 6.11.

Tabla 6.11. Análisis estadístico de las soluciones estándar para la determinación del límite de detección y cuantificación de la configuración de la figura 5.9 con el microchip FMHM-250615, se realizó el estudio por triplicado para cada nivel de concentración.

C, $\mu\text{M}$	Media, UA	D.E., UA	C.V., %
17	0.040	0.0025	6.2
13	0.031	0.0046	14.8
8	0.019	0.0036	19.0
4	0.010	0.0025	24.4

El ruido observado fue de 0.0031 UA, dada la relación de la señal-ruido de 3:1 para el límite de detección y de 1:10 para el límite de cuantificación, sus valores fueron de 0.0093 y 0.031 UA, respectivamente. Los resultados indican que el límite de detección fue de 4  $\mu\text{M}$  de PN (0.01 UA). Por otro lado, el valor más cercano al límite de cuantificación fue de 13  $\mu\text{M}$  (0.031 UA), sin embargo, el C.V. fue mayor que 10%, por lo tanto el valor más adecuado fue de 17  $\mu\text{M}$  (0.04 UA).

En la tabla 6.12 se presentan los parámetros de la validación del método para la cuantificación del PN en un dispositivo LOC.

Tabla 6.12. Resumen de la validación del método para la cuantificación del PN en un dispositivo LOC.

Parámetro	Valor
Intervalo lineal	17-500 $\mu\text{M}$ de PN, $r^2 > 0.98$
Repetibilidad	C. V. < 3.0 %
Precisión intermedia (día-día)	C. V. < 3.0 %
Robustez de los parámetros internos	pH (4.0-7.0) < 3.0 % Temperatura (20-50 °C) < 3.0 % Concentración de la SF (0.01-0.05 M) < 3.0 %
Especificidad	No hay interferencias para la cuantificación del PN a 400 nm y pH 10 con los reactivos, productos, enzima y soluciones de fosfatos y amortiguadora utilizadas en la presente investigación
Límite de detección	4 $\mu\text{M}$
Límite de cuantificación	17 $\mu\text{M}$

Los parámetros validados fueron suficientes para los fines de la presente investigación.

#### 6.4. Optimización de las condiciones para la reacción enzimática de la $\beta$ -glu, libre e inmovilizada, en un dispositivo LOC

Se llevó a cabo la optimización de las condiciones (temperatura, fuerza iónica y pH del medio) tanto para la reacción del PNPG con la  $\beta$ -glu libre, como con su forma inmovilizada. El diseño de experimentos propuesto para dicho fin se presentó en la metodología, sección 5.9.1. La configuración para la evaluación de la enzima  $\beta$ -glu se muestra en la figura 6.7, la cual es equivalente a la que se presenta en la figura 5.12 de la metodología, con el microchip FMHM-250615.

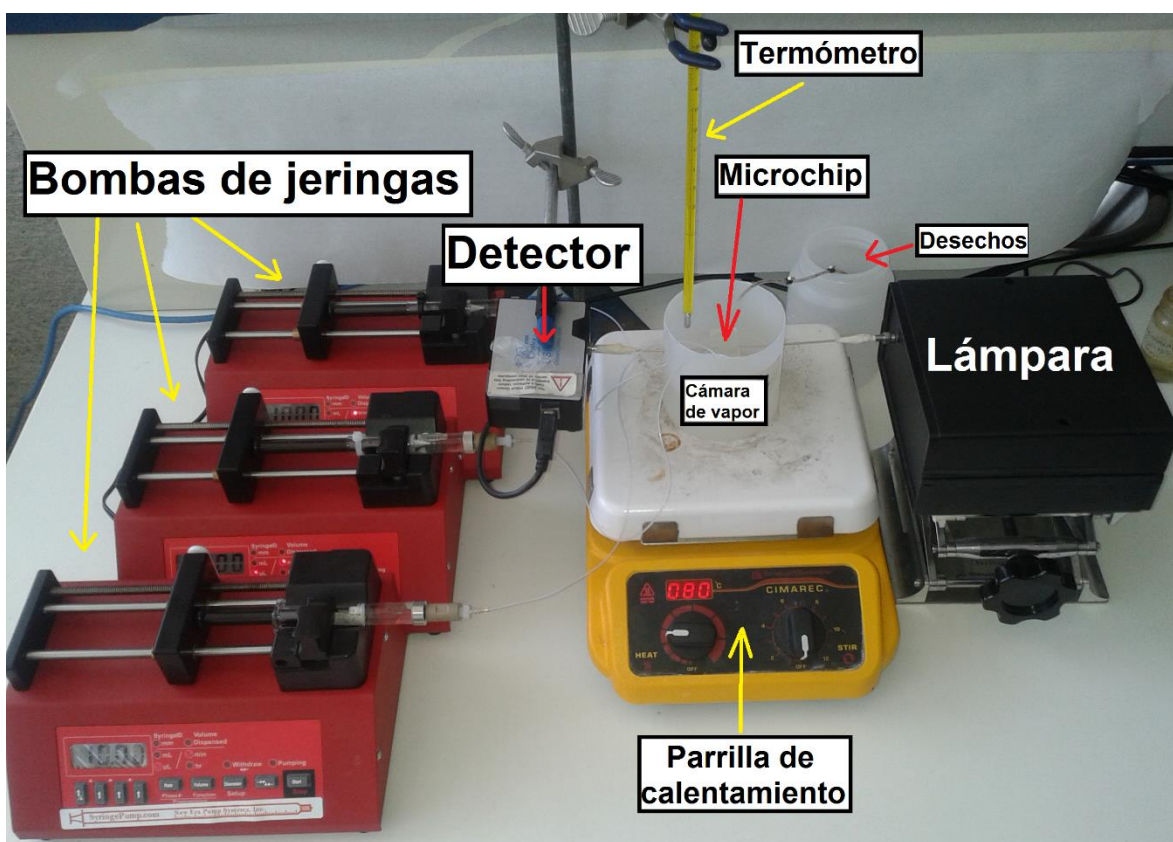
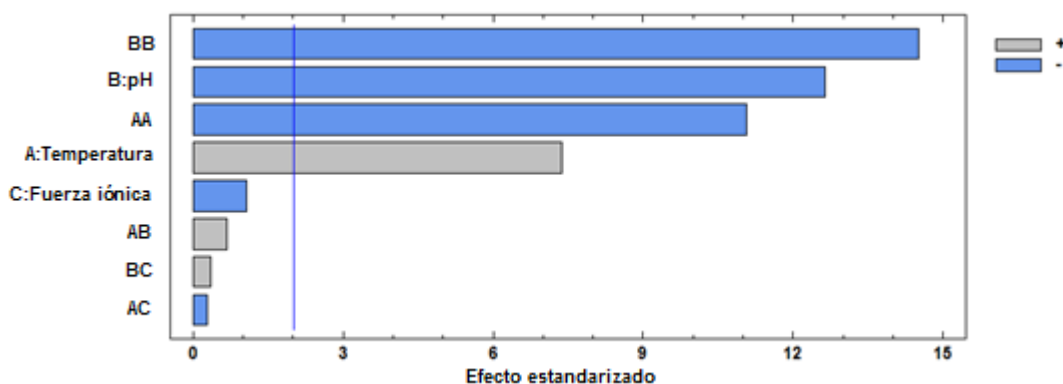


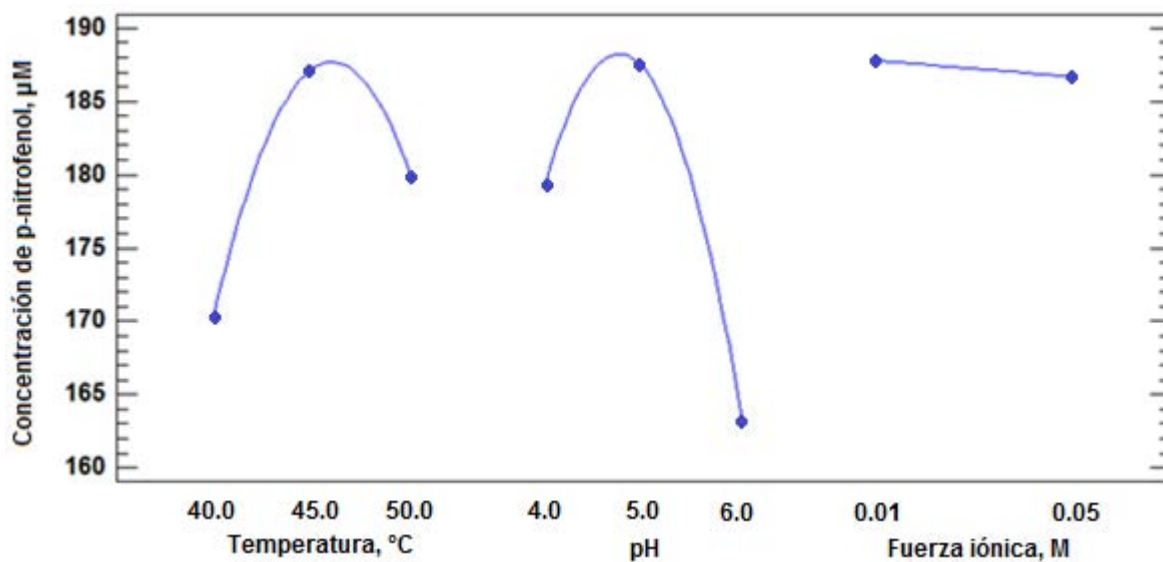
Figura 6.7. Configuración para la evaluación de la enzima  $\beta$ -glu. El microchip (diseño dependiente del tipo de prueba) se alimenta con las bombas de jeringa, dos de ellas trabajan a flujo continuo, para la SF pH 4.0 (ya sea sola o con enzima en solución) y para la SA pH 10.0, la tercer bomba se utiliza para adicionar la solución de PNPG o PN. Posee una cámara de vapor calentada con una parrilla, dentro de la cámara se colocó el microchip y un termómetro. En el diseño del microchip se contemplaron dos guías para insertar las fibras ópticas ubicadas en los extremos del paso óptico, éstas se conectan a una lámpara y a un detector a los extremos del microchip.

### 6.4.1. Enzima libre

Después del análisis estadístico de las señales del PN (producto de la reacción) se obtuvieron las gráficas 6.6 y 6.7



Gráfica 6.6. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración del PN, optimización de las condiciones de la reacción entre la enzima  $\beta$ -glu libre y el PNPG en la configuración de la figura 6.7, con el diseño del microchip FMHM-250615.



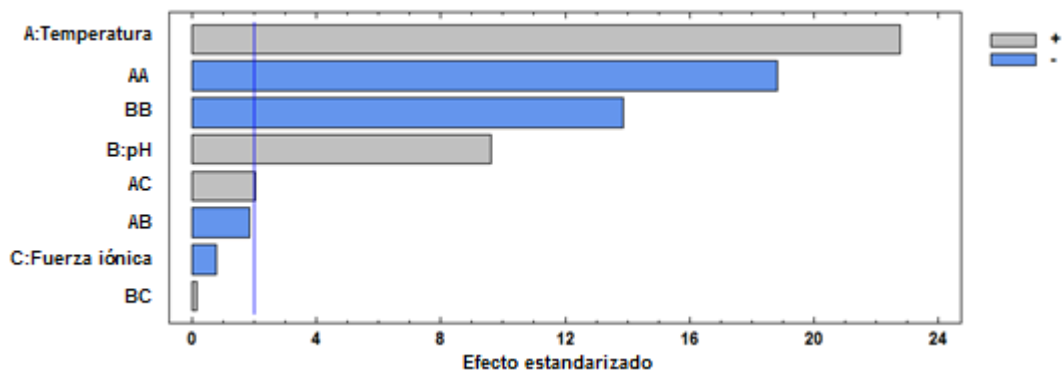
Gráfica 6.7. Efectos principales para la concentración del PN, generado después de la reacción entre la enzima libre y el PNPG en la configuración de la figura 6.7, con el diseño del microchip FMHM-250615.

En el diagrama de pareto estadarizado, gráfica 6.6, se observó que la fuerza iónica en la SF no tuvo un efecto significativo, el mayor efecto fue debido al pH, seguido por la temperatura. En la gráfica de efectos principales, gráfica 6.7, se encontraron

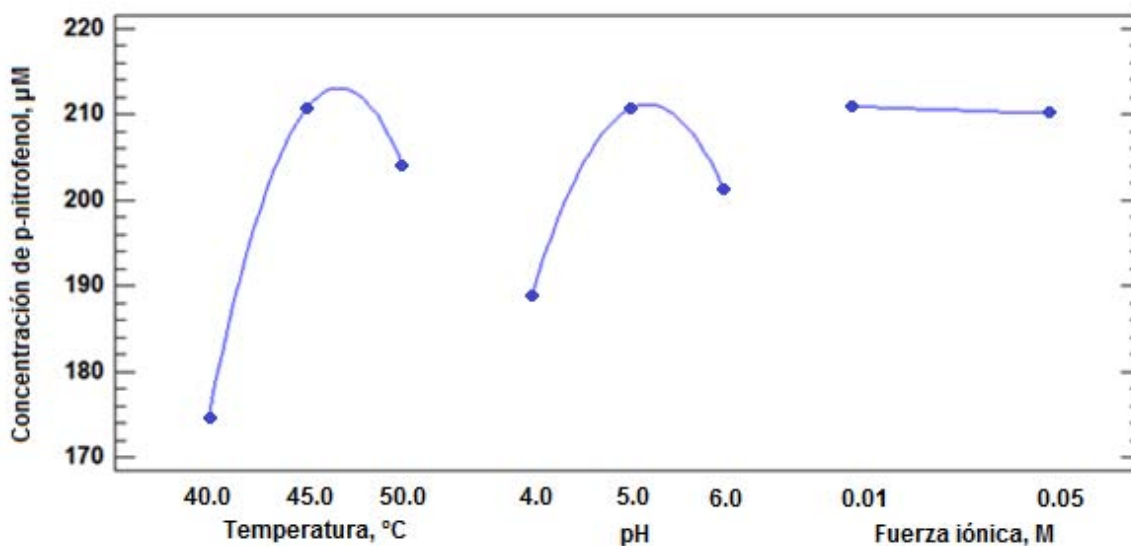
valores máximos a una temperatura de 45 °C y pH de 5.0, por tal razón se tomaron estos valores como los óptimos para evaluar la actividad de la enzima  $\beta$ -glu libre.

#### 6.4.2. Enzima inmovilizada

Después del análisis estadístico de las señales del PN (producto de la reacción) se obtuvieron las gráficas 6.8 y 6.9.



Gráfica 6.8. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración del PN, optimización de las condiciones de la reacción entre la enzima  $\beta$ -glu inmovilizada y el PNPG en la configuración de la figura 6.7, con el diseño del microchip FMHM-250615.



Gráfica 6.9. Efectos principales para la concentración del PN, generado después de la reacción entre la enzima libre y el PNPG en la configuración de la figura 6.7, con el diseño de microchip FMHM-250615.



El diagrama de Pareto estandarizado, gráfica 6.8, mostró que la fuerza iónica en la SF no tuvo un efecto significativo, al igual que en la optimización para la enzima en solución, el mayor efecto fue del pH seguido de la temperatura. La gráfica de efectos principales, gráfica 6.9, presentó valores máximos a una temperatura de 45°C y pH de 5.0, estos valores son los mismos que se observaron para la enzima libre.

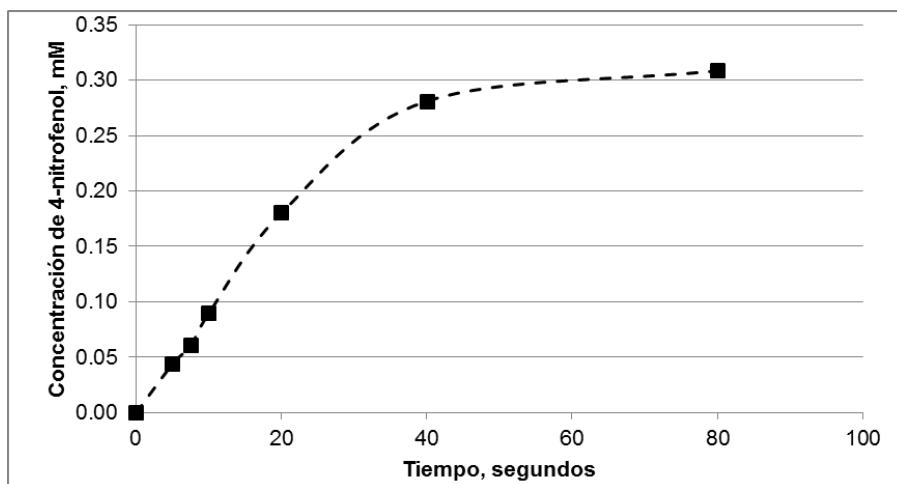
#### **6.4.3. Evaluación del caudal y las dimensiones del reactor en el dispositivo LOC para la reacción enzimática**

En los primeros diseños de microchips que fueron probados con dimensiones de los microcanales de 0.1 mm x 0.1 mm (ancho x alto) y longitud del serpenteo para la reacción enzimática de 5, 8 y 11 cm (diseños FMHM-231014, FMHM-241014, FMHM-251014, respectivamente), la reacción no se presentaba o la concentración del producto era muy baja y se veía un pico pequeño (menor a 0.03 UA). Para el siguiente diseño, FMHM-041114, se incrementó el ancho y longitud de los microcanales, aumentando así el tiempo de residencia, y por lo tanto, el tiempo de la reacción. Para tal diseño se obtuvieron picos con altura superior a 0.1 UA. Los estudios se realizaron con flujo continuo en todas las bombas a temperatura de 40 °C. Las condiciones de la configuración de la figura 5.12 se presentan en la metodología, sección 5.9.2.

En los estudios cinéticos de las enzimas se recomienda determinar la  $V_0$  cuando el avance de la reacción ha sido del 10%, o menos, la región lineal de la curva del progreso de la reacción enzimática [13,18,93]. Para el diseño FMHM-041114, variando el caudal de las bombas (2.5-40  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) se obtuvo la gráfica 6.10, en la cual se muestra el seguimiento de la reacción enzimática durante 5 a 80 segundos, aproximadamente, donde se observó que hasta los 25 segundos la relación entre el tiempo y el producto fue lineal. De este estudio se estableció que la velocidad inicial debía de determinarse a 20 segundos de haber comenzado la reacción.

El caudal y las dimensiones de los microcanales están directamente relacionados con el tiempo de residencia de la enzima y el sustrato en el microchip, ambos parámetros se ajustaron de tal manera que se mantuvieran 20 segundos en el reactor. Se fijó el caudal a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  y el volumen del reactor a alrededor de 4  $\mu\text{L}$ ,

obteniendo el diseño FMHM-250615 (ancho de 0.2 mm, alto de 0.1 mm y longitud del canal de 18.3 cm).



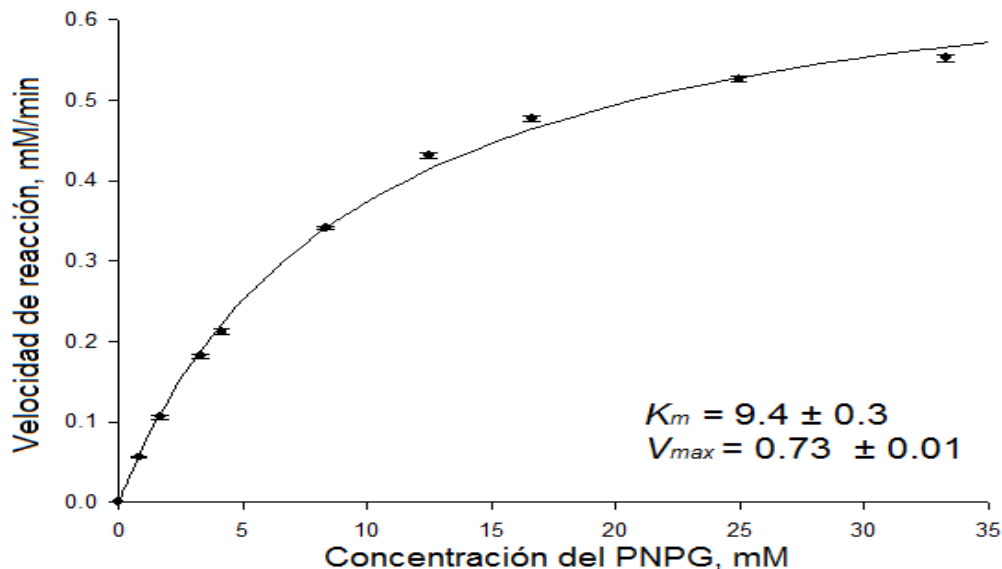
Gráfica 6.10. Curva de progreso de la reacción enzimática entre la  $\beta$ -glucosidasa y el PNPG. Concentración del producto de la reacción contra el tiempo. Hasta los primeros 20 segundos, aproximadamente, la relación entre el tiempo y la concentración del p-nitrofenol es lineal. El estudio se llevó a cabo con la configuración de la figura 6.7 y el diseño del microchip FMHM-041114.

### 6.5. Evaluación de la actividad de la enzima $\beta$ -glu libre en un dispositivo Lab-On-Chip

La evaluación se realizó en un intervalo de concentración del PNPG de 0.8-33.3 mM (inyecciones de 1.5  $\mu$ L), se obtuvo la gráfica 6.11, donde se graficó la  $V_0$  vs la C de PNPG. Se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_m$  por medio del programa estadístico Sigmaplot versión 12.3 (el cálculo de la  $k_{cat}$  se presenta en el anexo D), los cuales se reportan en la tabla 6.13, además se anexan los parámetros reportados en diferentes referencias bibliográficas que provienen de la evaluación de la enzima  $\beta$ -glu comercial utilizando al PNPG como sustrato. En la mayoría de los estudios, este par enzima-sustrato se utiliza para comparar a la  $\beta$ -glu proveniente de otras matrices (animal, vegetal, etc.).

En la gráfica 6.11 se observan las diferentes etapas de la cinética enzimática descrita en el marco teórico, donde en el intervalo de 0.8-3.3 mM de PNPG hay una cinética de primer orden, a partir de la concentración de 3.3 mM se encuentra la región mixta, por último la cinética de orden cero no es claramente visible, aunque

a una concentración de 25 mM del PNPG la variación de la velocidad es relativamente baja respecto con el incremento de la concentración del sustrato (PNPG).



Gráfica 6.11. Cinética para la reacción enzimática de la  $\beta$ -glu libre utilizando PNPG como sustrato, en un dispositivo LOC (FMHM-250615), a temperatura de 45 °C, solución de fosfatos 0.01 M y pH de 5.0, concentración de enzima de 0.03 UE/mL. Velocidad de reacción vs C de PNPG.

Como se ve en la tabla 6.13, los parámetros cinéticos difieren en todos los casos, y por lo tanto, no fue posible realizar el comparativo entre ellos, aun cuando se utilizó la enzima de la misma procedencia (almendras) y el mismo sustrato (PNPG), debido a que se modifican las condiciones como la composición de los medios de reacción, adición de activadores o inhibidores, pH, temperatura, técnicas de análisis (todos los casos referenciados se analizaron en lote, a macroescala y con cuantificación espectrofotométrica), así como los métodos para calcular los parámetros cinéticos, en su mayoría el método de Lineweaver-Burk, etc. Sin embargo, se puede destacar que las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración de soluciones amortiguadoras referenciadas son semejantes a las determinadas en este trabajo. La concentración de las soluciones amortiguadoras están, en su mayoría, entre 0.01-0.05 M, por otra parte la temperatura óptima va desde 37-50 °C, salvo dos casos donde fue de 25 °C. Los pH's más adecuados rondaron entre 4.0 y 6.8, aunque la mayoría de las determinaciones se realizaron a pH de 5.0.

En diversas referencias se ha evaluado la actividad de la enzima  $\beta$ -glu en dispositivos LOC, en su forma libre, un caso específico es el microchip desarrollado por Kwapiszewski et. al. [94], el cual tiene una aplicación clínica en el diagnóstico de la enfermedad de Gaucher, y que resalta por las semejanzas con el dispositivo desarrollado en este trabajo como: ambos son de PDMS; se hace la detección espectrofotométrica “in situ” por medio de fibras ópticas; el reactor tiene forma de serpentín; utiliza bombas de jeringas con caudales parecidos. Por otra parte, se diferencian en que no posee un sistema de calentamiento, su límite de detección es mayor, aun cuando su detector es de fluorescencia, debido a que el paso óptico es 10 veces menor.

Otro ejemplo fue el dispositivo elaborado por Arayanarakool et. al. [95], donde se evalúa la actividad por medio de la técnica de microgotas con detección por fluorescencia, esta técnica se usa cuando se quiere aislar la reacción para evitar la interacción de los reactivos con la superficie de los microcanales, difusión, así como la contaminación cruzada y evaporación de los solventes, además se pueden hacer secuencias de análisis en microgotas en lapsos cortos. Sin embargo, para generar las microgotas se requiere trabajar con dos solventes, uno polar y otro no polar, lo cual representa una desventaja, ya que el PDMS se hincha con los solventes no polares, afectando los resultados y la vida útil del microchip. Los análisis en flujo continuo son más fáciles de implementar que los de microgotas y aprovechan las cualidades del flujo laminar (generación de gradientes de concentración precisos) [96,97].

Se han acoplado microdispositivos a la electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrómetros de masas, etc., para estudiar la cinética de enzimas en general, sin embargo estas técnicas requieren de equipos costosos, para lo cual los espectrofotómetros representan una alternativa asequible. Stege et. al. [98] hicieron el estudio cinético de la  $\beta$ -glu, para evaluar la calidad de los suelos, por medio de la electroforesis capilar. Incluso se han propuesto técnicas en agar glicerol-esculina, donde se mide el halo formado por la degradación de la esculina vía  $\beta$ -glu [99].

Tabla 6.13. Comparativo de parámetros cinéticos de diferentes estudios, empleando la enzima  $\beta$ -glu pura obtenida de almendras, PNPg como sustrato, en medio acuoso.

Técnica	Medio	pH óptimo	T óptima, °C	$K_m$ , mM	$V_{max}$ , mM/min	$k_{cat}$ , min <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , mM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>	Método para calcular parámetros cinéticos	Ref.
LOC, FIA	Solución de fosfatos 0.01 M	5.0	45	9.4	0.7	6538.5	693.5	Programa Sigmaplot	Actual
Lote	Amortiguador de fosfatos 0.05 M	6.8	37	7.7	NR	NR	NR	Lineweaver-burk	[100]
Lote	Amortiguador de fosfatos	5.0	50	0.9	NR	NR	NR	Lineweaver-Burk	[101]
Lote	Amortiguador MES 0.01 con cloruro de sodio 0.01 M	6.3	25	2.5	NR	4260	1704	Henri-Michaelis-Menten	[102]
Lote	Amortiguador citrato-fosfato 0.02 M	4.8	25	5.9	0.0135	NR	NR	Lineweaver-burk	[103]
Lote	Amortiguador de fosfatos 0.2 M	5.0	40	2.2	NR	7200	3120	Lineweaver-Burk	[104]
Lote	Amortiguador de fosfato	4.0	40	0.2	0.017	NR	NR	Lineweaver-Burk	[87]

T: temperatura

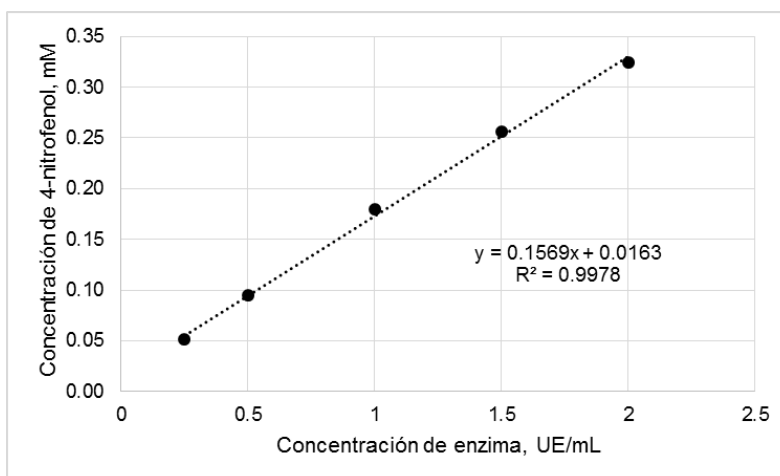
NR: no reportado

## 6.6. Estimación de la cantidad de la enzima inmovilizada en un dispositivo

### LOC

Se realizó una curva de concentración mM del PN (producto de la reacción) contra la concentración de la enzima  $\beta$ -glu libre (intervalo de 0.25-2.00 UE/mL), gráfica 6.12, con la finalidad de estimar el equivalente de la cantidad de la enzima inmovilizada, teniendo en consideración que la actividad de la enzima inmovilizada varía con respecto a la enzima libre. Al inyectar una solución de PNPG a concentración de 0.33 mM en el microchip con la enzima inmovilizada se obtuvo una señal de 0.119 mM de PN, al interpolarla en la curva de la  $\beta$ -glu libre, dando una concentración de la enzima inmovilizada equivalente a 0.654 UE/mL (0.327 mg de  $\beta$ -glu/mL) de la enzima libre, con este valor se realizó el cálculo de la  $k_{cat}$  para la enzima inmovilizada.

Tomando en cuenta que el volumen y el área superficial del reactor fueron de aproximadamente 4.1  $\mu$ L y 1.15 cm<sup>2</sup>, respectivamente, se obtuvo que la cantidad de enzima inmovilizada fue de aproximadamente 1.17  $\mu$ g de  $\beta$ -glu/cm<sup>2</sup>.



Gráfica 6.12. Curva de la  $\beta$ -glu libre en un dispositivo LOC (FMHM-250615), concentración del PN generado vs la concentración de la enzima.

Se demostró la linealidad en el intervalo de 0.25-2.00 UE/mL de la enzima libre, a través del análisis estadístico en el software Statgraphics Centurion XVI, los coeficientes de la regresión y análisis de varianza se presentan en las tablas 6.14 y 6.15, respectivamente. Con  $r$  de 0.999 y  $r^2$  de 0.998.

Tabla 6.14. Coeficientes de la regresión lineal, curva de la enzima en un dispositivo LOC (FMHM-250615), intervalo de concentración de la enzima libre de 0.25-2.00 UE/mL, estudio realizado por triplicado.

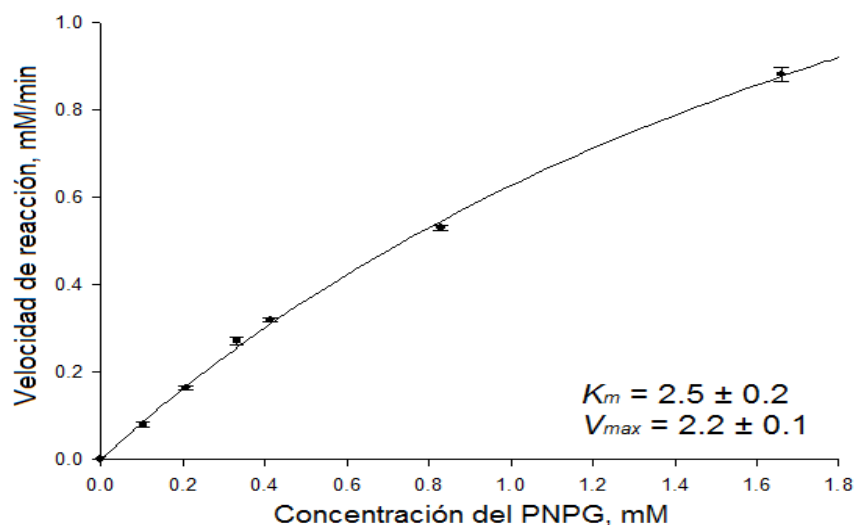
	Mínimos Cuadrados	D.E.	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.0163138	0.00269673	6.04948	0.0000
Pendiente	0.156914	0.00219276	71.5601	0.0000

Tabla 6.15. Análisis de varianza, curva de la enzima en un dispositivo LOC (FMHM-250615), intervalo de concentración de la enzima libre de 0.25-2.00 UE/mL, estudio realizado por triplicado.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.151425	1	0.151425	5120.85	0.0000
Residuo	0.000384414	13	0.0000295703		
Total (Corr.)	0.151809	14			

### 6.7. Evaluación de la actividad de la enzima $\beta$ -glucosidasa inmovilizada en un dispositivo LOC

El intervalo de la concentración del PNPG para la evaluación de la actividad de la enzima inmovilizada fue de 0.1-1.7 mM, al igual que para la enzima libre, se graficó la  $V_0$  vs la concentración del PNPG, gráfica 6.13, y se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_m$  (se utilizó la estimación de la enzima inmovilizada para el cálculo de la  $k_{cat}$ , el cálculo se muestra en el anexo D).



Gráfica 6.13. Cinética para la reacción enzimática de la  $\beta$ -glu inmovilizada utilizando al PNPG como sustrato, en un dispositivo LOC (FMHM-250615), temperatura de 45 °C, SF 0.01 M y pH de 5.0.

A diferencia de la gráfica 6.11 (cinética para la reacción enzimática de la  $\beta$ -glu libre), en la gráfica 6.13 no se observa claramente la evolución de la cinética de primer orden a la mixta, debido a que la cantidad de enzima inmovilizada es alta y las concentraciones del PNPG para llegar a la cinética de orden cero dan señales por encima del intervalo lineal del método para cuantificar al PN, aun así, es posible calcular los parámetros cinéticos ya que el orden de la reacción no es de primer orden para todo el intervalo de concentración evaluado. Dichos parámetros se reportan en la tabla 6.16.

En la tabla 6.16 se realizó el comparativo con otros trabajos encontrados en referencias bibliográficas, en cuanto a la actividad de la enzima inmovilizada, tipos de soportes, estabilidad, así como las condiciones óptimas del análisis. Aun cuando en los estudios referenciados se utilizó enzima de la misma procedencia (almendras) y el mismo sustrato (PNPG), resultó casi imposible hacer un comparativo en los parámetros cinéticos ya que se llevaron a cabo a macroescala, los métodos de determinación de dichos parámetros no fueron iguales, las condiciones de trabajo variaron mucho. Además los soportes para la enzima tienen características muy diferentes, así como el proceso y mecanismo de inmovilización, esto afecta de manera distinta a la estructura y al sitio activo de la enzima, por ejemplo, es sabido que la inmovilización incrementa la estabilidad térmica de la enzima y en ciertas ocasiones también incrementa la temperatura óptima de la misma. Los parámetros reportados en la tabla 6.16, para diferentes trabajos, muestran que la temperatura óptima fue cercana a 60 °C, sin embargo, en el presente estudio no hubo modificación de dicho parámetro, respecto a la forma libre. También se observó que las enzimas inmovilizadas son relativamente estables a lo largo de 30 días o más, en un caso llegó a mantener el 100 % de su actividad inicial.



Tabla 6.16. Comparativo de parámetros cinéticos y materiales de soporte para inmovilización de la enzima  $\beta$ -glu, utilizando PNPG como sustrato, en medio acuoso.

Técnica	Medio de reacción	Material de soporte	pH óptimo	T óptima, °C	$K_m$ , mM	$V_{max}$ , mM/min	$k_{cat}$ , min <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , mM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>	Estabilidad	Método para calcular parámetros cinéticos	Ref.
LOC, FIA	Solución de fosfatos 0.01 M	PDMS, unión covalente	5.0	45	2.5	2.2	908.3	363.3	69 % después de 30 días	Programa Sigmaplot	Actual
Lote	Amortiguador de citratos y fosfatos 0.02 M	Espuma de sílice nanoporosa, unión covalente	6.5	60 [106]	8.2 [103]	0.012	NR	NR	100 % después de 60 días	Lineweaver-Burk	[103]
Lote	Amortiguador universal modificado	Partículas coloidales de suelo, adsorción	6.0	57	9.35	0.215	NR	NR	NR	Eadie-Hofstee	[105]
Lote	Amortiguador de citratos y fosfatos 0.1 M	Arcilla de esmectita	5.5	60	1.9	$1.5 \times 10^{-3}$	NR	NR	61.8 % en 60 días	Programa Enzfitter	[106]

T: temperatura

NR: no reportado

Dependiendo del tipo de material del microchip, las características de la enzima, la aplicación, etc. se han desarrollado diferentes técnicas para la inmovilización. De manera general la inmovilización de enzimas se clasifican en unión a un soporte (física, iónica y covalente), atrapamiento o encapsulamiento y entrecruzamiento [107].

Los microreactores se pueden clasificar en dos tipos: microreactores tipo chip y dispositivos microcapilares. Los primeros poseen la ventaja de que se pueden controlar mejor los microfluidos y se pueden integrar diferentes procesos dentro del microdispositivo [108,109]. La inmovilización de la enzima en la superficie de los microcanales ha resultado de alto interés debido a que se aprovecha su extensa área superficial sin que se eleve la presión del sistema de manera considerable, a comparación de la inmovilización en microgránulos.

El PDMS representa una buena alternativa para inmovilización de enzimas, debido a la posibilidad de adicionar grupos funcionales a través de la técnica de silanización, además de que es biocompatible [108].

Ueno et. al. [110] inmovilizaron a la  $\beta$ -glu en los microreactores (pocillos independientes) de un microchip de PDMS a través de APTES, evaluaron su actividad en lote, dando seguimiento a la reacción por medio de fluorescencia, individualmente para cada pocillo, ofreciendo una alternativa para el monitoreo de la actividad de la enzima, sin embargo, tiene deficiencias como la alta variación en los volúmenes de reactivos y dimensiones de los microcanales.

No se encontraron referencias de análisis en flujo continuo para un microreactor con  $\beta$ -glu inmovilizada, sin embargo, se han estudiado ampliamente a las enzimas como la glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina [109], por ejemplo, Seong et. al. [111] determinaron la actividad enzimática en flujo continuo de la peroxidasa inmovilizada en la superficie de microgránulos (vía estreptavidina) en un microreactor de PDMS tipo chip, ofreciendo un método rápido y confiable para el diagnóstico clínico, monitoreo, etc.

## 6.8. Comparativo de los parámetros cinéticos entre la enzima libre e inmovilizada

Las condiciones óptimas de pH, temperatura y fuerza iónica del medio con las que se trabajaron durante la evaluación de la actividad enzimática fueron las mismas para ambos tipos de enzima lo cual permite una comparación más precisa.

La  $K_m$  para la enzima libre es muy superior a la de la enzima inmovilizada, podría considerarse que la  $\beta$ -glu inmovilizada tiene mayor afinidad por el sustrato que la libre, sin embargo este resultado se dio de esa manera debido a la diferencia en la relación de la enzima/sustrato entre ambas evaluaciones (para la enzima libre se intentó observar la meseta para la velocidad inicial bajando la concentración de la  $\beta$ -glu, y para el otro caso solo se realizó el estudio a alta concentración de enzima inmovilizada, aunque se podría controlar variando la concentración de la solución enzimática o reduciendo el tiempo de la inmovilización), por lo tanto, no es conveniente realizar la comparación con dicho parámetro, así mismo con la  $V_{max}$ .

Para realizar el comparativo de la actividad enzimática se recurrió a la relación de la  $k_{cat}/K_m$ , donde, a mayor valor de dicha relación, la eficiencia catalítica se incrementa, en la tabla 6.17 se observa que la enzima libre es más eficiente que la inmovilizada para reaccionar con el PNPG en las condiciones establecidas, aproximadamente el doble de la eficiencia catalítica. Estos resultados se podrían explicar debido a diferentes efectos que provoca la inmovilización en las enzimas, por ejemplo, la formación del complejo ES requiere de cierta flexibilidad por parte de la enzima, que se ve disminuida después de la inmovilización, por otra parte la accesibilidad del sustrato a los sitios activos también se ve reducida, debido a la interacción de estos con los grupos funcionales del soporte.

Tabla 6.17. Comparativo de los parámetros cinéticos entre la enzima  $\beta$ -glu libre y la inmovilizada, en la configuración de la figura 6.7 con el diseño del microchip FMHM-250615 y las condiciones de la tabla 5.15, empleando al PNPG como sustrato, el estudio se realizó por triplicado para cada tipo de enzima.

Parámetro	Enzima libre	Enzima inmovilizada
$K_m$ , Mm	$9.4 \pm 0.3$	$2.5 \pm 0.2$
$V_{max}$ , mM/min	$0.73 \pm 0.01$	$2.2 \pm 0.1$
$k_{cat}$ , $\text{min}^{-1}$	$6538.5 \pm 90$	$908.3 \pm 41.3$
$k_{cat}/K_m$ , $\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$	$693.5 \pm 31.7$	$363.3 \pm 45.6$

Las aplicaciones de las reacciones enzimáticas (en forma libre e inmovilizada) en los dispositivos LOC son diversas y se puede destacar su uso en diagnóstico clínico, biosensores, síntesis y análisis de especies químicas, mapeo de péptidos y proteínas, análisis de ácidos nucleicos y caracterización cinética [112,113].

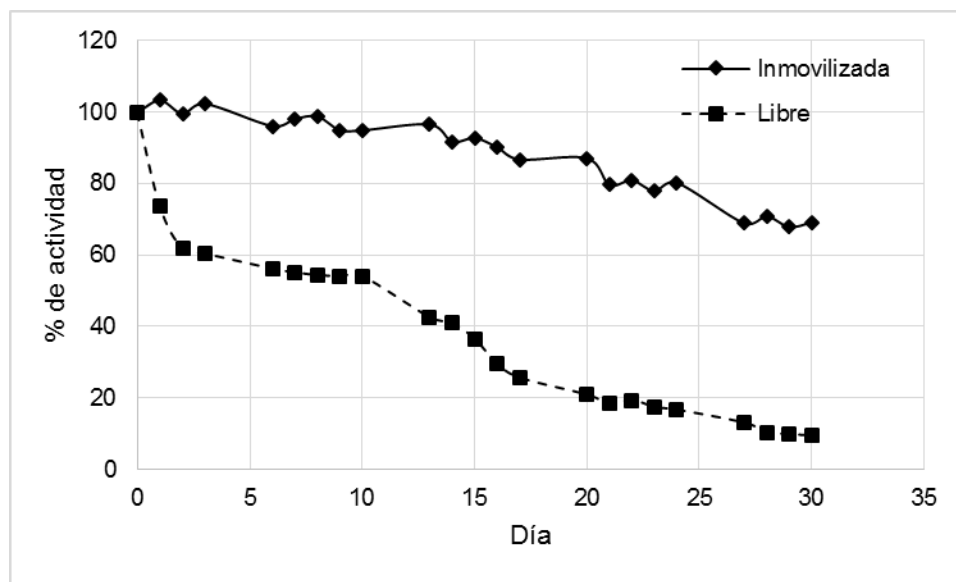
Las condiciones en los microreactores son más cercanas a los procesos biológicos que los reactores convencionales, debido al espacio limitado y flujo laminar. Por otro lado, llevar a cabo un estudio cinético a microescala ayuda a estimar el comportamiento de la enzima y facilitar el escalamiento de los procesos industriales [108].

La inmovilización presenta ventajas sobre el uso de la enzima en solución y basados en microgotas como el incremento de su estabilidad y posibilidad de reutilizar el microreactor, llevar a cabo la reacción reteniendo la enzima, aunque como desventaja se debe destacar que regularmente su actividad disminuye.

### 6.9. Estabilidad de la enzima $\beta$ -glu libre e inmovilizada

Se realizó el seguimiento de la estabilidad de la  $\beta$ -glu libre e inmovilizada en un periodo de 30 días, representado en la gráfica 6.14, donde se puede observar que la enzima inmovilizada es más estable que la enzima libre.

La enzima inmovilizada mantiene el 95 % de su actividad inicial hasta el día 10, para el día 15 aún tiene 90 %, al llegar al día 30 conserva el 69 % de su actividad. Por otra parte la enzima libre (0.5 UE/mL) rápidamente pierde su actividad, durante los primeros 2 días llega hasta el 86 % de su actividad inicial, al 7° día baja hasta tener 55 %, 10 días después, día 17, solo cuenta con el 25 %, y para el final del monitoreo, día 30, solo tiene 9 % de su actividad inicial. Por esta razón se debieron preparar las soluciones enzimáticas el mismo día que se utilizarían y así evitar problemas de estabilidad.



Gráfica 6.14. Seguimiento de la actividad de la enzima  $\beta$ -glu libre e inmovilizada a lo largo de 30 días.

## 7. Conclusiones

Las técnicas de fotolitografía y litografía suave representaron una forma rápida y sencilla para fabricar prototipos de microchips de PDMS (material compatible con los métodos bioanalíticos debido a que no es tóxico y su estabilidad química y mecánica), además, una vez que se tuvo el diseño final en un micromolde, éste utilizó para hacer réplicas de microchips en múltiples ocasiones, más de 20 réplicas, suficientes para llevar a cabo este estudio.

Se logró desarrollar y validar un método para la cuantificación espectrofotométrica del PN (producto de la reacción enzimática) en un dispositivo LOC, el cual demostró ser repetible, preciso robusto y sensible, con un intervalo lineal de concentración de 17-500  $\mu\text{M}$ .

La extensa distribución en la naturaleza y el actual interés de la industria, biotecnología, etc. en la enzima  $\beta$ -glu hace necesario el control de calidad o evaluación de su actividad por métodos sencillos, rápidos, confiables y económicos. Para lo cual se logró montar una configuración para la evaluación de dicha enzima, formada con bombas de jeringa, un sistema de calentamiento con vapor, un microchip donde se lleva a cabo la reacción enzimática y detección espectrofotométrica "in situ" del PN por medio de la inserción de fibras ópticas en el dispositivo.

Fue posible la inmovilización covalente de la  $\beta$ -glucosidasa en un soporte de PDMS, siendo más estable la enzima inmovilizada (69 % de la actividad inicial a los 30 días) que la enzima en forma libre (9 % de la actividad inicial a los 30 días), a través de un método unificado, basado en diversas referencias bibliográficas (ver sección 5.5 de la metodología), el cual representa una alternativa a los métodos reportados actualmente.

Se determinaron las condiciones óptimas para la reacción enzimática de la  $\beta$ -glu en los dispositivos LOC, utilizando al PNPG como sustrato. Se encontraron las mismas condiciones para la enzima libre y para la inmovilizada en la superficie del PDMS (temperatura de 45 °C; pH y fuerza iónica del medio de reacción de 5.0 y 0.01 M, respectivamente).

Se lograron determinar los parámetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_m$ ) de la enzima  $\beta$ -glu, ya fuera en forma libre o inmovilizada, en los dispositivos LOC de manera sencilla, rápida, sensible, etc. Así, se observó que la enzima libre tiene una actividad superior a aquella inmovilizada, aunque menos duradera.

La cantidad de residuos producida por los análisis en los dispositivos LOC es reducida, por ejemplo, durante el presente trabajo, 1 año de investigación, se generó alrededor de un litro residuos (alrededor de 8000 inyecciones).

Se fabricó una cámara de calentamiento con vapor, la cual demostró ser la opción más adecuada de acuerdo con los recursos disponibles para llevar a cabo esta investigación, y que se proyecta como una alternativa a los métodos de calentamiento de dispositivos Lab-On-Chip reportados en la literatura.

## 8. Perspectivas

Con el dispositivo Lab-On-Chip, la configuración y la investigación en general del presente trabajo se establecieron las bases para llevar a cabo estudios de actividad de enzimas que utilicen como sustrato al PNPG u otros que presenten absorbancia en la región UV-visible, haciendo los ajustes pertinentes en las dimensiones de los reactores.

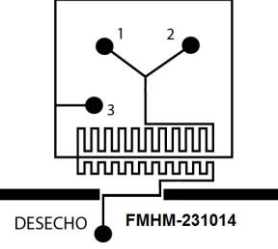
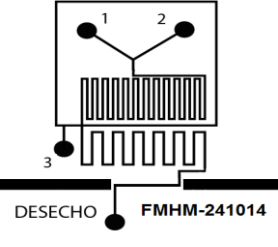
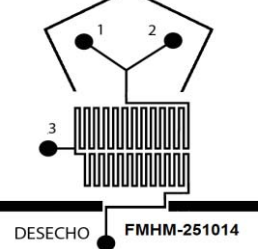
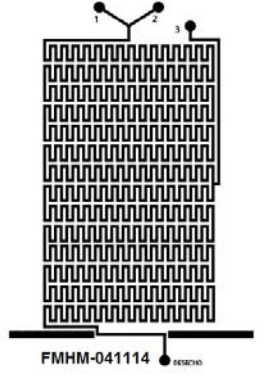
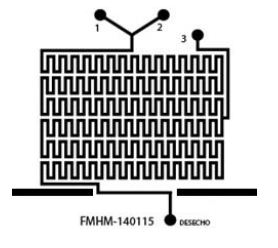
Siguiendo esta línea de investigación se puede profundizar en el estudio de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, por ejemplo, estudiando a los inhibidores de la reacción enzimática, interferentes en la cuantificación, etc.

Por otra parte, se podrían hacer mejoras a los diseños de los microchips presentados en este estudio, adicionando reactores para la purificación de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, extrayéndola de diferentes matrices como el vino, jugo, té, suelo, sangre, etc.

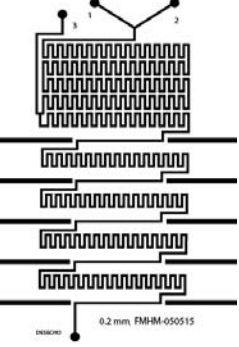
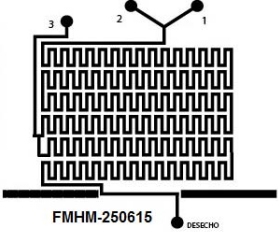
Aun cuando la configuración del presente estudio (bombas, sistema de calentamiento, lámpara, detector, etc) ocupa una superficie menor de 0.5 m<sup>2</sup>, resultaría difícil realizar pruebas de campo con ella. Sin embargo, los avances tecnológicos permitirían fabricar una versión portátil de dicha configuración.

## 9. Anexos

### Anexo A. Descripción de los diseños de microchips probados para la evaluación de la actividad de la enzima $\beta$ -glu

	<p><b>Diseño:</b> FMHM-231014</p> <p><b>Longitud del serpentín para la reacción enzimática:</b> 5.0 cm</p> <p><b>Longitud del serpentín para el ajuste del pH:</b> 2.5 cm</p> <p><b>Ancho del microcanal:</b> 100 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Altura del microcanal:</b> 100 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Observaciones:</b> utilizado en las pruebas preliminares</p>
	<p><b>Diseño:</b> FMHM-241014</p> <p><b>Longitud del serpentín para la reacción enzimática:</b> 8.0 cm</p> <p><b>Longitud del serpentín para el ajuste del pH:</b> 3.0 cm</p> <p><b>Ancho del microcanal:</b> 100 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Altura del microcanal:</b> 100 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Observaciones:</b> utilizado en las pruebas preliminares</p>
	<p><b>Diseño:</b> FMHM-251014</p> <p><b>Longitud del serpentín para la reacción enzimática:</b> 11.0 cm</p> <p><b>Longitud del serpentín para el ajuste del pH:</b> 7.3 cm</p> <p><b>Ancho del microcanal:</b> 100 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Altura del microcanal:</b> 100 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Observaciones:</b> utilizado en las pruebas preliminares</p>
	<p><b>Diseño:</b> FMHM-041114</p> <p><b>Longitud del serpentín para la reacción enzimática:</b> 32.0 cm</p> <p><b>Longitud del serpentín para el ajuste del pH:</b> 32.0 cm</p> <p><b>Ancho del microcanal:</b> 200 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Altura del microcanal:</b> 100 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Observaciones:</b> utilizado en las pruebas preliminares</p>
	<p><b>Diseño:</b> FMHM-140115</p> <p><b>Longitud del serpentín para la reacción enzimática:</b> 13.7 cm</p> <p><b>Longitud del serpentín para el ajuste del pH:</b> 13.7 cm</p> <p><b>Ancho del microcanal:</b> 200 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Altura del microcanal:</b> 100 <math>\mu</math>m</p> <p><b>Observaciones:</b> utilizado en las pruebas preliminares</p>



	<p><b>Diseño:</b> FMHM-050515</p> <p><b>Longitud del serpentín para la reacción enzimática:</b> 18.3 cm</p> <p><b>Longitud del serpentín para el ajuste del pH:</b> 4.5, 9.0, 13.5, 18.0 y 22.5 cm</p> <p><b>Ancho del microcanal:</b> 200 <math>\mu\text{m}</math></p> <p><b>Altura del microcanal:</b> 100 <math>\mu\text{m}</math></p> <p><b>Observaciones:</b> utilizado para optimizar la cuantificación del PN</p>
	<p><b>Diseño:</b> FMHM-250615</p> <p><b>Longitud del serpentín para la reacción enzimática:</b> 18.3 cm</p> <p><b>Longitud del serpentín para el ajuste del pH:</b> 9.0 cm</p> <p><b>Ancho del microcanal:</b> 200 <math>\mu\text{m}</math></p> <p><b>Altura del microcanal:</b> 100 <math>\mu\text{m}</math></p> <p><b>Observaciones:</b> utilizado para la evaluación de la actividad de la enzima <math>\beta</math>-glu libre e inmovilizada</p>

## Anexo B. Cálculo de la longitud de los microcanales para la difusión del p-nitrofenol en agua destilada

Fórmulas para el cálculo de la distancia para lograr la difusión axial completa [114]

$$t = \frac{x^2}{2D}$$

$$t = \frac{d \cdot A}{Q}$$

$$d = \frac{Q \cdot x^2}{A \cdot 2D}$$

Donde:

t: tiempo para lograr la difusión de un soluto, s

d: longitud del microcanal para lograr la difusión completa, cm

Q: caudal, cm<sup>3</sup>/s (el caudal en el reactor para el ajuste del pH es de 20 μL/min = 3.333 · 10<sup>-4</sup> cm<sup>3</sup>/s)

x: ancho del microcanal, cm (dimensión del microcanal en el diseño FMHM-250615 es de 200 μm = 0.02 cm)

A: área del microcanal, cm<sup>2</sup> (dimensión del microcanal en el diseño FMHM-250615 es de 200 μm · 100 μm = 20000 μm<sup>2</sup> = 2 · 10<sup>-4</sup> cm<sup>2</sup>)

D: coeficiente de difusión, cm<sup>2</sup>/s (para el PN en agua destilada 9.05 · 10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>/s) [115]

$$d = \frac{(3.333 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{s}) \cdot ((0.02 \text{ cm})^2)}{(2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2) \cdot 2 \cdot (9.05 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s})} = 36.8 \text{ cm}$$

### Anexo C. Cálculo del número de Reynolds en el dispositivo Lab-On-Chip

El número de Reynolds se obtiene matemáticamente mediante la ecuación:

$$Re = \frac{\rho VD}{\mu}$$

Para el cálculo se utilizaron los valores de viscosidad y densidad del agua a 20 °C [115] y las dimensiones del microcanal del microchip FMHM-250615, así como un caudal de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Re: número de Reynolds

$\rho$ : densidad del agua a 20 °C = 0.9982 g  $\cdot$  cm<sup>-3</sup>

V: velocidad del fluido = 89.82 cm  $\cdot$  min<sup>-1</sup>

D: diámetro del microcanal = 0.017 cm

$\mu$ : es la viscosidad del agua a 20 °C = 0.06012 g  $\cdot$  cm<sup>-1</sup>  $\cdot$  min<sup>-1</sup>

$$Re = \frac{(0.9982 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}) \cdot (89.82 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}) \cdot (0.017 \text{ cm})}{0.06012 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}} = 25.35$$

Re < 2300 indica flujo laminar y Re > 4000 flujo turbulento. En los microfluidos regularmente se observa flujo laminar [33,37,38].

## Anexo D. Cálculo de los parámetros cinéticos de la actividad de la enzima $\beta$ -glu

### Cálculo de la velocidad de reacción, partiendo de la señal analítica:

$$C \text{ } \mu\text{M de PN} = (UA - 0.0091085) / 0.00228648 \text{ } \mu\text{M}^{-1}$$

$$\text{Velocidad de reacción} = (C \text{ mM de PN}) / (0.333 \text{ min})$$

### Cálculo de los parámetros cinéticos para la enzima libre:

$$k_{cat} = V_{max} / C \text{ mM de la enzima}$$

$k_{cat}$ :  $\text{min}^{-1}$

$V_{max}$ :  $\text{mM}/\text{min}^{-1}$

C de la enzima: mM

C de la solución enzimática = 0.03 UE/mL = 0.015 mg/mL = 15 mg/L

Masa molecular de la  $\beta$ -glucosidasa = 135,000 Da = 135,000 g/mol [24]

$$C \text{ mM de la enzima} = (15 \text{ mg/L}) / (135 \text{ 000 mg/mmol}) = 0.000111 \text{ mM}$$

$$k_{cat} = (0.726 \text{ mM}/\text{min}) / (0.000111 \text{ mM}) = 6538.5 \text{ min}^{-1}$$

### Cálculo de los parámetros cinéticos para la enzima inmovilizada:

$$k_{cat} = V_{max} / C \text{ mM de la enzima}$$

$k_{cat}$ :  $\text{min}^{-1}$

$V_{max}$ :  $\text{mM}/\text{min}^{-1}$

C de la enzima: mM

C estimada de la enzima inmovilizada = 0.654 UE/mL = 0.327 mg/mL = 327 mg/L

Masa molecular de  $\beta$ -glu = 135,000 Da = 135,000 g/mol

$$C \text{ mM estimada de la enzima} = (327 \text{ mg/L}) / (135 \text{ 000 mg/mmol}) = 0.0024 \text{ mM}$$

$$k_{cat} = (2.18 \text{ mM}/\text{min}) / (0.0024 \text{ mM}) = 908.3 \text{ min}^{-1}$$

## Bibliografía

1. Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour Technol.* 2013;127:500–7.
2. Ketudat Cairns JR, Esen A.  $\beta$ -Glucosidases. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(20):3389–405.
3. Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS. Microbial  $\beta$ -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2002;22(4):375–407.
4. Singh G, Verma AK, Kumar V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. *3 Biotech.* 2016;6(1):3.
5. Palmeri R, Spagna G.  $\beta$ -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(3):382–9.
6. Sarry JE, Günata Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.* 2004;87(4):509–21.
7. Reuveni M, Sagi Z, Eynor D, Hetzroni A.  $\beta$ -Glucosidase activity is involved in scent production in Narcissus flowers. *Plant Sci.* 1999;147(1):19–24.
8. Maicas S, Mateo JJ. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;67(3):322–35.
9. Herold K, Rasooly A. *Lab on a Chip Technology, Fabrication and Microfluidics.* Norfolk: Caister Academic Press; 2009. 403 p.
10. Mark D, Haeberle S, Roth G, von Stetten F, Zengerle R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem Soc Rev.* 2010;39(3):1153–82.
11. Erickson D, Li DQ. Integrated microfluidic devices. *Anal Chim Acta.* 2004;507(1):11–26.
12. Voet D, Voet J, Pratt C. *Fundamentos de Bioquímica, la vida a nivel molecular.* 2da edición. México, D.F.: Editorial Panamericana; 2007. 1264 p.
13. Nelson D, Cox M. *Lehninger, Principios de Bioquímica.* 5ta edición. Barcelona: Ediciones Omega; 2009. 1158 p.

14. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Biochemistry. 5ta edición. New York: W. H. Freeman; 2002. 1050 p.
15. Teijón J. Bioquímica estructural: conceptos y tests. Madrid: Tébar; 2009. 444 p.
16. Brown J. XXXVI.-Enzyme action. J. Chem. Soc., Trans. 1902;81:373–88.
17. Skoog D, West D, Holler J, Crouch S. Fundamentos de química analítica. 9na edición. México, D.F.: Cengage Learning; 2015. 225 p.
18. Brooks HB, Geeganage S, Kahl SD, Montrose C, Sittampalam S, Smith MC, et al. Basics of Enzymatic Assays for HTS. Assay Guid Man. 2012;3–4.
19. Ferrier D. Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry. 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2014. 522 p.
20. Chang R. Fisicoquímica para las ciencias químicas y biológicas. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2008. 1018 p.
21. Ritchie R, Prvan T. Current statistical methods for estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten kinetics. Biochem Educ. 1996;24(4):196–206.
22. Gilbert H. Basic concepts in biochemistry a student's survival guide. 2nd edition. New York. New York: McGraw-Hill; 2000. 286 p.
23. Morant AV, Jørgensen K, Jørgensen C, Paquette SM, Sánchez R, Møller BL, et al.  $\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. Phytochemistry. 2008;69(9):1795–813.
24. Grover A, Macmurchie D, Cushley R. Studies on almond emulsin  $\beta$ -D-glucosidase, Isolation and characterization of a bifunctional isozyme. Biochim. Biophys. Acta. 1977;28:221–8.
25. He S, Withers SG. Assignment of sweet almond  $\beta$ -glucosidase as a family 1 glycosidase and identification of its active site nucleophile. J Biol Chem. 1997;272(40):24864–7.
26. Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure. 1995;3(9):853–9.
27. Barrett T, Suresh CG, Tolley SP, Dodson EJ, Hughes M a. The crystal structure of a cyanogenic beta-glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. Structure. 1995;3:951–60.

28. Dvir H, Harel M, McCarthy A a, Toker L, Silman I, Futerman AH, et al. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep.* 2003;4(7):704–9.
29. Shukla A. *Elements of enzymology.* New Delhi: Discovery Publishing House; 2009. 333 p.
30. Rainey F, Oren A. *Taxonomy of prokaryotes. Methods of microbiology.* San Diego: Academic Press; 2011. 464 p.
31. Berthier E, Young EWK, Beebe D. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab Chip.* 2012;12(7):1224.
32. Bontoux N, Dauphinot L, Potier MC. *Unravelling single cell genomics, micro and nanotools.* Cambridge: Royal Chemical Society; 2010. 318 p.
33. Beebe DJ, Mensing G a, Walker GM. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:261–86.
34. Lim YC, Kouzani AZ, Duan W. Lab-on-a-chip: A component view. *Microsyst Technol.* 2010;16(12):1995–2015.
35. Nahavandi S, Baratchi S, Soffe R, Tang SY, Nahavandi S, Mitchell A, et al. Microfluidic platforms for biomarker analysis. *Lab Chip.* 2014;14(9):1496–514.
36. Mullin T. Experimental Studies of Transition to Turbulence in a Pipe. *Annu Rev Fluid Mech.* 2011;43:1–24.
37. Bayraktar T, Pidugu SB. Characterization of liquid flows in microfluidic systems. *Int J Heat Mass Transf.* 2006;49(5-6):815–24.
38. Ho C, Tai Y. Micro-electro-mechanical-systems (Mems) and fluid flows. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 1998;30:579–612.
39. Liu RH, Stremler MA, Sharp KV, Olsen MG, Santiago JG, Adrian RJ, et al. Passive mixing in a three-dimensional serpentine microchannel. *J Microelectromechanical Syst.* 2000;9(2):190–7.
40. Hsiao KY, Wu CY, Huang YT. Fluid mixing in a microchannel with longitudinal vortex generators. *Chem Eng J.* 2014;235:27–36.
41. Hessel V, Löwe H, Schönfeld F. Micromixers - A review on passive and active mixing principles. *Chem Eng Sci.* 2005;60:2479–501.
42. Fainman Y, Lee L, Psaltis D, Yang C. *Optofluidics: fundamentals, devices, and applications.* New York: McGraw-Hill; 2010. 510 p.

43. Fiorini GS, Chiu DT. Disposable microfluidic devices : fabrication, function, and application. 2005;446:429–46.
44. Abgrall P, Gué A. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review. *J Micromechanics Microengineering*. 2007;17:15–49.
45. Castellero J. Acoplamiento de un instrumento HPLC a un microchip de microfluídica para ensayos de inhibición enzimática. UNAM; 2015.
46. Madou M. Fundamentals of microfabrication: the science of miniaturization. 2nd editio. Boca Raton: CRC Press; 2002. 733 p.
47. Lorenz H, Despont M, Fahrni N, LaBianca N, Renaud P, Vettiger P. SU-8: a low-cost negative resist for MEMS. *J Micromechanics Microengineering*. 1999;7(3):121–4.
48. Tam L, Lau D. A molecular dynamics investigation on the cross-linking and physical properties of epoxy-based materials. *RSC Adv*. 2014;4(62):33074-81.
49. Iannone E. Labs on chip: principles, design, and technology. Boca Raton: CRC Press; 2015. 1097 p.
50. Sia SK, Whitesides GM. Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*. 2003;24(21):3563–76.
51. Becker H, Locascio LE. Polymer microfluidic devices. *Talanta*. 2002;56(2):267–87.
52. Li X, Zhou Y. Microfluidic devices for biomedical applications. Philadelphia: Woodhead Publishing; 2013. 633 p.
53. Becker H, Gärtner C. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis*. 2000;21(1):12–26.
54. Cheng S, Wu Z. Microfluidic electronics. *Lab Chip*. 2012;12(16):2782.
55. Patrick T. Introduction to microfluidics. Oxford: Oxford University Press; 2005. 301 p.
56. Kumar C. Microfluidic devices in nanotechnology: applications. New Jersey: Wiley; 2010. 408 p.
57. Barredo J. Microbial enzymes and biotransformations. New Jersey: Humana Press; 2005. 319 p.



58. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 2013;3:1–9.
59. Rusmini F, Zhong Z, Feijen J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*. 2007;8(6):1775–89.
60. Karwa M, Hahn D, Mitra S. A sol-gel immobilization of nano and micron size sorbents in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchannels for microscale solid phase extraction (SPE). *Anal Chim Acta*. 2005;546(1):22–9.
61. Limbut W, Loyprasert S, Thammakhet C, Thavarungkul P, Tuantranont A, Asawatreratanakul P, et al. Microfluidic conductimetric bioreactor. *Biosens Bioelectron*. 2007;22:3064–71.
62. Zhou J, Khodakov DA, Ellis A V., Voelcker NH. Surface modification for PDMS-based microfluidic devices. *Electrophoresis*. 2012;33(1):89–104.
63. Jang LS, Liu HJ. Fabrication of protein chips based on 3-aminopropyltriethoxysilane as a monolayer. *Biomed Microdevices*. 2009;11(2):331–8.
64. Zhang D, Hegab HE, Lvov Y, Dale Snow L, Palmer J. Immobilization of cellulase on a silica gel substrate modified using a 3-APTES self-assembled monolayer. *Springerplus*. 2016;5:48.
65. Singh RK, Zhang YW, Nguyen NPT, Jeya M, Lee JK. Covalent immobilization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;89(2):337–44.
66. Hartmann M, Jung D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. *J Mater Chem*. 2010;20(5):844.
67. Gunda NSK, Singh M, Norman L, Kaur K, Mitra SK. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. *Appl Surf Sci*. 2014;305:522–30.
68. Baker C, Doung C, Grimley AI, Roper M. Recent advances in microfluidic detection systems. *Bioanalysis*. 2009;1(5):967–75.
69. Pires NM iguel M, Dong T, Hanke U, Hoivik N. Recent developments in optical detection technologies in lab-on-a-chip devices for biosensing applications. *Sensors*. 2014;14(8):15458–79.

70. Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 8th edition. New York: W. H. Freeman and Company; 2010. 719 p.
71. Sierra I, Gómez S, Pérez D, Morante S. Análisis instrumental. La Coruña: Netbiblo; 2010. 227 p.
72. Rushworth CM, Davies J, Cabral JT, Dolan PR, Smith JM, Vallance C. Cavity-enhanced optical methods for online microfluidic analysis. Chem Phys Lett. 2012;554:1–14.
73. Balslev S, Jorgensen a M, Bilenberg B, Mogensen KB, Snakenborg D, Geschke O, et al. Lab-on-a-chip with integrated optical transducers. Lab Chip. 2006;6(2):213–7.
74. Downing J. Fiber Optic Communications. New York: Thomson Delmar Learning; 2005. 379 p.
75. Bakshi U, Bakshi A. Measurements and Instrumentation. 4th edition. Pune: Technical Publications Pune; 2009. 100 p.
76. Udd E, Spillman W. Fiber optic sensor: an introduction for engineers and scientists. 2nd edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. 498 p.
77. Soto J. Inducción de rejillas de periodo largo en fibras ópticas mediante la aplicación de dispositivos MEMS de polímero. Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
78. Elosua C, Matias I, Barriain C, Arregui F. Volatile organic compound optical fiber sensors: a review. Sensors. 2006;6:1440–65.
79. Bradbury J, Vehrencamp S. Principles of animal communication [Internet]. Sinauer Associates Inc. 2011 [citado 26 de febrero de 2016]. Recuperado a partir de: <http://sites.sinauer.com/animalcommunication2e/chapter04.02.html>
80. Bezbradica DI, Mateo C, Guisan JM. Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde. J Mol Catal B Enzym. 2014;102:218–24.
81. Henares TG, Mizutani F. Characterization of Capillary Immunosensor for Capillary-Assembled Microchip (CAs-CHIP) Integration. 2007;19(4):249–59.
82. Gómez JL, Bódalo A, Gómez E, Bastida J, Hidalgo AM, Gómez M. Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal. Enzyme Microb Technol. 2006;39(5):1016–22.

83. Chow C, Lam H, Lee YC, Zhang X-M. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. New Jersey: Wiley-Interscience; 2004. 302 p.
84. Melvad C, Krühne U, Frederiksen J. Design considerations and initial validation of a liquid microflow calibration setup using parallel operated syringe pumps. *Meas Sci Technol*. 2010;21(7):74004-10.
85. Batista E, Paton R. The selection of water property formulae for volume and flow calibration. *Metrologia*. 2008;45(7):127–127.
86. Sabnis RW. Handbook of acid-base indicators. Boca Raton: CRC Press; 2008. 278 p.
87. Quintero K. Estudio de la  $\beta$ -glucosidasa en condiciones de curado de vainilla. Universidad Nacional Autónoma de México. 2014.
88. García M, Soberón E, Cortés M, Rodríguez R, Herrera J, Alcántara A. Guía de validación de métodos analíticos. 1ra edición. México, D.F.: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C.; 2002. 54 p.
89. ICH Expert Working Group. Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1) [Internet]. International Conference on Harmonisation. 2005 [citado 26 de febrero de 2016]. Recuperado a partir de: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)
90. Arques FJ, Nuñez N, Vazquez M, Segura C, González V. High-power UV-LED degradation: Continuous and cycled working condition influence. *Solid State Electron*. 2015;111:111–7.
91. Karlsson JM, Gazin M, Laakso S, Haraldsson T, Malhotra-Kumar S, Mäki M, et al. Active liquid degassing in microfluidic systems. *Lab Chip*. 2013;13(22):4366–73.
92. Shabir B. Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System. *Buluth. Inst Valid Technol*. 2013. 72 p.
93. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspect Sci*. 2014;1(1):41–55.
94. Kwapiszewski R, Skolimowski M, Ziolkowska K, Jedrych E, Chudy M, Dybko A, et al. A microfluidic device with fluorimetric detection for intracellular components analysis. *Biomed Microdevices*. 2011;13(3):431–40.

95. Arayanarakool R, Shui L, Kengen SWM, van den Berg A, Eijkel JCT. Single-enzyme analysis in a droplet-based micro- and nanofluidic system. *Lab Chip*. 2013;13(10):1955.
96. Teh S, Lin R, Hung L, Lee AP. Droplet microfluidics. *Lab Chip*. 2008;8(2):198–220.
97. Riche CT, Zhang C, Gupta M, Malmstadt N. Fluoropolymer surface coatings to control droplets in microfluidic devices. *Lab Chip*. 2014;14(11):1834–41.
98. Stege PW, Messina G a, Bianchi G, Olsina R a. Determination of the  $\beta$ -glucosidase activity in different soils by pre capillary enzyme assay using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Fluoresc*. 2010;20(2):517–23.
99. Pérez G, Fariña L, Barquet M, Boido E, Gaggero C, Dellacassa E, et al. A quick screening method to identify  $\beta$ -glucosidase activity in native wine yeast strains: Application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011;27(1):47–55.
100. Pérez M, Muñoz FJ, Muñoz E, Fernández M, Sinisterra JV, Hernáiz MJ. Synthesis of novel glycoconjugates and evaluation as inhibitors against  $\beta$ -glucosidase from almond. *J Mol Catal B Enzym*. 2008;52-53(1-4):153–7.
101. Chen T, Yang W, Guo Y, Yuan R, Xu L, Yan Y. Enhancing catalytic performance of  $\beta$ -glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles. *Enzyme Microb Technol*. 2014;63:50–7.
102. Avegno EA-B, Hasty SJ, Parameswar AR, Howarth GS, Demchenko A V, Byers LD. Reactive thioglucoside substrates for  $\beta$ -glucosidase. *Arch Biochem Biophys*. 2013;537(1):1–4.
103. Reshmi R, Sugunan S. Improved biochemical characteristics of crosslinked  $\beta$ -glucosidase on nanoporous silica foams. *J Mol Catal B Enzym*. 2013;85-86:111–8.
104. Hsieh MC, Graham TL. Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*. 2001;58(7):995–1005.
105. Yan J, Pan G, Ding C, Quan G. Kinetic and thermodynamic parameters of  $\beta$ -glucosidase immobilized on various colloidal particles from a paddy soil. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;79(1):298–303.

106. Serefoglou E, Litina K, Gournis D, Kalogeris E, Tziaila AA, Pavlidis I V., et al. Smectite clays as solid supports for immobilization of  $\beta$ -glucosidase: Synthesis, characterization, and biochemical properties. *Chem Mater*. 2008;20(12):4106–15.
107. Sheldon RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal*. 2007;349(8-9):1289–307.
108. Asanomi Y, Yamaguchi H, Miyazaki M, Maeda H. Enzyme-immobilized microfluidic process reactors. *Molecules*. 2011;16(7):6041–59.
109. Matosevic S, Szita N, Baganz F. Fundamentals and applications of immobilized microfluidic enzymatic reactors. *J Chem Technol Biotechnol*. 2011;86(3):325–34.
110. Ueno S, Hirai T, Sato S, Biyani M, Kuramochi H. In situ Synthesis and Immobilization of Enzyme Molecules on Microreactor Array Chips. *J Photopolym Sci Technol*. 2015;28(5):710–25.
111. Seong GH, Heo J, Crooks RM. Measurement of enzyme kinetics using a continuous-flow microfluidic system. *Anal Chem*. 2003;75(13):3161–7.
112. Urban PL, Goodall DM, Bruce NC. Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies. *Biotechnol Adv*. 2006;24(1):42–57.
113. Iqbal J, Iqbal S, Müller CE. Advances in immobilized enzyme microbioreactors in capillary electrophoresis. *Analyst*. 2013;138(11):3104–16.
114. Kamholz AE, Yager P. Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels. *Biophys J*. 2001;80(1):155–60.
115. Crittenden J. *MWH's water treatment: principles and design*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2012. 1901 p.