



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA ARILSULFATASA DE
Pseudomonas aeruginosa **DENTRO DE MICROGOTAS DE**
MICROFLUÍDICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA

PRESENTA

FRIDA TREJO CALLEJAS



MÉXICO, Cd. Mx.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres**

VOCAL: **Profesor: María del Pilar Cañizares Macías**

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

1er. SUPLENTE: **Profesor: Xelhua Elihut Marcos Benítez**

2° SUPLENTE: **Profesor: Francisca Morayna Gutiérrez Luna**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 326,
BIOFISICOQUÍMICA, EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

SUSTENTANTE:

Frida Trejo Callejas

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

Agradecimientos

A la Facultad de Química por el financiamiento otorgado mediante el subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”, a través del cual recibí apoyo como ayudante de investigador nivel A durante el ciclo escolar 2017-2018.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9023) de la Facultad de Química con el cual se compraron algunos insumos para la realización de esta tesis.

Contenido

Lista de Abreviaturas	7
1. Introducción	8
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo general	10
2.2. Objetivos particulares.....	10
3. Antecedentes	11
3.1. Microfluídica	11
3.1.1. Materiales con los que se fabrican los microchips.....	11
3.1.2. Ensayos en microgotas	13
3.1.3. Ensayos enzimáticos en microgotas.....	19
3.2. Desarrollo de ensayos en formato de alta eficiencia (HTS).	22
3.3. Extractos naturales como fuente de compuestos con actividad biológica.	23
3.4. Sulfatasas.	25
3.4.1. Sulfatasas de interés para la salud humana.....	27
3.4.2. Sulfatasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
4. Desarrollo experimental	30
4.1. Transformación de <i>E. coli</i> y expresión de la proteína.....	30
4.2. Purificación de la proteína	31
4.3. Determinación de la concentración total de proteína en distintos eluatos	31
4.4. Determinación de la actividad específica de PAS en distintos eluatos	32
4.5. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	32
4.6. Determinación de la K_m de la proteína purificada.....	34
4.7. Determinación de la estabilidad de la proteína en presencia de disolventes orgánicos	35
4.8. Inhibición enzimática aprovechando la actividad promiscua de la enzima PAS.	35
4.9. Fabricación de los microchips	36
4.9.1. Diseño del microchip	36
4.9.2. Fabricación del molde.....	36

4.9.3.	Obtención de réplicas de PDMS.....	38
4.9.4.	Caracterización del microchip de PDMS	41
4.10.	Reacciones enzimáticas dentro del microchip	42
4.10.1.	Cámara Phantom.....	45
4.10.2.	Medición de fluorescencia de las microgotas	46
4.10.3.	Medición de la reacción enzimática de sulfatasa sin ningún inhibidor	47
4.10.5.	Control positivo de inhibición	54
4.10.5.	Experimentos de inhibición con un extracto de cebolla	56
4.11.	Tiempo de residencia de las gotas en el microchip.....	57
4.12.	Curva de calibración en el microchip.....	58
5.	Resultados y discusión.....	59
5.1.	Transformación de bacterias de <i>E. coli</i> con el plásmido pRSFDuet-1-PAS y expresión recombinante de la enzima arilsulfatasa de <i>P. aeruginosa</i>	59
5.2.	Purificación parcial de la arilsulfatasa de <i>P. aeruginosa</i> recombinante....	60
5.3.	Determinación de la concentración total de proteína	62
5.4.	Determinación de la actividad específica de PAS en las fracciones 1-25.	64
5.5.	Determinación de las constantes cinéticas K_m para dos sustratos.....	65
5.7.	Actividad de la enzima PAS en presencia de disolventes orgánicos	69
5.8.	Diseño del microchip	71
5.9.	Caracterización de los canales	73
5.10.	Tiempo de residencia de las microgotas en el microchip.....	75
5.11.	Formación de microgotas y ensayos enzimáticos dentro del microchip... 76	
5.11.1.	Curva de calibración en el microchip.....	77
5.11.2.	Reacción de hidrólisis de 4-MUS con la enzima PAS en microgotas sin ningún inhibidor	79
5.11.3.	Control positivo de inhibición. Inhibición con p-nitrofenilfosfato.....	83
5.11.4.	Inhibición con extracto de cebolla.....	85
6.	Resumen de resultados	91
7.	Conclusiones	91
8.	Perspectivas.....	92

9. Referencias	93
10. ANEXOS.....	100
10.1. Curvas de calibración en espectrofotómetro.....	100
10.2. Cálculo de las velocidades iniciales de reacción mediante la ecuación integrada de Michaelis-Menten	101
10.3. Curvas de progreso de reacción obtenidas en el microchip.....	102

Lista de Abreviaturas

PAS	Arilsulfatasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
4-MUS	4-metilumbeliferol sulfato
4-MU	4-metilumbeliferona
pNPS	p-nitrofenil sulfato
pNP	p-nitrofenol
pNPP	p-nitrofenil fosfato
K_M	Constante de Michaelis-Menten
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
cps	Cuadros por segundo
URF	Unidades relativas de fluorescencia

1. Introducción

El uso de plantas como fuente de compuestos con actividad biológica ha existido desde el inicio de las primeras civilizaciones humanas y su uso se ha conservado hasta nuestros días. Su importancia es tan grande que, del total de medicamentos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 y 2014, el 42% proviene de productos naturales o de sus derivados. A pesar de la importancia de los productos naturales como fuente de compuestos con actividad biológica, su gran desventaja es que encontrar un compuesto útil resulta laborioso y consume una gran cantidad de tiempo y recursos materiales y económicos. Por estas razones, es de gran importancia el desarrollo de una nueva tecnología que permita manejar volúmenes considerablemente más pequeños y reducir los tiempos y el trabajo de experimentación.

Esta tesis propone utilizar dispositivos de microfluídica que permitan formar microgotas para realizar ensayos enzimáticos dentro de ellas. Realizar los ensayos de esta manera da solución a los problemas mencionados anteriormente: disminuye tanto costos como tiempo de experimentación y ofrece la posibilidad de analizar un mayor número de compuestos con probable actividad biológica en menos tiempo y con menos reactivos.

Como ejemplo de estudio se trabajó con la arilsulfatasa de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, por su alta semejanza con distintas sulfatasas de importancia para la salud humana. La ausencia de sulfatasas humanas está asociada a un trastorno genético que provoca un gran número de síntomas (encefalopatía, ceguera, pérdida auditiva, ictiosis y anomalías esqueléticas y en articulaciones). Por otro lado, una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial es la tuberculosis, enfermedad causada por la bacteria *M. tuberculosis*; esta bacteria basa su patogénesis y supervivencia en una gran cantidad de metabolitos que contienen sulfatos y son las sulfatasas algunas de las enzimas capaces de metabolizar estos compuestos de acuerdo con las necesidades de la bacteria. Debido a estos ejemplos, que no son únicos, profundizar en el conocimiento de la

arilsulfatasa de *P. aeruginosa* llevará a un mayor entendimiento del funcionamiento de otras sulfatasas de mayor interés.

La primera etapa de este trabajo consistió en la expresión recombinante y purificación parcial por intercambio aniónico de la enzima de interés para, posteriormente, determinar sus constantes cinéticas utilizando como sustratos la sal de potasio del 4-metilumbeliferil sulfato y 4-nitrofenil sulfato y un método espectrofotométrico. Por último, se diseñó y fabricó un microchip de microfluídica para montar un ensayo enzimático con microgotas. Una vez desarrollado y validado el ensayo, se buscaron inhibidores de esta enzima en extractos naturales crudos de cebolla. Estos ensayos enzimáticos se realizaron con 4-metilumbeliferil sulfato como sustrato ya que su hidrólisis genera un producto fluorescente.

Como resultado del trabajo, se demostró que la técnica desarrollada en esta tesis es adecuada para la identificación de extractos que contengan inhibidores de la enzima PAS como caso específico. En general, el sistema propuesto permite el estudio de cualquier enzima de interés junto con una gran cantidad de compuestos con posible actividad inhibitoria.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Desarrollar ensayos de inhibición enzimática dentro de microgotas generadas en un dispositivo de microfluídica utilizando como caso de estudio la enzima arilsulfatasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2. Objetivos particulares

- Expresar la proteína recombinante arilsulfatasa de *P. aeruginosa* en *E. coli*.
- Purificar la enzima parcialmente mediante una columna de intercambio aniónico.
- Determinar la constante de Michaelis-Menten (K_m) de la enzima recombinante mediante espectrofotometría UV-Visible y utilizando como sustratos p-nitrofenil sulfato y 4-metilumbeliferol sulfato.
- Diseñar y fabricar un microchip para realizar los ensayos de inhibición utilizando microgotas de microfluídica.
- Utilizar el microchip de microfluídica para identificar un extracto natural que inhiba a la enzima arilsulfatasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Antecedentes

3.1. Microfluídica

La microfluídica es una disciplina científica que trata con fluidos que pasan a través de canales menores a un milímetro [1]. Se define como ciencia ya que estudia el comportamiento y propiedades de los fluidos en los microcanales en los que están confinados, mientras que el aspecto tecnológico se refiere a las múltiples aplicaciones que se han desarrollado a partir de este estudio. Los volúmenes de fluidos que estudia típicamente esta área van desde los femtolitros hasta los nanolitros.

Uno de los principales objetivos de la microfluídica consiste en miniaturizar los ensayos de tal forma que la instrumentación necesaria para llevarlos a cabo de una forma tradicional pueda ahora acoplarse al microchip.

Las aplicaciones encontradas dentro de este campo involucran una enorme diversidad de áreas de estudio que van desde la química analítica [6], biosensores [7], cultivos celulares de todo tipo y estudio de tejidos y órganos en chips [56], descubrimiento de nuevos fármacos [3-5] y síntesis en química orgánica y de nanopartículas. [2]

3.1.1. Materiales con los que se fabrican los microchips.

Algunos de los factores más importantes para elegir el material en el que se fabrican los sistemas de microfluídica para realizar los ensayos (ya sean químicos o biológicos) son: nula reactividad con los componentes de las disoluciones, compuestos o sustancias que se introduzcan en él, una conductividad eléctrica adecuada, comportamiento hidrofóbico o hidrofílico, permeabilidad,

biocompatibilidad, nula interferencia con el método de análisis ocupado y hasta el costo de producción.

Algunos de los materiales utilizados en la microfluídica para fabricar los microchips son el vidrio, silicio, cerámicos cocidos a baja temperatura y distintos polímeros como el polidimetilsiloxano (PDMS), poliéster termoestable (TPE), poliestireno, policarbonato, polimetilmetacrilato (PMMA), entre otros [8].

Actualmente, el polidimetilsiloxano (PDMS) es el material más común para la fabricación de los microchips ya que cuenta con características que lo hacen ideal para distintas aplicaciones como su bajo costo, flexibilidad, transparencia óptica, biocompatibilidad y estabilidad química. Otra gran ventaja de este polímero es el tiempo y condiciones bajo las que se polimeriza: el tiempo es corto y las condiciones de temperatura son relativamente suaves (2 horas a 69°C).

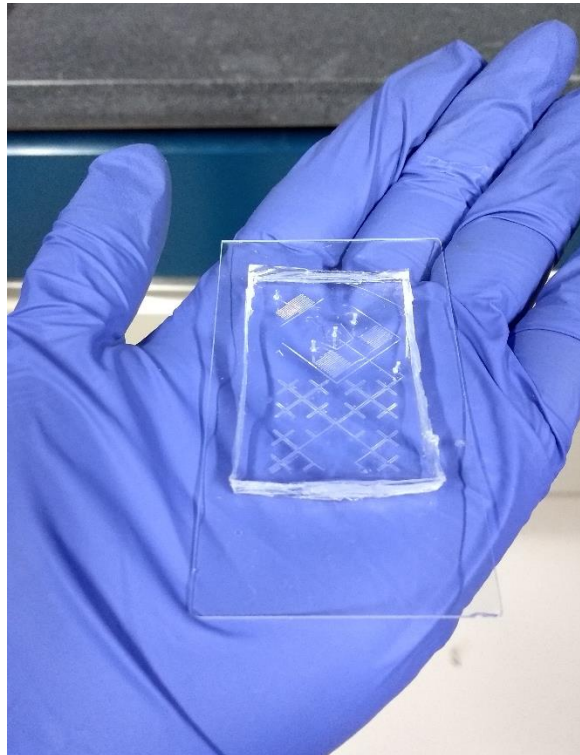


Figura 1. Dispositivo de microfluídica de PDMS fabricado en el laboratorio.

La técnica más común para fabricar los microchips de PDMS es la fotolitografía y litografía suave, la cual consiste en una serie de pasos que incluyen la impresión del diseño, fabricación de un molde y grabado bajo relieve con un elastómero. Esta técnica fue la utilizada en el desarrollo de este trabajo y se habla de ella con más detalle más adelante (sección 4.9. “Fabricación de los microchips”).

3.1.2. Ensayos en microgotas

En microfluídica existen dos variantes mediante las cuales pueden llevarse a cabo los experimentos. La primera es llamada flujo continuo y como su nombre lo indica, se trata de un flujo regular y constante pasando a través de los microcanales de un microchip. La segunda variante consiste en el uso de microgotas de microfluídica. Los ensayos en estas gotas ofrecen la posibilidad de realizar miles de experimentos en tiempos cortos, además los métodos para formar las microgotas ofrecen la ventaja de que éstas son monodispersas, es decir que cada una de ellas tiene las mismas características que las demás (que la desviación estándar es mínima): todas son del mismo tamaño y contienen la misma cantidad de reactivos.

Los flujos en los dispositivos de microfluídica se describen con números de Reynolds pequeños, lo cual significa que estos flujos son laminares y, la única manera en la que dos flujos con estas características pueden mezclarse, es por difusión, el cual es un proceso lento. Otra característica que presentan los fluidos al desplazarse por microcanales es la dispersión de sus componentes. Estos no se desplazan a través del microcanal uniformemente, sino que describen un perfil parabólico, generando un gradiente de concentraciones. Ambos efectos se describen gráficamente en la Figura 2a.

Estos dos efectos son las principales desventajas del flujo continuo cuando se busca llevar a cabo una reacción enzimática o síntesis de algún compuesto en un dispositivo de microfluídica. El comportamiento de los fluidos confinados en una

microgota es distinto ya que se presenta un comportamiento descrito como advección caótica [51, 52] que permite un mezclado rápido de los componentes dentro de la microgota (Figura 2b).

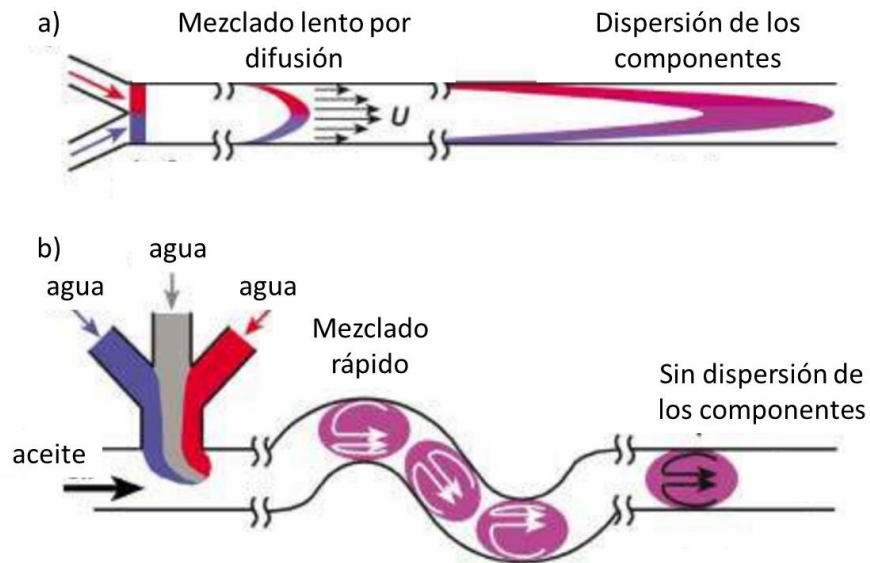


Figura 2. Comparación esquemática del comportamiento de los fluidos en un dispositivo de microfluídica con a) flujo continuo y b) dentro de microgotas de microfluídica. Modificado de [51].

Las microgotas son generadas a partir de dos flujos que se unen en algún punto, uno de ellos es la fase continua mientras que las microgotas son la fase dispersa. Dependiendo del objetivo del estudio será la naturaleza de cada una de las fases.

Al realizar ensayos en microgotas es importante considerar el material con el que se fabricará el dispositivo y conocer su afinidad hacia las disoluciones que se introducirán al microchip, debido a que es mejor que las disoluciones con las que se moja el material sean las de la fase continua, mientras que la fase dispersa debe ser un material con el que no se mojen las paredes del microchip. Por ejemplo, el PDMS es un material hidrofóbico por lo que si se usa es importante que la fase dispersa (la de las microgotas) sea acuosa mientras que la fase orgánica sea la fase

continua. En el caso contrario, en los que la fase acuosa sea la fase continua, es posible utilizar dispositivos de microfluídica fabricados en vidrio [9] o modificar la superficie del PDMS [50].

Para formar las microgotas existen distintos métodos. Christopher, G.F. & Ann, S.L. (2007), los clasifican en dos grupos: pasivos y activos. En los métodos pasivos la formación de microgotas es debida a la interacción de dos flujos de fases inmiscibles mientras que los métodos activos requieren de la actuación de un dispositivo externo, como un piezoeléctrico, para la formación de las microgotas.

Aunque existen distintos métodos y geometrías para la formación de microgotas el principio de su formación es el mismo. La fase dispersa se introduce por un canal mientras que la fase continua se introduce por otro canal completamente independiente. En un punto posterior, los flujos de ambos canales se encuentran y la fase dispersa empieza a separarse en pequeñas gotas. El tamaño de las gotas, así como la velocidad a la que se forman dependerá del tipo de unión de ambas fases, la velocidad de ambos fluidos, la relación de viscosidades entre las dos fases, la presencia de tensoactivos, el tamaño de los canales, el uso de energía eléctrica o control térmico [10,57].

El primer grupo, métodos pasivos, se divide a su vez en tres categorías que se distinguen por la geometría de los canales en los que viajan los flujos:

1. Fluidos en co-flujo.

La geometría que permite este tipo de formación de microgotas se muestra en la Figura 3a. Se trata de dos canales concéntricos. En el canal interior viaja la fase dispersa mientras que en el exterior viaja la fase continua. Al interactuar ambas corrientes, se promueve la formación de una microgota.

2. Fluidos con flujos cruzados en una unión con forma de T.

En este caso, los canales tienen una geometría en forma de T. Por el canal perpendicular viaja la fase dispersa mientras que por el otro fluye la fase continua. El flujo de la disolución continua debe ser mayor que el otro para así favorecer la formación de las microgotas (Figura 3b).

3. Enfoque de flujo.

En este caso, los canales en los que viaja la fase continua deben ser simétricos e intersectar al canal en el que viaja la fase dispersa (Figura 3c). Las gotas se forman debido a que ambas fases son forzadas a pasar por el mismo canal y el flujo de la fase continua es mayor que el de la fase dispersa.

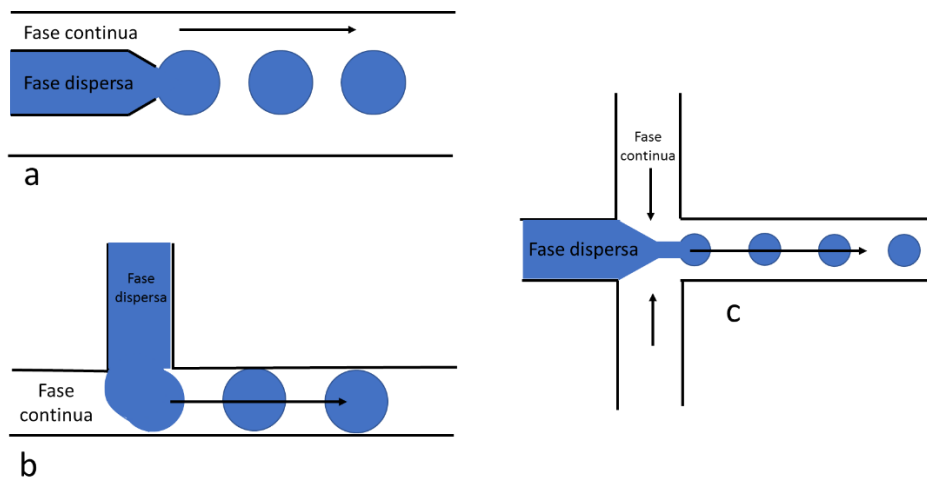


Figura 3. Geometrías para formar microgotas mediante métodos pasivos.

En el caso de los métodos activos, se utiliza generalmente una membrana flexible que se mueve utilizando un piezoeléctrico o algún cambio de voltaje, provocando que la disolución contenida en el pozo salga por un pequeño orificio formándose la microgota. [10]

En estudios biológicos la fase dispersa consiste en disoluciones en fase acuosa ya que comúnmente tanto enzimas como células son estables en esta fase y no en disolventes orgánicos. Generalmente, este tipo de estudios se llevan a cabo utilizando aceites fluorinados (compuestos alifáticos de cadena mediana, generalmente de 5-8 átomos de carbono en donde se sustituyen los hidrógenos por átomos de flúor) como fase dispersa debido a que son biológicamente inertes, son hidrófobos y lipóforos y tienen gran capacidad de disolver oxígeno [11]. Otra característicamente importante de los aceites fluorinados es su compatibilidad con el PDMS [12], material con el que son fabricados mayormente los dispositivos de microfluídica.

Una vez formadas las microgotas, es necesario evitar fenómenos de difusión de los reactivos de una gota a otra. El uso de tensoactivos es crucial para evitar que las microgotas coalescan y los ensayos puedan realizarse tanto en periodos de tiempo cortos (segundos) como en periodos mucho más largos (días). Además, un tensoactivo adecuado puede evitar que las biomoléculas se adsorban en la superficie de la microgota. Esto es posible ya que algunas biomoléculas tienen dos partes: una hidrofílica y otra lipofílica, como las proteínas. Por otra parte, el uso de tensoactivos debe ser también cuidadoso ya que si se usan en gran cantidad pueden favorecer el intercambio de reactivos y productos entre las gotas mediante micelas. [60]

La elección del surfactante debe hacerse considerando la aplicación para la cual se requiera; algunos surfactantes podrían actuar satisfactoriamente a temperatura ambiente, pero ser inútiles en aplicaciones que requieran mayor temperatura, así como algunos surfactantes podrían funcionar adecuadamente para aplicaciones de síntesis mientras que serían inútiles para aplicaciones biológicas.

La aplicación de interés de este trabajo pertenece a este último grupo por lo que el surfactante a utilizar debe ser biocompatible, además de ser compatible también con el aceite (fase continua) y el material del dispositivo a utilizar.

Clásicamente, se utilizaban alcoholes fluorados o poli(perfluoro propilenglicol)-carboxilatos (Kritox de DuPont es el más utilizado comercialmente) para estabilizar las microgotas en aceite fluorinado. Sin embargo, debido a la carga negativa de los carboxilatos, estos tienden a interactuar con las biomoléculas de carga contraria, provocando que éstas pierdan funcionalidad. [13]

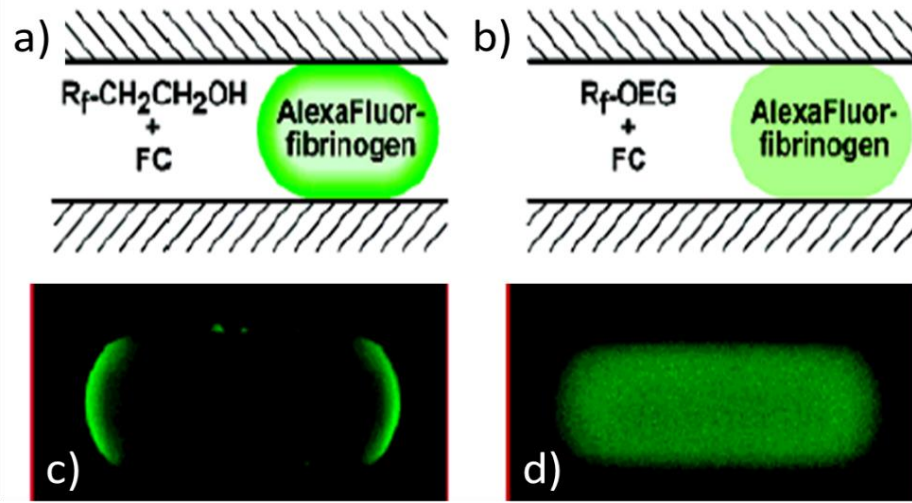


Figura 4. Prueba cualitativa de adsorción dentro de gotas. Dibujo esquemático del fibrógeno con marcador fluorescente AlexaFluor y 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-octanol en aceite fluorinado (a) y con un derivado de oligoetilenglicol también en aceite fluorinado (b). Las fotografías (c) y (d) corresponden también a las descripciones de cada dibujo. Tomada de [13].

En la Figura 4 se observan dos microgotas que contienen un compuesto fluorescente dentro. La gota de la izquierda (Figura 4a, 4c), se encuentra rodeada de aceite fluorinado con un tensoactivo con carga negativa mientras que el ambiente de la gota de la derecha consta de aceite fluorinado con un tensoactivo sin carga. La diferencia entre ambas gotas es la localización del compuesto fluorescente. Cuando el tensoactivo tiene carga negativa, este compuesto fluorescente se localiza en la interfase ya que interactúa con las moléculas negativas del tensoactivo. Cuando el tensoactivo carece de carga, el compuesto fluorescente se distribuye uniformemente en toda la gota.

Para solucionar este problema y evitar que las moléculas que deben estar uniformemente en toda la gota migren hacia la interface agua-aceite, se ha propuesto la unión covalente de los bloques de poliéteres perfluorinados (bloques que conforman a Krytox de DuPont, por ejemplo) a bloques hidrofílicos sin carga, como el polietilenglicol [12-14]. Estos estudios han demostrado que las gotas presentan mayor estabilidad al agregar este tipo de surfactantes a la fase oleosa.

En general, se utiliza el tensoactivo resultante de la unión de Krytox y Jeffamina como surfactante [15].

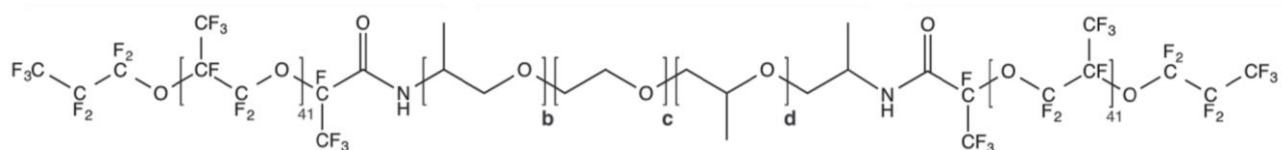


Figura 5. Estructura química de Krytox 157 FSH-Jeffamina ED 900, $b + d = 6$, $c = 12.5$. Tomada de [12].

3.1.3. Ensayos enzimáticos en microgotas.

El análisis y búsqueda de compuestos con actividad biológica utilizando microgotas de microfluídica tiene distintas ventajas, entre las cuales se encuentra la rapidez con la que se llevan a cabo: se pueden hacer miles de ensayos (uno por cada microgota formada) en solo unos minutos, el uso de reactivos es mínimo (se usan μL de reactivos por hora) y, por lo tanto, la generación de desechos se ve enormemente reducida si se compara con los producidos al utilizar métodos tradicionales que utilizan ensayos en placas de pozos, por lo que resulta una técnica además de económica, amigable con el medio ambiente.

Ejemplo de las pequeñas cantidades de reactivos necesarias para realizar los ensayos en microgotas de microfluídica, así como de los muy pequeños tiempos análisis se encuentra reportado por Song, H., & Ismagilov, R. F. (2003). Estos

investigadores diseñaron un sistema en el que usaron 150 nL por cada ensayo realizado y cuyas mediciones se realizaron durante 4 segundos (estas mediciones son el promedio de todas las gotas que pasaron por el punto de lectura en ese tiempo), además de ofrecer la posibilidad de cambiar la concentración de cada componente de la microgota, al cambiar el flujo al que se introduce cada disolución.

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en placas de 96 pozos con los obtenidos mediante las microgotas, Damean, N., et. al. (2009) desarrollaron un dispositivo de microfluídica para determinar las constantes cinéticas de la fosfatasa alcalina de *E. coli* en el que es posible diluir los reactivos en diferentes canales del microchip, sin necesidad de cambiar el flujo de entrada inicial y con la ventaja de poder medir cada una de las reacciones con las distintas cantidades de reactivo al mismo tiempo. La importancia de generar microgotas con distintas concentraciones de un reactivo radica en que los ensayos de inhibición enzimática son frecuentemente utilizados en la detección de posibles candidatos para medicamentos. Por lo cual, el desarrollo de un sistema capaz de generar microgotas con distintas concentraciones de inhibidor demuestra el potencial de esta técnica para el escrutinio de alta eficiencia (HTS por sus siglas en inglés). Ejemplo de un estudio con estas características se encuentra reportado por Cai, L. F., et. al. (2012). Estos investigadores consiguieron realizar más de 240 reacciones de inhibición con 16 nL de disolución de inhibidor (a diferentes concentraciones) en menos de 3 minutos. Comparando con ensayos en placas de pozos se redujo 1000 veces el consumo de inhibidor. Para lograrlo, el compuesto inhibidor fue inyectado mediante una técnica de inyección de flujo con gradiente (FIG por sus siglas en inglés) acoplada a un microchip en el que se generaban las microgotas. La enzima estudiada fue la β -galactosidasa y el sustrato digalactósido de fluoresceína. Ambos se inyectaron después de que el inhibidor fuera dispersado y diluido en el microcanal.

En el laboratorio de investigación donde se desarrolló esta tesis, se han implementado ensayos de inhibición enzimática utilizando microgotas de microfluídica. Los estudios han estado enfocados a estudiar distintos extractos

naturales como fuente de compuestos con actividad biológica ya que son de suma importancia para el desarrollo de nuevos medicamentos, tal como se ha observado históricamente [18] (ver sección 3.3 “Extractos naturales como fuente de compuestos con actividad biológica” más adelante). El acoplamiento de técnicas de separación a los dispositivos de microfluídica permite el reconocimiento de los compuestos con actividad biológica pertenecientes al extracto natural [3], aunque también es posible la integración de un sistema de HPLC dentro del microchip [6]. Sistemas de este tipo, en los que es posible miniaturizar todos los componentes de un laboratorio, tal como lo conocemos de tal forma que se encuentren dentro un microchip, son conocidos como lab-on-a-chip (LOC).

Los trabajos que se han realizado en este laboratorio respecto a este tema han enfocado sus esfuerzos en dos distintas enzimas. La primera de ellas es la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*. El trabajo inicial, realizado por Álvarez, E. (2013), se enfocó en la identificación de distintos extractos naturales con actividad inhibitoria de esta enzima mediante espectrofotometría UV-Visible. De los cuatro extractos analizados, se concluyó que el extracto comercial de *Pelargonium sidoides* era el que menor IC₅₀ presentaba. Posteriormente, Ochoa, A. (2016), miniaturizó este ensayo mediante un dispositivo de microfluídica asociado a un equipo de HPLC. Mediante este acoplamiento fue posible separar los componentes del extracto de *Pelargonium sidoides*, antes de introducirlos al microchip, y así identificar a qué componentes se debía la inhibición enzimática. El acoplamiento del equipo de HPLC al dispositivo de microfluídica fue resultado del trabajo de Castillero, J. E. (2015), quien utilizó como ejemplo de estudio a la enzima β -D-Galactosidasa de *E. coli* y un inhibidor conocido, para demostrar la utilidad de este sistema.

El presente trabajo es una continuación de los recién mencionados y se han realizado algunos cambios buscando solucionar los problemas presentados en los trabajos anteriores: se implementó el uso de aceite fluorinado, la enzima, extracto natural inhibidor y sustrato también fue cambiado para demostrar la amplia diversidad de ensayos que pueden ser montados; la reacción fue monitoreada en

puntos distintos a los que se propusieron en los trabajos anteriores y se muestrearon las gotas a analizar en lugar de analizar cada una de las miles formadas. Además, se hicieron cambios en el diseño realizados con el objetivo de generar mayor estabilidad a la inyección de los flujos como se explica en secciones posteriores. Desafortunadamente, por cuestiones de tiempo, no se validaron los cambios en el diseño del microchip ni se acopló el equipo de HPLC por lo que estos puntos se plantean como parte de un trabajo posterior.

3.2. Desarrollo de ensayos en formato de alta eficiencia (HTS).

El proceso para el desarrollo de un fármaco es bastante largo, tal y como describe Carnero (2006) [19]. Este proceso empieza con la especificación y validación del blanco terapéutico. Posteriormente, se desarrollan ensayos con los que se pueda medir la actividad del blanco terapéutico en las condiciones requeridas para después probar una gran cantidad de compuestos que puedan presentar la actividad deseada sobre este blanco terapéutico (ya sea activarlo o disminuir su actividad). Estadísticamente, en este paso se prueban un millón de compuestos para después identificar aquéllos que presentan la actividad de interés sobre el blanco terapéutico. Después de esto el proceso continúa con la optimización de estos compuestos que deriva en su evaluación en humanos en estudios clínicos para finalmente ser aceptados como medicamentos. Del millón de compuestos que inicialmente se estudiaron solo uno se convierte en un medicamento aprobado. [19]

Dado lo anterior, resulta fácil entender la importancia que tiene reducir el tiempo de análisis y, en lo posible, que estos estudios sean económicos. Los métodos clásicos consisten en mediciones en placas de 1536 pozos, las cuales provienen de la evolución de las placas de 96 y 384 pozos con lo que se ha puesto en marcha la miniaturización del escrutinio de alta eficiencia [20] (Figura 6).

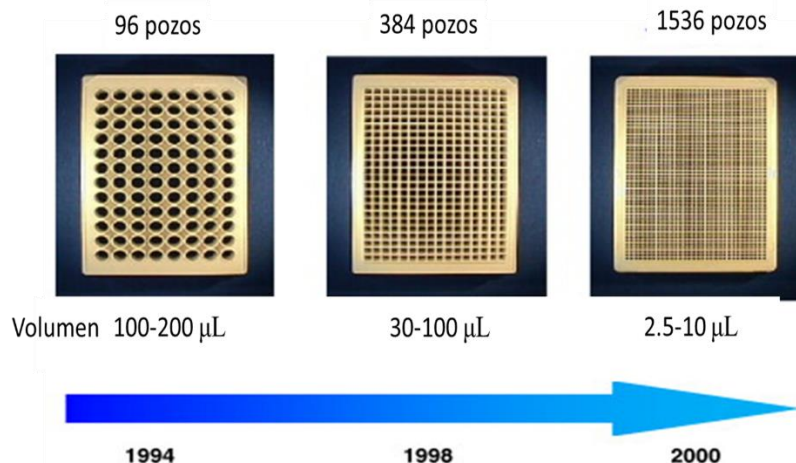


Figura 6. Tendencia hacia la miniaturización del escrutinio de alta eficiencia. La figura muestra los diferentes tipos de placas usadas en este tipo de estudios. Tomada y modificada de [21].

A pesar de observarse una clara tendencia hacia la miniaturización de los ensayos, el uso de placas de 1536 pozos requiere a su vez el uso de robots muy especializados para el manejo de volúmenes tan pequeños (al menos 10 µL), así como del desarrollo de pozos y paredes especiales para contener estas cantidades de fluidos [22].

3.3. Extractos naturales como fuente de compuestos con actividad biológica.

La organización mundial de la salud tiene una lista de medicamentos esenciales. Estos son seleccionados de acuerdo con “la prevalencia de la enfermedad y su relevancia para la salud pública, la evidencia de la eficacia clínica y la seguridad y la relación costo-eficacia” [23]. De dicha lista de 2001, 11% de los medicamentos ahí incluidos provenía de plantas en floración [48]. Además, según la amplia revisión bibliográfica que realizaron Newman y Cragg (2016), gran cantidad de los compuestos que actualmente funcionan como antibacteriales (59%), anticancerígenos (51%), antifúngicos (12%) y antivirales (13%), provienen de

compuestos de origen natural, ya sea que estos se hayan mantenido en su estructura original o que hayan sufrido modificaciones. Según la investigación y clasificación realizada por ambos autores, de todos los medicamentos aprobados entre 1981 y 2014 por la FDA, el 42% de los aprobados en estas fechas proviene de productos naturales (con o sin alteraciones en la estructura del producto natural), como se observa en la Figura 7.

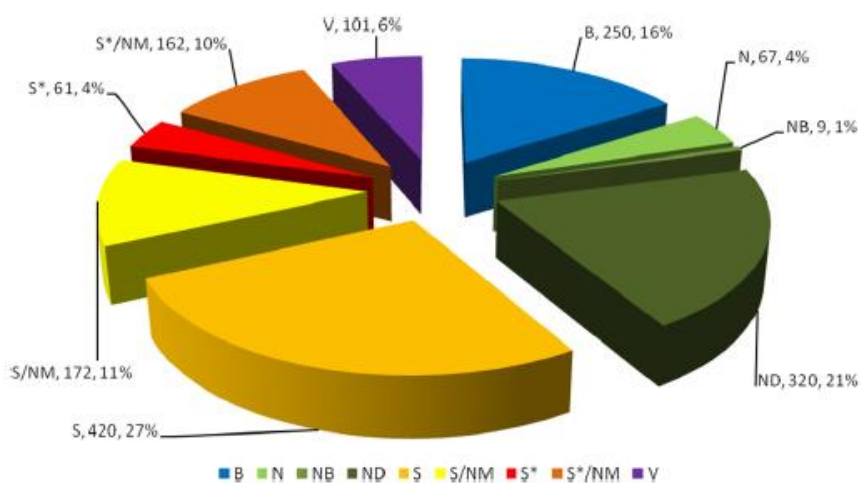


Figura 7. Nuevos medicamentos aprobados entre 1981 y 2014, n=1562. B: Molécula biológica, N: Producto natural sin alterar. NB: Medicamento botánico (mezcla definida), ND: Derivado de producto natural, S: Medicamento sintético, S*: Medicamento sintético cuyo farmacóforo proviene de un producto natural, V: Vacuna, /NM: Imitación la actividad de un producto natural. Tomado de [18].

El análisis de estos datos deja en claro la importancia de los productos naturales como fuente de compuestos con actividad biológica y en el descubrimiento de compuestos con posible evolución hacia un medicamento, por lo que el escrutinio de una mayor cantidad de estos productos podría llevar al desarrollo de más y mejores medicamentos.

3.4. Sulfatasas.

Las sulfatasas son una familia de enzimas que se encargan de la hidrólisis de los ésteres de sulfato. En la Figura 8 se observa un esquema de la reacción general que catalizan estas enzimas.

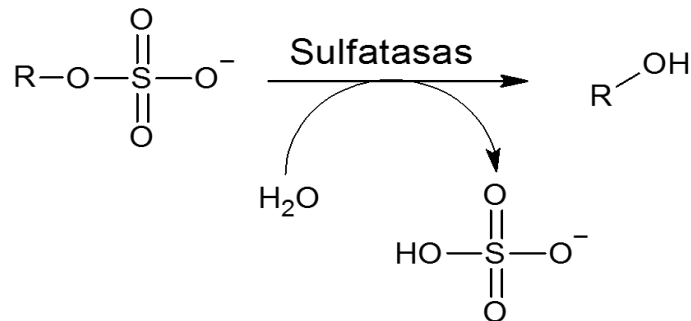


Figura 8. Reacción general de hidrólisis llevada a cabo por las sulfatasas.

Se han encontrado este tipo de enzimas en organismos tanto procariontes como eucariontes y desarrollan funciones diferentes dentro de cada organismo. Por ejemplo, hay algunas sulfatasas que tienen funciones de regulación hormonal [24] o metabolismo bacterial [25,26] así como también existen algunas sulfatasas lisosomales [27].

Pese a la diferencia de sustratos y variedad de funciones que cumplen las sulfatasas dentro de distintos organismos, es posible encontrar ciertas similitudes entre ellas como el diseño de su sitio activo, la modificación postraduccion que sufre el residuo catalítico y el porcentaje de homología que tienen entre ellas [28].

La primera característica estructural en común es el diseño del sitio activo. Este proviene de una modificación postraduccion de un residuo de serina o cisteína, dependiendo si el organismo es procarionte o eucarionte, a formilglicina (FGly). Sin esta modificación, la enzima no se encuentra activa [29].

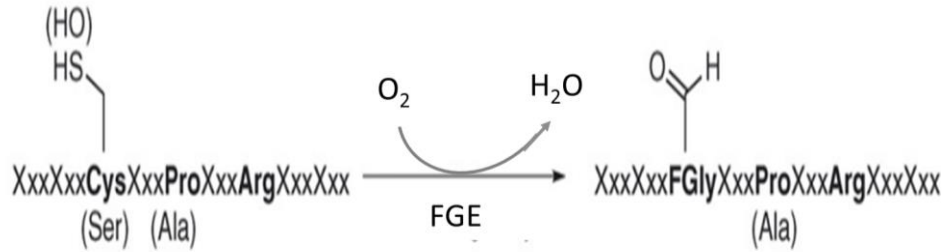


Figura 9. Esquema de la reacción catalizada por las enzimas generadoras de formilglicina. Modificada de [30].

Esta modificación postraduccion es llevada a cabo mediante un mecanismo que involucra a otras enzimas. Si el residuo que ha de ser transformado a FGly proviene de una cisteína, esta modificación es llevada a cabo por un grupo, llamado enzimas generadoras de formilglicina (FGE), que necesitan usar oxígeno molecular para este proceso. En los organismos procariontes, este sistema es llamado enzimas anaeróbicas maduradoras de sulfatasas (anSMEs) [30].

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Posición de FGly (1*)	Longitud
Sulfatasas humanas														
ARSA	C	T	P	S	R	A	A	L	L	T	G	R	69	507
ARSB	C	T	P	S	R	S	Q	L	L	T	G	R	75	533
ARSC	C	T	P	S	R	A	A	F	M	T	G	R	83	583
ARSD	C	T	P	S	R	A	A	F	L	T	G	R	89	593
ARSE	C	T	P	S	R	A	A	F	L	T	G	R	86	589
ARSF	C	S	P	S	R	S	A	F	L	T	G	R	79	591
ARSG	C	S	P	S	R	A	S	L	L	T	G	R	82	525
GalN6S	C	S	P	S	R	A	A	L	L	T	G	R	79	522
GlcN6S	C	C	P	S	R	A	S	I	L	T	G	K	91	552
GlcN5S	C	S	P	S	R	A	S	L	L	T	G	L	70	502
IdoA22S	C	A	P	S	R	V	S	F	L	T	G	R	84	550
Sulf1	C	C	P	S	R	S	S	M	L	T	G	K	87	871
Sulf2	C	C	P	S	R	S	S	I	L	T	G	K	88	870
Sulfatasas de invertebrados y eucariotas inferiores														
HeARS	C	T	P	S	R	S	A	I	M	T	G	R	106	559
HpARS	C	T	P	S	R	S	A	I	M	T	G	R	100	551
SARS	C	T	P	S	R	S	A	I	V	T	G	R	115	567
HpSulf1	C	T	P	T	R	S	Q	L	M	S	G	R	80	508
PGSS	C	S	P	A	R	T	A	V	L	T	G	K	70	532
CARS	C	C	P	S	R	T	N	L	C	A	A	S	73	646
NARS	C	C	P	A	R	V	S	L	W	T	G	K	89	639
VARS	C	C	P	S	R	T	N	L	W	R	G	Q	72	649
Sulfatasas de procariontes														
FHS2S	C	T	P	S	R	S	A	I	F	S	G	K	82	464
KARS	S	A	P	A	R	S	M	L	L	T	G	N	72	577
PARS	C	S	P	T	R	S	M	L	L	T	G	T	51	533
PMdS	S	T	P	A	R	A	C	L	L	T	G	L	79	517
SChoS	C	A	P	A	R	A	S	F	M	A	G	Q	54	512

Figura 10. Alineamiento de secuencias de sulfatasas procariontes y eucariotas. Residuos altamente conservados se muestran en letras blancas con fondo negro; residuos significativamente conservados se muestran con fondo gris. Modificada de [28].

La segunda característica estructural que comparten las sulfatasas es el porcentaje de similitud entre ellas. Entre ellas comparten desde un 20% hasta un 60% de homología, lo cual sugiere que todas provienen de un ancestro en común, que comparten el plegamiento, así como el sitio activo [28].

Otra característica importante que comparten es la actividad promiscua que ejercen este tipo de enzimas. Su reacción fisiológica se encarga de la hidrólisis de distintos ésteres de sulfato, pero se ha visto que también pueden actuar como fosfatasas incipientes. [31,32]

3.4.1. Sulfatasas de interés para la salud humana.

La deficiencia múltiple de sulfatasas es un desorden hereditario que se caracteriza por la ausencia de actividad de distintas sulfatasas resultante de mutaciones que impiden el desarrollo de las enzimas generadoras de formilglucosamina (FGE) y la acumulación de glucosaminoglicanos, esfingolípidos y sulfatos esteroideos en tejidos y fluidos corporales [33]. Entre los síntomas que presentan quienes padecen esta enfermedad se encuentran encefalopatía, ceguera, pérdida auditiva, ictiosis, articulaciones rígidas, retraso del crecimiento y anomalías esqueléticas. Uno de los estudios que se realizan habitualmente para diagnosticar esta enfermedad en niños pequeños es la cuantificación de mucopolisacáridos urinarios como heparán sulfato, dermatán sulfato y condroitina sulfato C. Algunos de estos compuestos se reportan como sustratos fisiológicos de las sulfatasas humanas [28] por lo que el aumento de estos compuestos en la orina significa la presencia de sulfatasas no activas.

Existen también reportes que asocian la actividad de la estrona sulfatasa humana al desarrollo de cáncer de mama [28, 34] y se ha propuesto a esta enzima como blanco terapéutico contra el desarrollo de esta enfermedad [34, 35].

Otro ejemplo de la importancia de las sulfatasas en la salud humana, se encuentra el caso de la bacteria de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*: según el reporte del 2016 de la OMS respecto a las 10 principales causas de muerte a nivel mundial [36], la tuberculosis se encuentra en esta lista con 1.3 millones de fallecimientos al año. La vía de asimilación de sulfato de esta bacteria está íntimamente ligada a la acción catalítica de sus sulfatasas, las cuales proveen a la bacteria de compuestos importantes para su patogénesis y sobrevivencia. Además, esta vía se encuentra regulada por otras enzimas que se encargan de la entrada o salida de compuestos con azufre en la célula [25]. En este mismo reporte, se sugiere que las sulfatasas son capaces de redirigir la biosíntesis de compuestos con azufre dependiendo de las necesidades de la bacteria. En otras palabras, las sulfatasas activas de esta bacteria juegan un papel importante en las muertes causadas mundialmente por dicha infección.

3.4.2. Sulfatasa de *Pseudomonas aeruginosa*

La sulfatasa de *Pseudomonas aeruginosa* ha sido purificada y se ha obtenido su estructura cristalina encontrándose que tiene alta similitud en su plegamiento con dos sulfatasas humanas, ASA y ASB [37].

En las bacterias, así como *P. aeruginosa*, la principal función de las sulfatasas es proveer a la bacteria de azufre (elemento que necesitan para su crecimiento), mediante la liberación de sulfatos que vienen de ésteres de sulfato [37].

Estudiar a las sulfatasas utilizando como modelo la arilsulfatasa de *Pseudomonas aeruginosa* es útil por las similitudes entre las sulfatasas humanas y bacteriales conocidas hasta la fecha, que se mencionaron en la sección 3.4. "Sulfatasas". Estas similitudes son aún más relevantes si se considera que la expresión de alguna sulfatasa humana, por ejemplo, no es posible llevarla a cabo

en células de *E. coli* debido a los diferentes grupos de enzimas generadores de la modificación postraducciona [29,30]. La expresión recombinante de las sulfatasas humanas se ha reportado en células de ovario de hámster chino (CHO) [58].

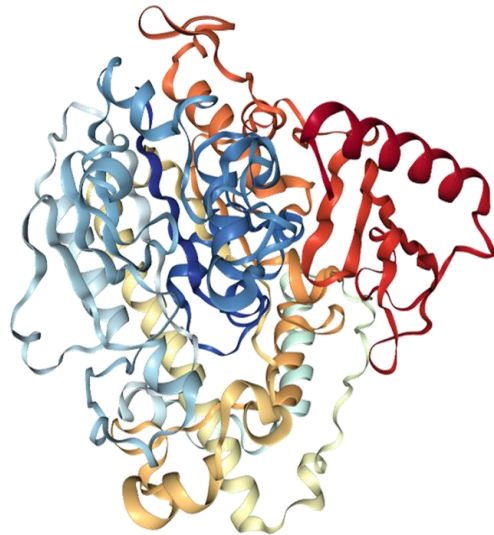


Figura 11. Arilsulfatasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 1HDH).

4. Desarrollo experimental

4.1. Transformación de *E. coli* y expresión de la proteína.

El plásmido pRSFDuet-1-PAS fue transformado en bacterias de *Escherichia coli* BL21 Codon Plus (DE3)-RIL químicamente competentes [38] y se utilizó un medio adicionado con kanamicina 75 µg/mL para seleccionar a las bacterias que habían incorporado el plásmido.

Se incubó una de las colonias de células transformadas en 25 mL de medio LB, adicionado con kanamicina (75 µg/mL) y glucosa (1% m/v) durante una noche a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, estas células se centrifugaron y resuspendieron en el mismo volumen de medio LB fresco dos veces. Se tomó una alícuota de 500 µL para inocular 250 mL de medio LB adicionado únicamente con kanamicina (75 µg/mL). Este cultivo se incubó hasta que la OD₆₀₀ fue de 0.7, se añadió IPTG hasta una concentración final de 0.4 mM y se tomó una alícuota al t=0 (antes de añadir IPTG) y se incubó toda la noche. Al día siguiente, se tomó una nueva alícuota (t=24 horas). Estas muestras se centrifugaron enseguida de colectarlas, se desechó el sobrenadante y se congeló el pellet para analizarlo posteriormente, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Una vez pasadas 24 horas desde la adición de IPTG, el cultivo se centrifugó para eliminar el medio de cultivo y el pellet se almacenó a -20°C. La presencia de la proteína de interés se corroboró mediante un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y una prueba cualitativa con p-nitrofenilsulfato en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 8 (ver sección 5.1 “Transformación de bacterias de *E. coli* con el plásmido pRSFDuet-1-PAS y expresión recombinante de la enzima arilsulfatasa de *P. aeruginosa*”).

4.2. Purificación de la proteína

Una vez que se comprobó que la proteína estaba presente y activa, se procedió a realizar la lisis celular, previa resuspensión del pellet en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 8, mediante sonicación (Sonic Vibra-Cell™ VCX 130) durante 5 minutos, con intervalos de sonicación de 30 segundos y 30 segundos de descanso. La temperatura de la muestra se mantuvo a 0°C durante todo el proceso. El lisado obtenido se centrifugó durante 40 minutos a 8000 xg. Al finalizar este tiempo, se desechó la fracción insoluble.

La fracción soluble obtenida después de lisar el pellet obtenido de la expresión se hizo pasar a través de una columna de intercambio iónico, HiTrap Q HP (GE Healthcare), de 1 mL. La muestra se cargó en la columna y se lavó con 5 mL del mismo buffer en el que se encontraba la muestra. La elución de la proteína PAS inició al hacer pasar a través de la columna buffer Tris-HCl, pH 8 con NaCl 100 mM; de estos lavados, se obtuvieron 24 eluatos de 1.5 mL cada uno. Posteriormente, la columna se lavó con el mismo buffer cambiando la concentración de NaCl a 200 mM; de estos lavados, se obtuvieron 6 eluatos de 1.5 mL cada uno. Por último, las proteínas restantes se eluyeron con NaCl 400 mM (5 eluatos de 1.5 mL cada uno). A cada eluato se le hizo una prueba con pNPS para corroborar si la proteína estaba presente o no, incluyendo las fracciones resultantes del lavado de la columna. Un cambio de color de incoloro a amarillo indicaba la presencia de la enzima PAS.

4.3. Determinación de la concentración total de proteína en distintos eluatos

Para esta determinación se utilizó el reactivo de Bradford (Sigma Aldrich), utilizando 1 mL del reactivo y 33.4 µL de muestra. La mezcla se dejó reposar por 20 minutos, tiempo en el que el complejo es aún estable. La absorbancia se midió a 280 nm en un espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent Tech).

La curva de calibración se realizó utilizando albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones desde 0 a 1.5 mg/mL. La BSA fue preparado en el mismo buffer, Tris-HCl 100 mM, pH 8, en el que se encontraba la muestra.

4.4. Determinación de la actividad específica de PAS en distintos eluatos

Una vez conocida la cantidad de proteína total en cada fracción, se determinó cuánta de esa proteína correspondía a la enzima PAS. Para esto, se determinó la velocidad inicial de cada eluato y el extracto crudo utilizando 4-MUS en concentración 60 μ M. La reacción fue seguida a 370 nm en el espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent Tech). Fue necesario diluir tanto los eluatos como el extracto crudo, de tal forma que cada uno de ellos estuviera en una concentración 200 veces menor que la original dentro de la celda en la que se llevaron a cabo los ensayos. Los resultados obtenidos de velocidad inicial (μ mol/L/min) se dividieron entre la concentración de proteína total (mg proteína/L) obtenida mediante el experimento con el reactivo de Bradford para conocer la actividad específica en U/mg proteína en donde U es la cantidad de enzima que hidroliza un μ mol de 4-MUS por minuto a 25°C. Finalmente, se juntaron todos los eluatos que tuvieran la misma, o parecida, actividad específica.

4.5. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Para preparar las muestras, se descongeló cada pellet de las alícuotas necesarias y se le añadió un volumen equivalente de buffer SDS-PAGE 2x con 0.015 mg/mL de DTT. Cada pellet se disolvió agitando brevemente utilizando un vórtex, se calentaron en un baño María en ebullición durante 5 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de cargarlas a los pozos (20 μ L).

El análisis se llevó a cabo utilizando un equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell de BIO RAD. El gel se preparó utilizando dos capas distintas. La primera capa corresponde al gel concentrador y la segunda al gel separador.

Las concentraciones de cada componente del gel se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Componentes del gel de poliacrilamida y sus concentraciones.

Componentes	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida 40% (mL)	2.5	0.5
Tris pH 8.8, 1.5 M (mL)	2.5	_____
Tris pH 6.8, 0.5 M (mL)	_____	0.5
SDS 10% (μL)	100	50
PSA 10% (μL)	50	50
TEMED (μL)	10	10
H ₂ O (mL)	4.9	3.9

Se utilizaron 3 μL de marcador BLUEstain™ 3 Protein Ladder en el primer carril y 20 μL de muestra en cada uno de los pozos siguientes. El gel se dejó correr a 120 V durante 120 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se tiñó durante 30 minutos utilizando una disolución con 0.3% (m/v) de azul brillante coomassie, 45% (v/v) etanol y 10% (v/v) de ácido acético glacial. Para desteñir, se utilizó una disolución 20% (v/v) etanol y 10% (v/v) ácido acético glacial durante toda la noche.

Las muestras que se sometieron a este proceso fueron aquellas resultantes del proceso de expresión de la proteína (al tiempo cero y después de incubar la muestra durante toda la noche) así como distintos eluatos obtenidos de la purificación de la enzima.

4.6. Determinación de la K_m de la proteína purificada

Una vez que se determinó cuáles fracciones tenían una actividad específica más parecida, se procedió a mezclarlas obteniéndose un total de 36 mL de muestra.

Para probar la actividad catalítica de la proteína PAS se utilizaron dos sustratos por separado: p-nitrofenil sulfato (pNPS) y 4-metilumbeliferil sulfato (4-MUS) en concentraciones desde 6.0-78.0 μM y 5.0-60.0 μM , respectivamente. Los ensayos se realizaron en buffer Tris-HCl, 0.2% BSA, pH 8 a 25°C, en un volumen de reacción de 100 μL y utilizando espectrofotometría UV-Visible (Varian Cary 50, Agilent Tech). Todos los ensayos realizados en el espectrofotómetro fueron realizados utilizando este mismo buffer, (a excepción de los ensayos para la determinación de proteína total, en los que se excluyó la presencia de BSA), al que de ahora en adelante me referiré únicamente como buffer Tris-HCl. Los ensayos se realizaron de tal forma que la enzima quedara en concentración 5.79, nM al interior de la celda de reacción. Esta concentración fue calculada mediante la ecuación que relaciona la velocidad máxima, medida en la sección 5.5 “Determinación de las constantes cinéticas K_M ” con la concentración de enzima y el valor de K_{cat} reportado [31] utilizando como sustrato pNPS. La reacción se monitoreó cuantificando la presencia de los productos, p-nitrofenol y 4-metilumbeliferona, midiendo la absorbancia a 400 nm y 370 nm respectivamente, y previa obtención de la curva patrón para cada uno de estos productos.

4.7. Determinación de la estabilidad de la proteína en presencia de disolventes orgánicos

Se plantea como perspectiva de este trabajo acoplar los ensayos enzimáticos a un equipo de HPLC de tal forma que sea posible separar un extracto natural en sus diferentes componentes y así identificar cuál, o cuáles, de todos ellos presenta un efecto inhibitorio sobre la enzima. Para lograr este objetivo es necesario conocer primero el comportamiento de la enzima PAS de los disolventes orgánicos más comúnmente utilizados al separar compuestos mediante HPLC. Los disolventes probados fueron metanol y acetonitrilo en concentraciones desde 5%-30% (v/v). Como en los ensayos anteriores, se usó la proteína PAS en concentración 5.79 nM dentro de la celda. Como sustrato se utilizó 4-MUS en concentración 15 μ M y la reacción se siguió a 370 nm.

4.8. Inhibición enzimática aprovechando la actividad promiscua de la enzima PAS.

Para tener un control positivo sobre la inhibición de la enzima PAS se utilizó el compuesto p-nitrofenil fosfato (pNPP) el cual es hidrolizado extremadamente lento por PAS, [31] de tal forma que actúa como un inhibidor competitivo en un ensayo de actividad de sulfatasa [59]. En este caso, se utilizó el sustrato pNPS en concentración 12.5 μ M, mientras que el pNPP se utilizó en concentración 3.3 mM. Los ensayos se realizaron en el buffer Tris-HCl a 25°C, en un volumen de reacción de 100 μ L y utilizando espectrofotometría UV-Visible. La concentración de enzima utilizada fue 5.79 nM al interior de la celda de reacción. La reacción se monitoreó cuantificando la presencia del producto p-nitrofenol, midiendo la absorbancia a 400 nm.

4.9. Fabricación de los microchips

4.9.1. Diseño del microchip

El diseño del microchip usado en los ensayos de inhibición se realizó utilizando Adobe Illustrator C56. El diseño de este microchip se basó en trabajos anteriores realizados en el mismo grupo de trabajo [3] y se realizaron solo pequeñas modificaciones explicadas en la sección de resultados y discusión.

Los canales se diseñaron para tener 150 μm de ancho por 100 μm de alto. Una vez terminado el diseño con el software mencionado, este se imprimió en acetato para negativo (Gráficos Digitales Denver, Cd.Mx.). Esta impresión sirvió para transferir el diseño al molde que a su vez permite la fabricación de las réplicas en PDMS. El perfil que tiene la impresión en negativo se muestra en la Figura 12.



Figura 12. Representación del acetato en negativo que contiene el diseño del microchip vista lateralmente. Los rectángulos blancos representan las secciones donde hay canales mientras que los negros representan los espacios donde no los hay.

4.9.2. Fabricación del molde

Para la fabricación del molde se utilizó la resina fotosensible SU-8 2035, una oblea de silicio de 3.81 cm de radio (Silicon Valley Microelectronics) y la impresión en acetato para negativo en la que se imprimió el diseño del microchip. A continuación, se describe cada uno de los pasos:

1. Eliminación del agua adsorbida en la oblea. Se colocó la oblea en una parrilla, a 200°C, durante 5 minutos.

2. Revestimiento por rotación (Spin coating). Se fijó la oblea sobre el *spin coater* mediante vacío. Se agregaron aproximadamente 3 mL de resina y se usó un programa en dos tiempos:
 - a) 10 segundos a 500 rpm, aceleración 100 rpm.
 - b) 30 segundos a 2000 rpm, aceleración 300 rpm.
3. Calentamiento suave. Se colocó la oblea en una parrilla a 105°C durante 20 minutos.
4. Se repitieron los pasos 2 y 3 una vez más con el objetivo de formar una capa de 100 μm de espesor.
5. Exposición UV. Se alineó la oblea con la máscara de acetato que contiene impreso el patrón del microchip y se colocó bajo la lámpara UV durante 45 segundos.

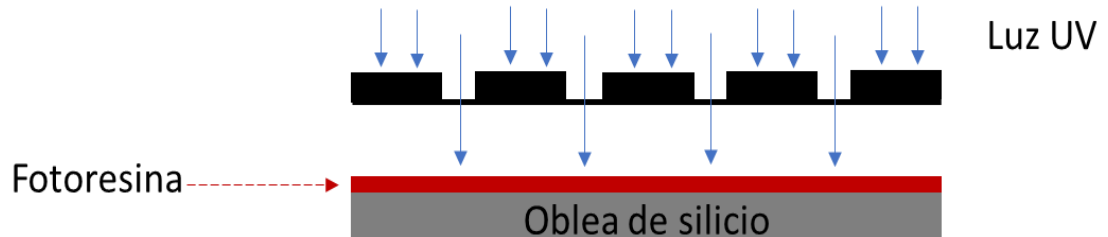


Figura 13. Representación del acetato en negativo que contiene el diseño del microchip al exponerlo a la luz UV junto con la oblea de silicio que contiene la resina fotosensible (en rojo). La radiación pasa solamente en las secciones blancas, que corresponden a los canales del diseño.

6. Calentamiento post-exposición. Se colocó la oblea en una parrilla a 75°C durante 1 minuto. Pasado este tiempo, se transfirió a otra parrilla a 105°C durante 5 minutos.

7. Revelado. Se sumergió la oblea en revelador (1-metoxi-2-propanol acetato) y se agitó manualmente. Para comprobar si la resina no polimerizada había sido completamente eliminada se añadió isopropanol. Éste no debía adquirir apariencia lechosa si la resina no polimerizada había sido completamente eliminada.



Figura 14. Representación de la oblea de silicio junto con la resina fotosensible después del calentamiento y revelado. Las secciones anaranjadas representan la resina fotosensible ya polimerizada, Estas estructuras servirán como molde para formar microcanales en el próximo paso.

8. Se enjuagó la oblea con isopropanol
9. Calentamiento post-enjuague. Se colocó la oblea en parrilla a 200°C durante 5 minutos.
10. La oblea se colocó en una caja Petri para preparar las réplicas en PDMS.

4.9.3. Obtención de réplicas de PDMS

1. Se pesaron 30 g de prepolímero PDMS (Sylgard 184, Silicone Elastomer base, Dow Corning) y se añadió 8.0 % (m/m) de agente curante (Sylgard 184, Silicone elastomer curing agent, Dow Corning). La mezcla se agitó hasta que se observó que ambos componentes se encontraban bien mezclados.

2. La mezcla prepolímero PDMS-agente curante se colocó en la caja Petri que contenía la oblea con el diseño del microchip y se colocó en un desecador con vacío hasta eliminar todas las burbujas de aire existentes.

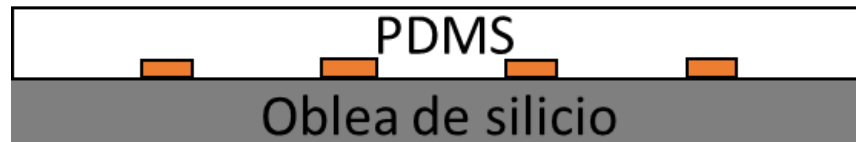


Figura 15. Fabricación de la réplica de PDMS. Se observa el molde (oblea de silicio con resina fotosensible polimerizada) junto con el prepolímero del PDMS.

3. Una vez eliminadas las burbujas de aire, se colocó la caja Petri en un horno a 70°C durante 3 horas para favorecer el proceso de polimerización.
4. Una vez polimerizado el PDMS, se cortó con un bisturí la sección del PDMS que contiene el diseño y se despegó con ayuda de una espátula. A esta sección de PDMS es a la que se llama microchip, durante todo el trabajo. La oblea de silicio se reutilizó para obtener las réplicas necesarias.



Figura 16. Representación del microchip obtenido al polimerizarse el PDMS y separarlo de la oblea de silicio.

5. Las entradas de la fase acuosa y orgánica, así como la salida de estas disoluciones se perforaron con un punzón (Electron Microscopy Sciences), con diámetro 0.75 mm.

- Finalmente, el microchip fue adherido a un portaobjetos de vidrio utilizando plasma (Corona Treater, BD-20AC, Electro-Technic Products).



Figura 17. Representación de la réplica de PDMS adherida al portaobjetos de vidrio.

La superficie del vidrio se trató con este plasma durante 60 segundos mientras que al PDMS se aplicó el plasma del lado que contiene el diseño durante 20 segundos. Una vez transcurrido este tiempo se unieron ambas superficies verificando que no quedaran burbujas de aire y se colocaron en un horno a 70°C durante 24 horas. Este proceso se observa en la Figura 18.

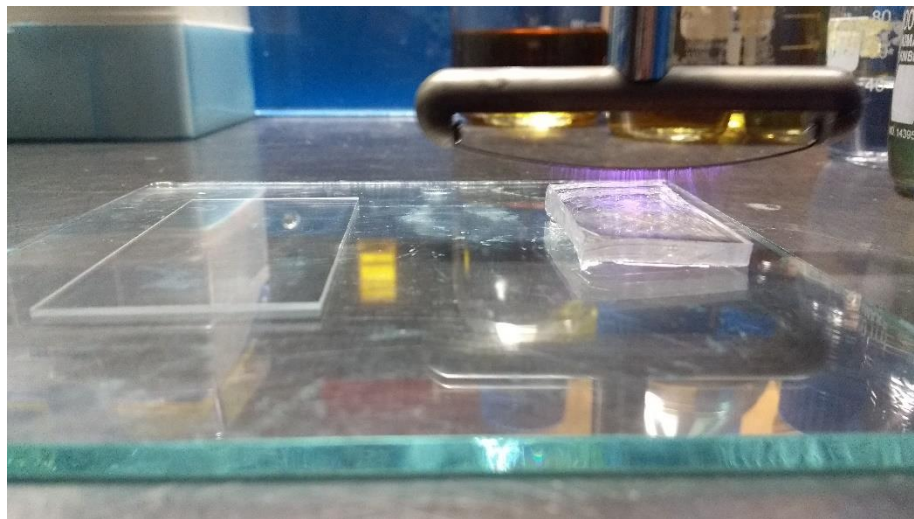


Figura 18. Tratamiento de la superficie del vidrio (izquierda) y el microchip de PDMS (derecha) con plasma de oxígeno (rayo morado que se desprende del arco).

4.9.4. Caracterización del microchip de PDMS

Se realizó utilizando una retícula de 5 mm con 100 divisiones de 50 μm cada una y utilizando el objetivo 20x del microscopio. A esta retícula se le tomó una foto, con ayuda de una cámara Phantom y el software PCC 2.2.

Se hizo un corte al microchip de PDMS como se observa en la Figura 19, de tal forma que se obtuvo una sección muy delgada del chip. El corte se hizo en diagonal cuidando que éste pasara por el centro del fractal asegurando así analizar la mayor cantidad de canales posible. Esta sección se observó en el microscopio también con el objetivo 20x. De la misma forma que se hizo con la retícula, se tomaron fotos del microchip en donde se encontraban los canales.

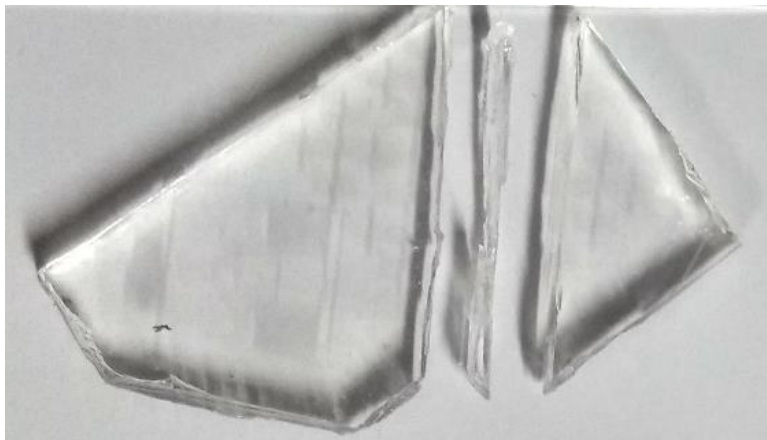


Figura 19. Fotografía del microchip cortado en tres secciones, la más delgada de éstas es la que se analiza para obtener las dimensiones de los canales.

Posteriormente, con el software ImageJ se determinó a cuántos píxeles equivalían 10 divisiones de la retícula (500 μm). Con esta calibración, se prosiguió analizando las fotografías de los canales de interés midiendo tanto el ancho como el alto de cada canal.

4.10. Reacciones enzimáticas dentro del microchip

Para que se formen las microgotas en las cuales se llevan a cabo los ensayos enzimáticos, se utilizó un microchip con un diseño que permitiera intersectar una disolución acuosa con una fase orgánica (que puede ser aceite mineral o aceite fluorinado). El flujo de esta última fase debe ser igual o mayor para provocar la formación de las microgotas. En la Figura 20 se observa el sistema de introducción de disoluciones del microchip. Este diseño cuenta con tres entradas independientes para la fase acuosa, cuyos flujos se unen poco antes de ser intersectados por la fase orgánica. La composición de la fase acuosa depende del tipo de ensayo que se realice, ya sea un blanco, la curva de calibración o los experimentos de inhibición.

En el trabajo aquí descrito la fase orgánica consistió en aceite fluorinado (HFE-7500 3M, Novec) con 0.4% m/m de tensoactivo sintetizado en el laboratorio. Este tensoactivo proviene de la unión química de Krytox 157 FSH (DuPont) y Jeffamina ED 900 (Sigma Aldrich).

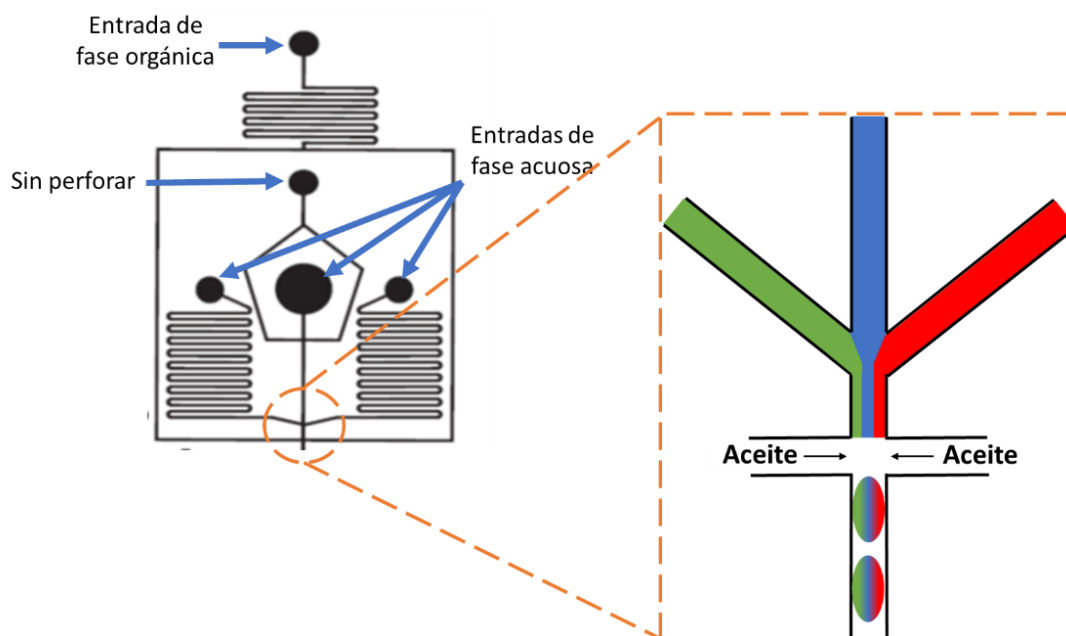


Figura 20. Diseño del microchip para la introducción de disoluciones y formación de las microgotas. En el acercamiento se observa la entrada de tres disoluciones acuosas independientes y su posterior intersección con la fase orgánica.

Como se puede observar en la Figura 20, cada una de las disoluciones en fase acuosa se diluye al mezclarse con las otras dos, por lo que el flujo con el que se introduce cada una de estas disoluciones es importante. Si uno de los flujos cambia, la concentración de cada componente en las microgotas también lo hará. En este trabajo se usó un flujo constante de $60 \mu\text{L/h}$ para cada disolución en fase acuosa, por lo que la concentración en las microgotas es de un tercio de la concentración original, tal como se representa en la Figura 20 con cada color ocupando un tercio del canal. Por otro lado, la fase orgánica se introdujo a $250 \mu\text{L/h}$.

También, se observa en la Figura 20 que un orificio del microchip se encuentra sin perforar y que una de las entradas puede ser perforada con un punzón más grande que el de las otras dos, y que es precisamente esta entrada la que no cuenta con un canal en forma de serpentin. La explicación de estos detalles se encuentra más adelante, en la sección 5.7, "Diseño del microchip"

Cada una de las disoluciones fue introducida al microchip mediante jeringas de diámetro conocido, bombas de jeringa (NE-1002X, New Era) y tubería (PTFE #24, Cole Parmer), como se muestra en la Figura 21.

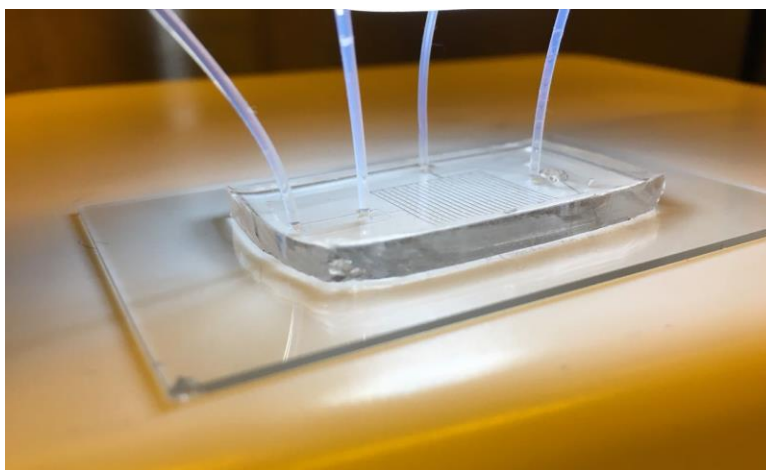


Figura 21. Microchip fabricado en el laboratorio conectado con tuberías PTFE.

Una vez formadas, las microgotas recorren un canal en forma de fractal (Figura 22). Este diseño se debe a que así es posible tener en un área pequeña, en el centro del chip, en el que coinciden cuatro segmentos del canal (canales a, b, c, d) con muy diferentes distancias de recorrido (14, 39, 64 y 88% de la longitud total del fractal). Como dentro de cada microgota estará ocurriendo una reacción enzimática independiente pero equivalente a las otras, estas diferentes distancias de recorrido se traducen en distintos grados de avance de la reacción. Esta área pequeña en el centro del chip cabe en el campo visual del microscopio y entonces cuatro diferentes tiempos de reacción pueden ser estudiados simultáneamente en una misma imagen.

El avance de cada reacción puede ser también monitoreado en otras cruces del microchip. En este trabajo fue monitoreado en tres distintas cruces del microchip (Figura 22), lo cual equivale a 12 puntos distintos en total.

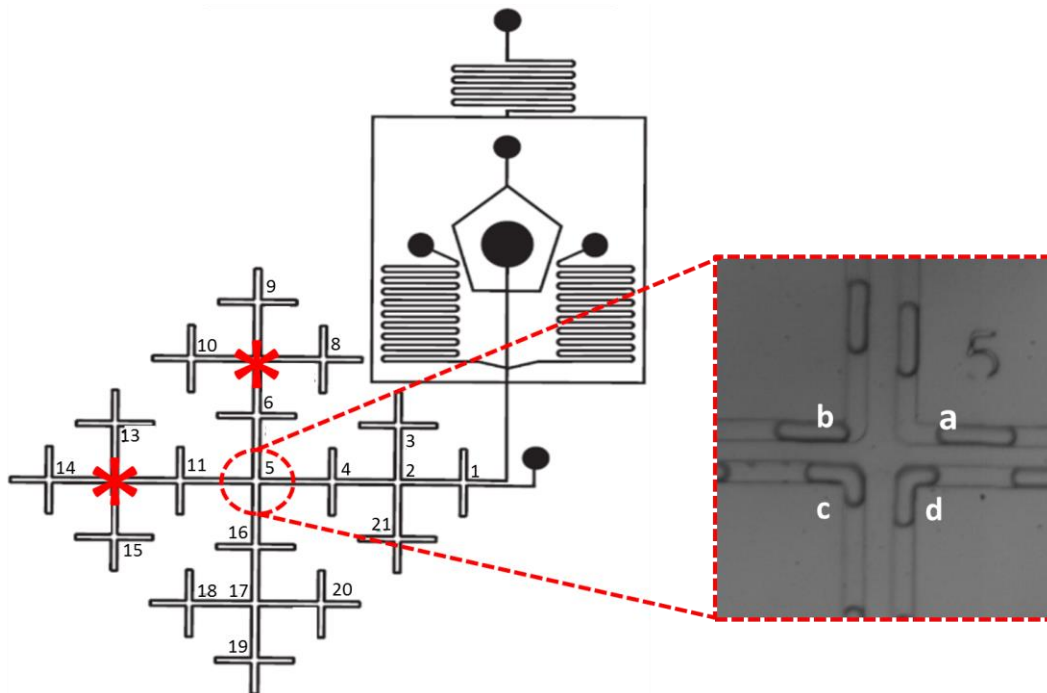


Figura 22. Diseño del microchip con el canal en forma de fractal. También se muestra un acercamiento a la cruz 5 en el centro del microchip. En éste se observan las microgotas recorriendo los canales (a, b, c y d señalados con letras blancas). Las zonas marcadas con asteriscos rojos corresponden a las cruces 7 y 12, en las que también (además de la cruz 5), se siguió el avance de la reacción.

4.10.1. Cámara Phantom

Los experimentos realizados en el microchip fueron grabados con una cámara Phantom (Miro M110, AMETEK), la cual es una cámara de alta velocidad. Este tipo de cámaras son usadas para grabar objetos que se mueven rápidamente como imágenes fotográficas. El modelo usado en este trabajo es capaz de grabar hasta 1600 cps a su máxima resolución, 1280x800 píxeles o hasta 400000 cps a una resolución mucho menor.

Los parámetros de mayor importancia durante la grabación de los experimentos aquí descritos son tres:

1. Resolución. Este parámetro se refiere a la nitidez o calidad visual de una imagen. Entre mayor sea este parámetro, mejor la calidad de la imagen.
2. Tiempo de exposición. Es el tiempo que el obturador de la cámara permanece abierto, limitando así la cantidad de luz que llega al sensor por cada cuadro fotográfico tomado.
3. Velocidad de captura. Se refiere al número de cuadros por segundo (cps) que toma la cámara.

Para los experimentos de inhibición enzimática realizados en el microchip se tomaron 3,000 fotografías en un periodo de 10 minutos con una resolución de 640x480 píxeles, tiempo de exposición de 39,583.33 μ s y a una frecuencia de 5 cuadros (fotos) por segundo (5 cps). Mientras que para los experimentos clasificados como “blancos” se tomaron 1,500 fotografías durante 5 minutos bajo las mismas condiciones que las anteriormente mencionados. El software mediante el que se controlan todos estos parámetros es conocido como PCC 2.2. Dichos parámetros fueron escogidos cuidando que la memoria de la cámara fuera capaz de almacenar un vídeo tomado durante 30 minutos (tiempo aproximado para completar una corrida de HPLC, ver justificación en sección

5.7. “Diseño del microchip”). A frecuencias (cps) y resoluciones más altas el tiempo de grabación se reduce hasta el grado de hacer imposible la grabación de un vídeo de más de 5 minutos.

4.10.2. Medición de fluorescencia de las microgotas

El avance de las reacciones enzimáticas dentro de las microgotas fue medido a través del aumento de la fluorescencia generada por el producto de la reacción 4-metilumbeliferona, 4-MU. Los espectros de absorción y emisión de esta molécula se muestran en la siguiente figura:

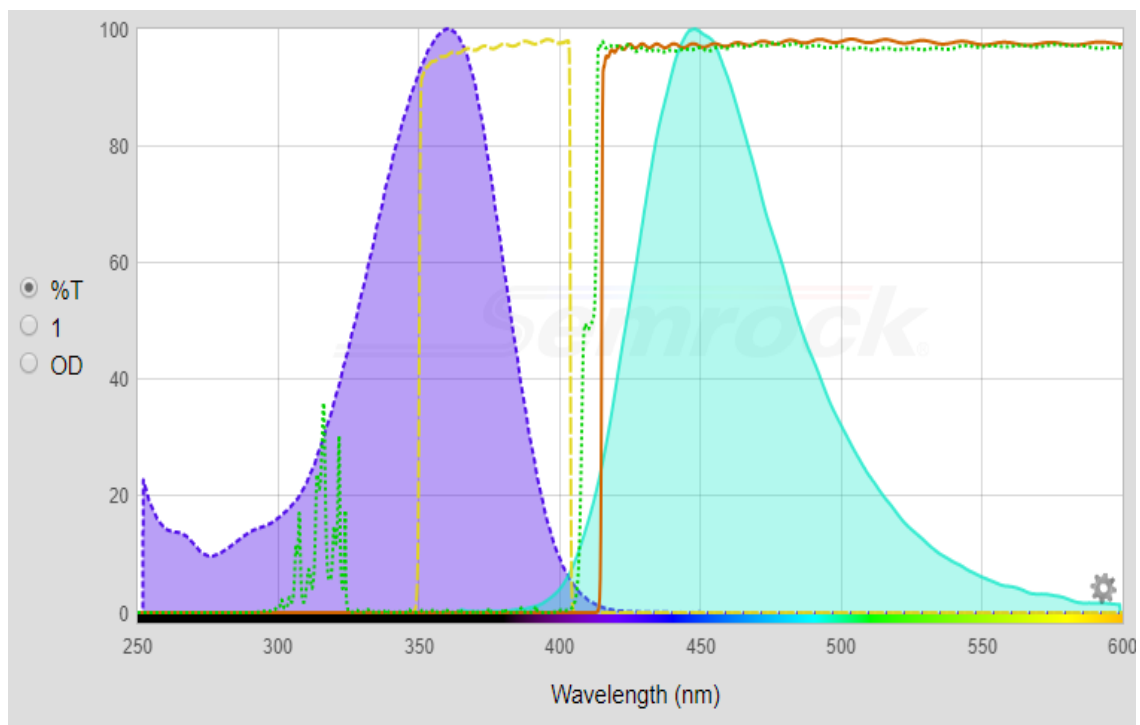


Figura 23. Espectro de absorción (morado) y emisión (azul) de la 4-metilumbeliferona, 4-MU. La línea amarilla muestra las longitudes de onda que abarca el filtro de excitación mientras que las líneas anaranjada y verde corresponden a las longitudes de onda que dejan pasar el filtro de emisión y el espejo dicróico, respectivamente.

La luz generada para excitar la molécula de interés proviene de una lámpara (PhotoFluor II, Chroma, 89 North) que genera luz con longitudes de onda que abarcan desde el visible hasta el ultravioleta (340-800 nm). Para filtrar la luz generada de esta lámpara se utilizó un juego de filtros (DAPI-50LP-A, Semrock) que consiste en tres componentes:

- Filtro de excitación. Este filtro permite el paso de luz con longitudes de onda entre 352-402 nm. En la Figura 23 se observa que el espectro de transmitancia de este filtro (línea amarilla punteada) se encuentra en la región en la que el espectro de absorción de la 4-MU tiene su punto máximo.
- Espejo dicroico. Refleja hacia la muestra la luz que pasa a través del filtro de excitación y se encarga también de transmitir la luz emitida por la muestra hacia el filtro de emisión (cuya longitud de onda es mayor a 409 nm). El espectro de transmitancia de este componente se encuentra representado por la línea verde punteada en la Figura 23.
- Filtro de emisión. Este filtro permite el paso de luz con longitudes de onda mayores a 409 nm (línea anaranjada de la Figura 23), por lo que permite detectar la fluorescencia generada por la molécula de interés. Este filtro se encarga también de separar la luz generada por la muestra de otra luz del fondo.

4.10.3. Medición de la reacción enzimática de sulfatasa sin ningún inhibidor

La caracterización de un control en el que la sulfatasa funcione normalmente, sin la presencia de ningún inhibidor, se llevó a cabo utilizando el arreglo experimental mostrado en la Figura 24.

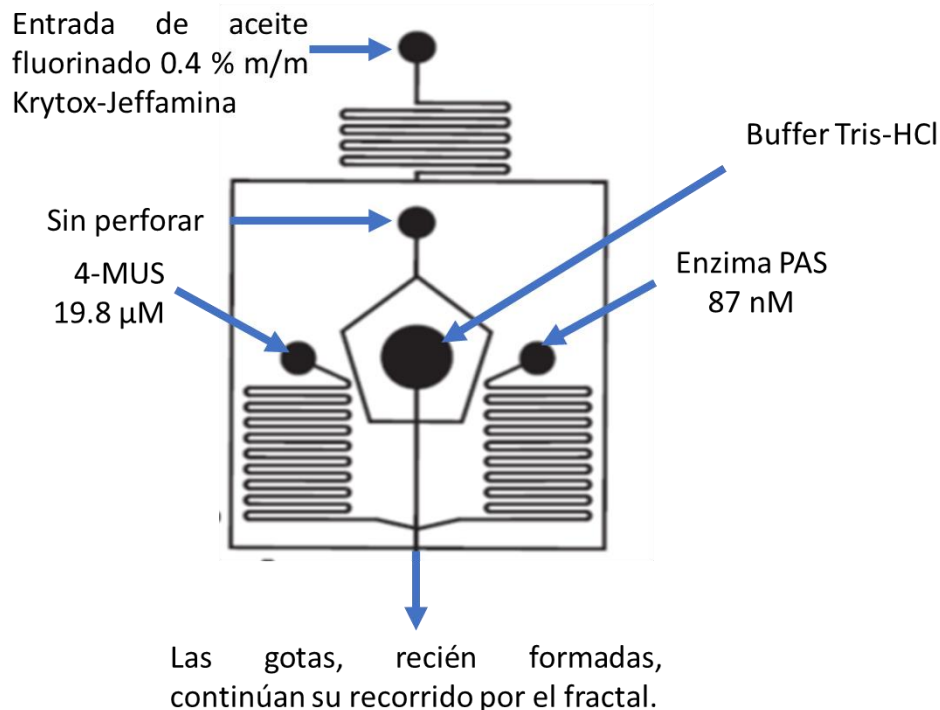


Figura 24. Introducción de disoluciones para el control negativo de los experimentos de inhibición.

En este experimento, así como en los siguientes, la fase orgánica consistió en aceite fluorinado (HFE-7500 3M, Novec) con 0.4% m/m de tensoactivo sintetizado en el laboratorio. Este tensoactivo proviene de la unión química de Krytox 157 FSH (DuPont) y Jeffamina ED 900 (Sigma Aldrich). Esta fase fue introducida a 250 $\mu\text{L}/\text{h}$.

El buffer Tris-HCl 100 mM, 0.2% m/m BSA, pH 8 se preparó pesando 6.0570 g de Tris (Sigma Aldrich), 0.1000 g de BSA (Sigma Aldrich), agregando 40 mL de agua y ajustando el pH con HCl hasta que éste fuera igual a 8.0; después la disolución fue llevada a 50 mL. A partir de este momento, las referencias a este buffer se harán llamándolo solamente buffer Tris-HCl.

Para preparar la disolución de 4-MUS, se pesaron 44.15 mg de 4-MUS (Sigma Aldrich) y se agregó 1 mL buffer Tris-HCl para obtener una disolución de concentración 150 mM. De este stock se preparó una disolución 1 mM al añadir 7 μL del stock a 993 μL del buffer; a partir de esta disolución se preparó la disolución

con concentración 19.8 μM que se utilizó en los experimentos en el microchip (19.8 μL de la disolución de concentración 1 mM y 980.2 μL de buffer).

La disolución de enzima PAS se preparó al diluir 75 μL de enzima PAS obtenida de la purificación con 925 μL de buffer Tris-HCl, obteniéndose una concentración final de 87 nM de enzima.

Tanto la disolución de 4-MUS y de la enzima fueron preparadas de la misma manera en los siguientes experimentos.

También se realizó un experimento llamado “Blanco” en el cual se cambió la enzima PAS por la disolución de buffer Tris-HCl. Esto para conocer la cantidad de luz reflejada o transmitida que entra al microchip y que no es debida a la reacción enzimática.

4.10.4. Análisis de imágenes

Las secuencias de fotografías resultantes de cada experimento se analizaron con dos softwares distintos. El primero de ellos es Matlab y sirvió para analizar la fluorescencia de las microgotas. Para esto, una vez grabadas las fotos, es necesario dibujar áreas de interés en las que el software analizará la cantidad de luz (medida en una escala de grises) en cada microcanal. En la Figura 25, se han dibujado estas áreas con líneas punteadas rojas.

En la Figura 25-I se observa que hay una gota cubriendo completamente cada una de las áreas de interés, mientras que en la segunda fotografía (Figura 25-II), en el canal “b” no hay ninguna gota dentro del área de análisis y en el canal “d” sólo la mitad de la gota está dentro de esta área. Esta observación cobrará relevancia al observar la Figura 26 y justifica el uso del segundo software de análisis: Mathematica.

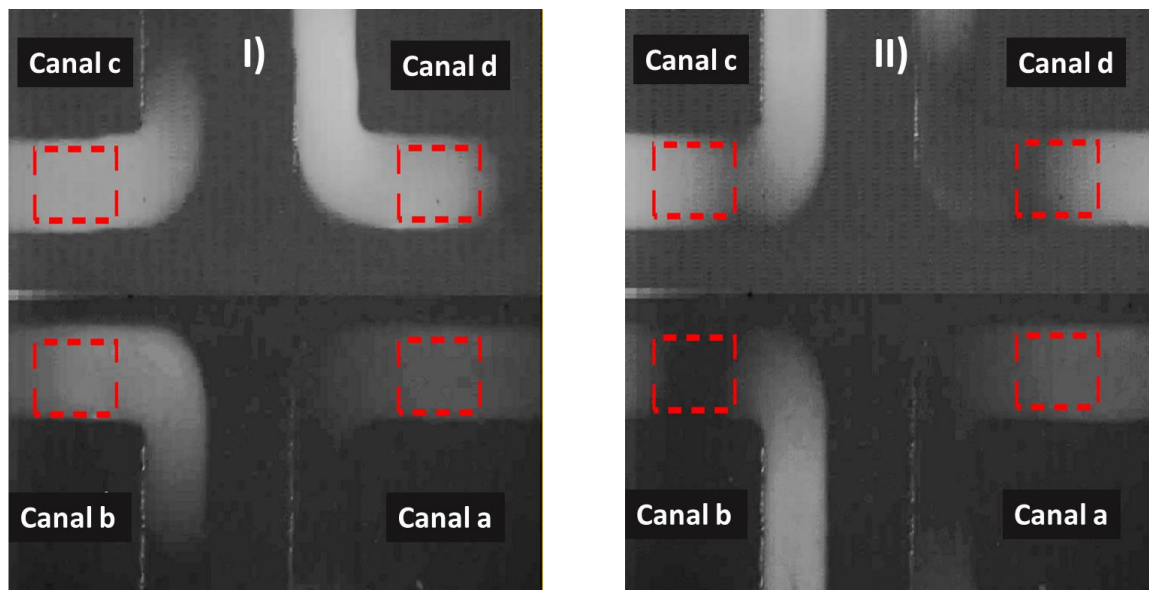


Figura 25. Fotografías de los 4 canales de la cruz 5. En cada uno de ellos se observa que pasa una microgota, o parte de ella, con el producto 4-MU. Así, el canal a tiene la microgota con la menor cantidad de producto fluorescente mientras que el canal d, es el que tiene la mayor concentración de este producto. Esta diferencia es debida al avance en la hidrólisis del sustrato 4-MUS llevada a cabo por la enzima PAS.

Continuando con los resultados del análisis en Matlab, las gráficas obtenidas son del tipo mostrado en la Figura 26. En dicha figura se observa una gráfica con las Unidades de Intensidad Relativa de Fluorescencia (URF) que se obtienen del software Matlab al analizar un vídeo con una serie de microgotas que contienen 4-MU viajando a través del canal “a” de la cruz 5. En la gráfica se muestra una secuencia de 30 fotos. Como estas fotos fueron tomadas cada 200 ms, (frecuencia equivalente a 5 cps), estas corresponden a un total de tiempo de 6 segundos. Sin embargo, como la frecuencia de formación de las microgotas es mayor (seis gotas por segundo) solo algunas de estas microgotas son fotografiadas en su totalidad y analizadas (alrededor de un tercio del total de gotas generadas).

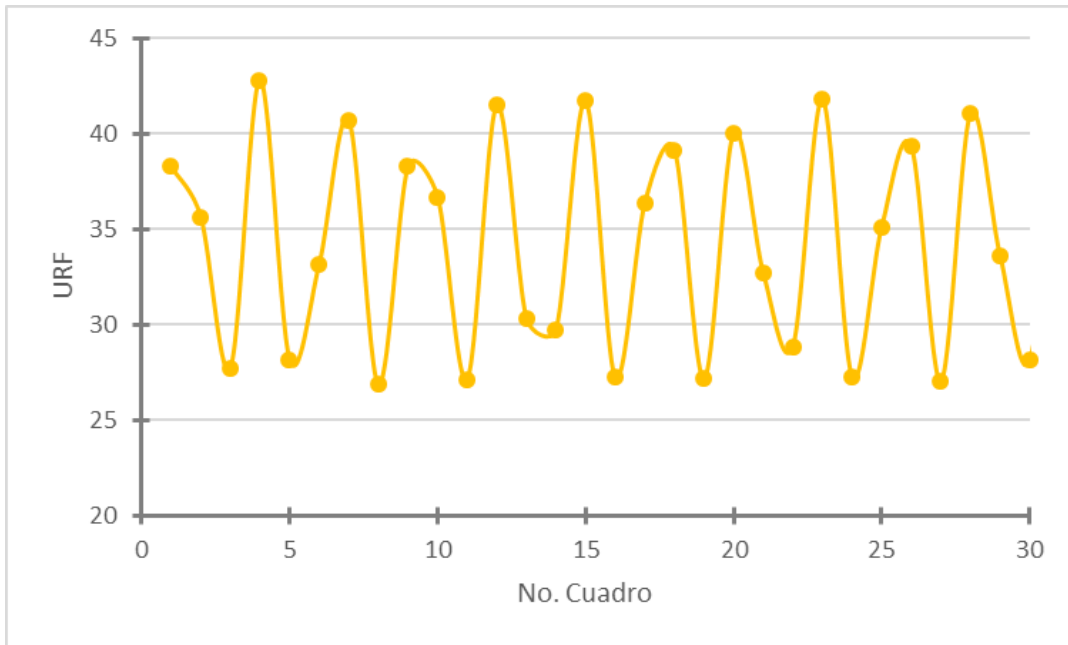


Figura 26. Análisis de fluorescencia de 30 fotografías consecutivas tomadas por la cámara Phantom que muestrean el paso de distintas gotas que contienen el producto fluorescente 4-MU en el canal “a” de la cruz 5. Cada una de las gotas tiene el mismo avance de reacción, por lo tanto, la misma cantidad de producto. Sin embargo, los puntos muestran diferencias de intensidad debido a que en cada foto se puede capturar una gota completa, parte de la gota o solo aceite.

Los datos observados en la Figura 26 se pueden dividir en tres grupos. El primero de ellos corresponde a los puntos cuyo valor está por encima de 36 URF, en el segundo grupo se reúnen los datos entre 30 y 36 URF, y el último grupo corresponde a los puntos con valores de URF por debajo de 30. Cada uno de estos grupos se asocia al fragmento de cada gota que cae dentro del área de interés dibujada en la Figura 25.

El primer grupo ($URF > 36$) contiene los datos que corresponden a las ocasiones en las que la gota cayó completamente dentro del área de interés (por ejemplo, canal “c” de la figura 25-I o canal “d” de la misma figura). El grupo con $30 < URF < 36$ corresponde a las ocasiones en las que solo una fracción de la gota cae dentro del área dibujada en Matlab (Figura 25-II, canal “d”). El último grupo contiene los datos en los que no cae ninguna gota dentro del área de interés (Figura 25-II, canal “b”).

De estos datos los únicos que son de importancia para el estudio del avance de la reacción son los que se encuentran en el primer grupo y utilizando el software Mathematica estos datos pueden ser separados del resto y analizados.

En la Figura 27, se observan cuatro gráficas que corresponden a análisis en Matlab de fotografías tomadas en los cuatro distintos canales de la cruz 5 en un tiempo de 6 segundos. Se observa que la mayor fluorescencia medida se encuentra en el canal “d” mientras que el canal “a” es el que menor fluorescencia tiene. Este cambio es debido a la reacción de hidrólisis del 4-MUS en 4-MU llevada a cabo por la enzima PAS. Cada una de las gráficas mostradas en la Figura 27 es posteriormente analizada con Mathematica escogiendo un valor de URF distinto para la elección de los datos de interés.

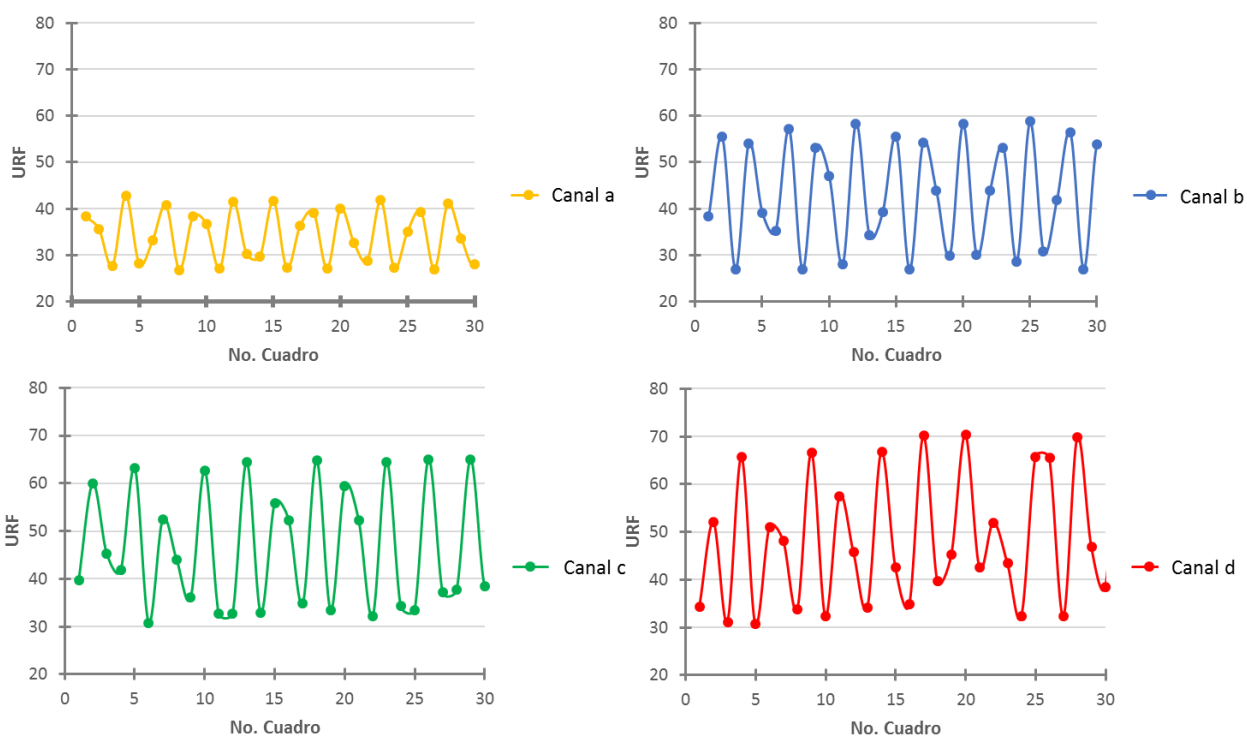


Figura 27. Perfil típico de un experimento en el microchip. En la gráfica se observan las señales de los cuatro distintos canales de la cruz 5. En el ensayo se colocaron la enzima PAS, el sustrato 4-MUS y en la última entrada de fase acuosa el buffer Tris-HCl, el aumento de fluorescencia es debido al mayor estado de avance de la reacción.

El programa Mathematica permite la selección de solo los puntos máximos al calcular la pendiente entre cada dos puntos y encontrar los puntos de inflexión (cambio de signo de la pendiente). Un resultado típico del análisis mediante este programa se muestra en la Figura 28 y corresponden al mismo experimento que el mostrado en la Figura 27. En esta gráfica se muestran los datos correspondientes a los 3000 cuadros que se grabaron durante todo el experimento (10 minutos) a diferencia de las gráficas anteriores en las que solo se mostraban 6 segundos de grabación.

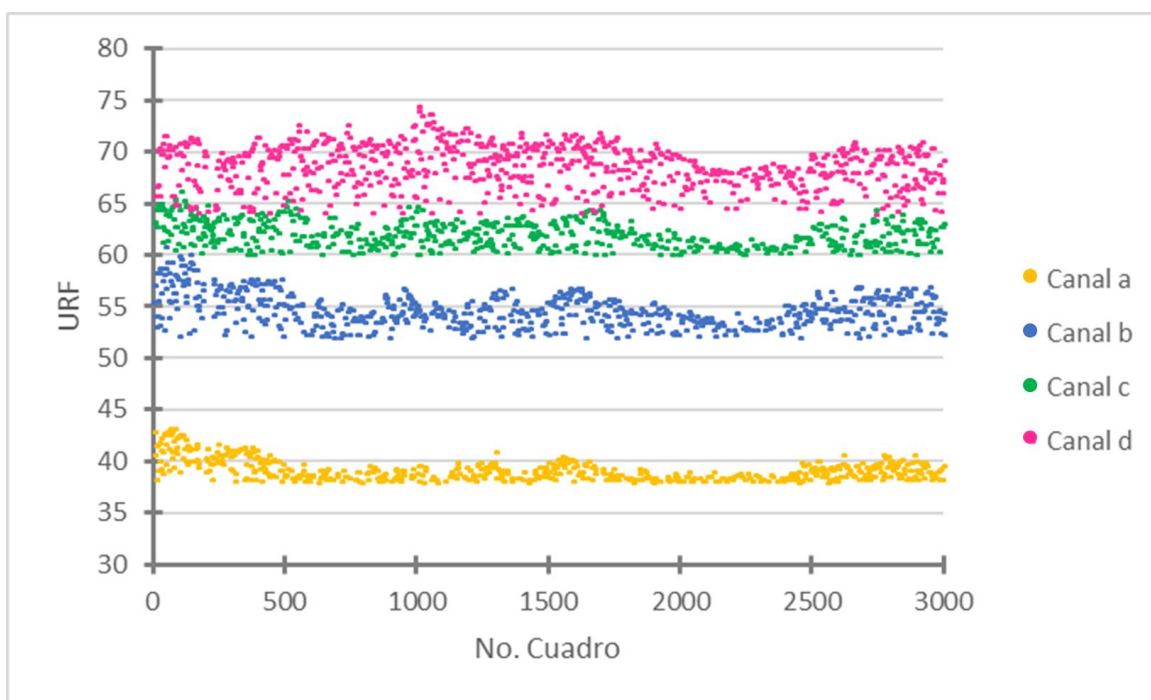


Figura 28. Valores resultantes del análisis en el programa Mathematica. Estos valores corresponden a fotografías que fueron tomadas cuando una gota completa pasaba por la región de análisis. El aumento de fluorescencia es debido al avance de la reacción de hidrólisis del 4-MUS por la enzima PAS.

Por último, los datos de cada canal de la Figura 28 (alrededor de mil puntos por cada experimento) son promediados para obtener un solo punto como se muestra en la Figura 29. Los valores promedio de URF fueron graficados contra el tiempo de residencia de las microgotas en el microchip, estos parámetros se obtuvieron como se explica en la sección 4.11. “Tiempo de residencia de las gotas en el microchip”.

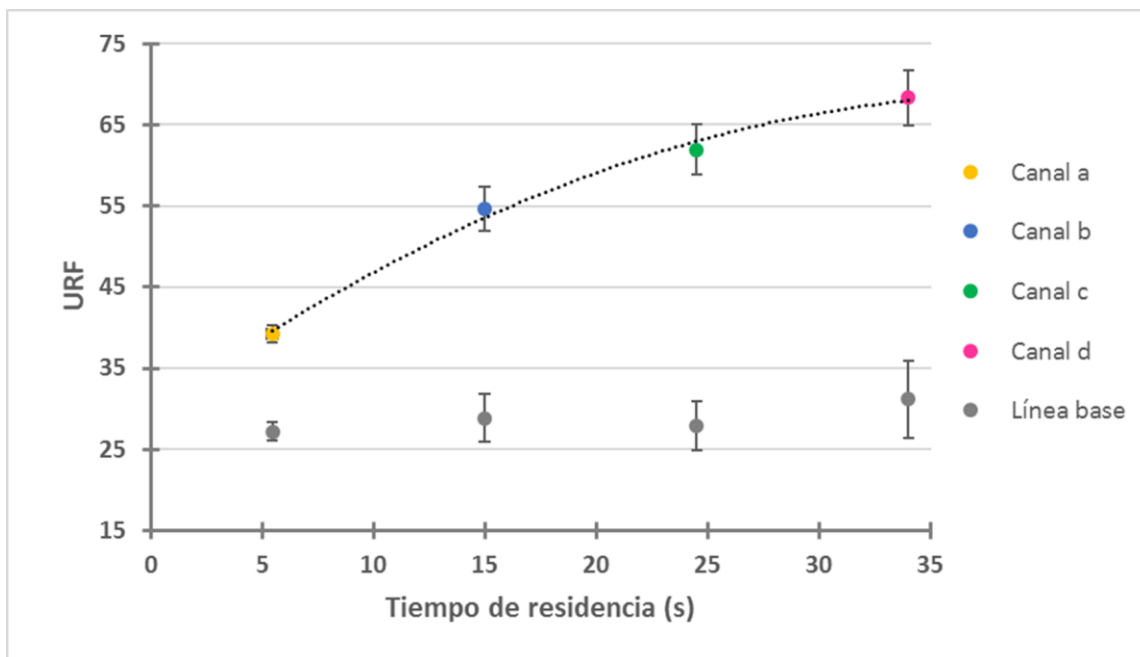


Figura 29. Avance de la reacción enzimática de la enzima PAS usando como sustrato 4-MUS en un microchip utilizando fluorescencia como método de detección.

Las barras de error asociadas a esta gráfica surgen como resultado de la desviación estándar del mismo experimento realizado en tres distintas ocasiones.

Las gráficas que se muestren en secciones posteriores resultantes de datos obtenidos en el microchip se obtuvieron de este modo, pero solo se mostrará el análisis final.

4.10.5. Control positivo de inhibición

Se ha reportado que muchas enzimas son capaces de catalizar reacciones diferentes a aquella para la que están especializadas con una menor especificidad [39,40] y la arilsulfatasa de *P. aeruginosa* pertenece a este grupo ya que, además de su papel como sulfatasa, puede actuar también como una incipiente fosfatasa [31]. Con esto en mente, se decidió hidrolizar el 4-metilumbeliferol sulfato en la presencia del p-nitrofenil fosfato. Este último compuesto actúa como un sustrato

alternativo y es hidrolizado lentamente por la enzima PAS. Debido a esto, al agregar pNPP a la mezcla de reacción en una concentración elevada (comparada con la concentración de 4-MUS), se considera que su concentración es constante y que actúa como un inhibidor competitivo de la reacción natural de la sulfatasa.

Las disoluciones de la enzima PAS y el sustrato 4-MUS se prepararon de la misma forma que se mencionó en la sección anterior, mientras que para preparar la disolución de pNPP se pesaron 0.010 g de pNPP y agregando 1 mL de buffer, obteniéndose una concentración de 26.94 mM. Para los ensayos en los microchips, se preparó una dilución 5.94 mM (220.5 μ L del stock anterior y 779.5 μ L de buffer Tris-HCl).

El arreglo experimental para este experimento se observa en la Figura 30. Por simplicidad, en esta figura se ha eliminado el fractal del microchip y se muestra solo la sección de introducción de reactivos. Una vez que los reactivos son introducidos y se forman las microgotas, estas recorren los canales que forman el fractal.

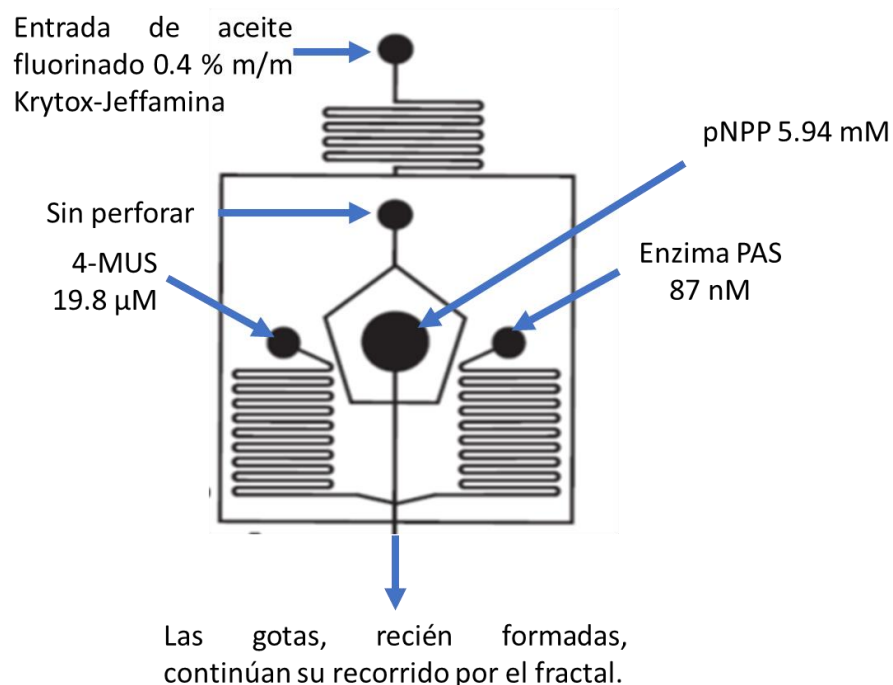


Figura 30. Arreglo experimental para llevar a cabo el experimento de control positivo de la inhibición.

El blanco de este experimento se realizó al cambiar la disolución de la enzima PAS por una de buffer Tris-HCl.

4.10.5. Experimentos de inhibición con un extracto de cebolla

Para preparar el extracto de cebolla se adquirió esta verdura en un mercado local. Se pesaron 2.0 gramos de cebolla cortada en pequeños trozos y se colocaron en 6 mL de buffer Tris-HCl. La mezcla se calentó a 60°C durante tres horas con agitación constante. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 15000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue separado y se almacenó a -20°C, el resto fue desechado. Se hicieron experimentos con este extracto en dos concentraciones diferentes, la primera de ellas es sin diluir el extracto (en la jeringa, dentro del microchip el extracto fue diluido tres veces, sección 4.10) y la segunda diluyendo el extracto dos veces fuera del microchip (seis veces dentro de este).

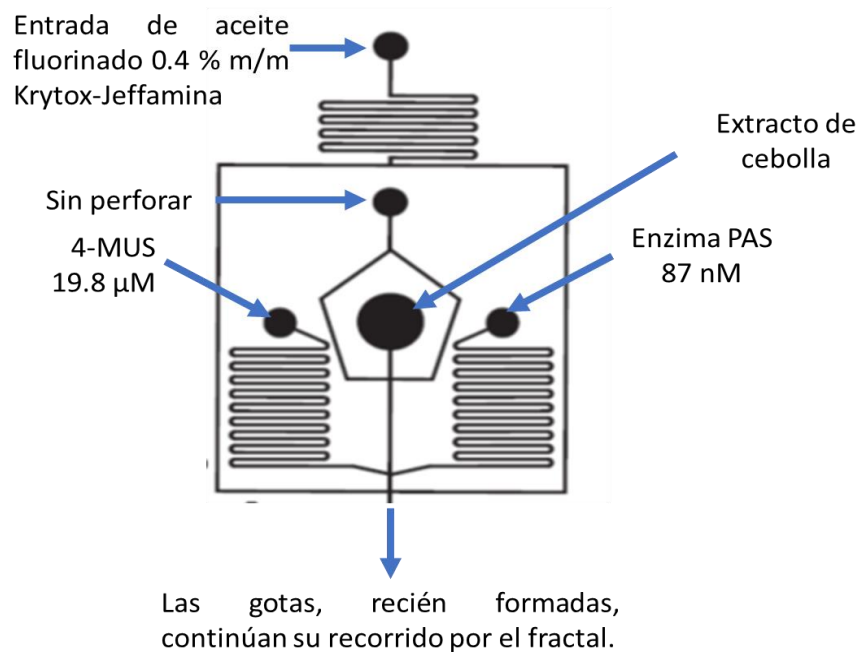


Figura 31. Arreglo experimental de los ensayos de inhibición con el extracto de cebolla.

En la Figura 31 se observa el arreglo experimental utilizado para la inyección de disoluciones al microchip.

Los blancos se hicieron al cambiar la disolución de enzima PAS por el buffer Tris-HCl. Se tomaron dos blancos: con el extracto de cebolla sin diluir y 2 veces diluido.

4.11. Tiempo de residencia de las gotas en el microchip.

Para determinar el tiempo total que permanece una gota en el microchip y el tiempo que tarda en llegar a cierto canal del fractal, se grabó un video utilizando la cámara Phantom y se analizó mediante el programa PCC 2.2.

Primero, el vídeo fue tomado en la sección en donde recién se han formado las gotas y en las cruces 5, 7 y 12 del microchip. En cada vídeo se determinó la distancia recorrida por cada gota durante un cierto periodo de tiempo (para esto se utilizó la calibración realizada en la caracterización del microchip). Finalmente, todos los datos de velocidad obtenidos mediante el programa fueron promediados y se calculó el tiempo de residencia (tiempo que pasa desde que la gota es formada hasta que sale del microchip) con la siguiente ecuación:

$$t = \frac{d}{v} \quad 1)$$

en la que la d , distancia, es una cantidad conocida (28.89 cm) que resulta de sumar la longitud de cada uno de los canales que recorren las gotas. Los datos individuales de cada medición se muestran en la Tabla 4, en la sección 5.10. “Tiempo de residencia de las microgotas en el microchip”.

4.12. Curva de calibración en el microchip

La preparación de las disoluciones para la curva de calibración se realizó a partir de un stock de 4-MU (Sigma-Aldrich) de concentración 56.76 mM en etanol. Las diluciones se hicieron en buffer Tris-HCl 100 mM, 0.2% BSA y pH 8 como se resume en la Tabla 2.

En este caso, en las tres entradas de fase acuosa se inyectó la misma disolución de 4-MU, por lo que no hubo dilución alguna dentro de los canales del microchip. Esta fue la única modificación realizada respecto a los demás experimentos ya que los videos se grabaron en las mismas cruces del microchip que en los experimentos anteriores y tanto las condiciones, así como el tiempo de grabación fueron constantes.

Tabla 2. Preparación de las disoluciones para la curva de calibración de 4-MU en el microchip.

Concentración final (μM)	V_{stock} (μL)	V_{buffer} (μL)
100*	1.76	998.24
6.6	264	3736
4.4	176	3824
2.2	88	3912

*Esta disolución no fue utilizada en la curva de calibración y solo se preparó para utilizarla en las diluciones siguientes.

5. Resultados y discusión

5.1. Transformación de bacterias de *E. coli* con el plásmido pRSFDuet-1-PAS y expresión recombinante de la enzima arilsulfatasa de *P. aeruginosa*.

El plásmido pRSFDuet-1-PAS fue transformado en la cepa de *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3)-RIL para su expresión. Se utilizó esta cepa porque tiene la capacidad de expresar a la ARN polimerasa del bacteriófago T7, la cual es necesaria para expresar a la sulfatasa de *P. aeruginosa* ya que se encuentra bajo el control del promotor T7 en el plásmido pRSFDuet-1-PAS. A su vez, la expresión de la ARN polimerasa T7 se puede inducir en esta cepa por medio de la adición de IPTG [41].

La expresión de la sulfatasa se hizo mediante la adición de IPTG 0.4 mM y fue corroborada mediante SDS-PAGE, analizando alícuotas del cultivo al $t = 0$ (justo antes de añadir IPTG) y al $t = 24$ h (después de incubar 24 h a 37°C a 200 rpm).

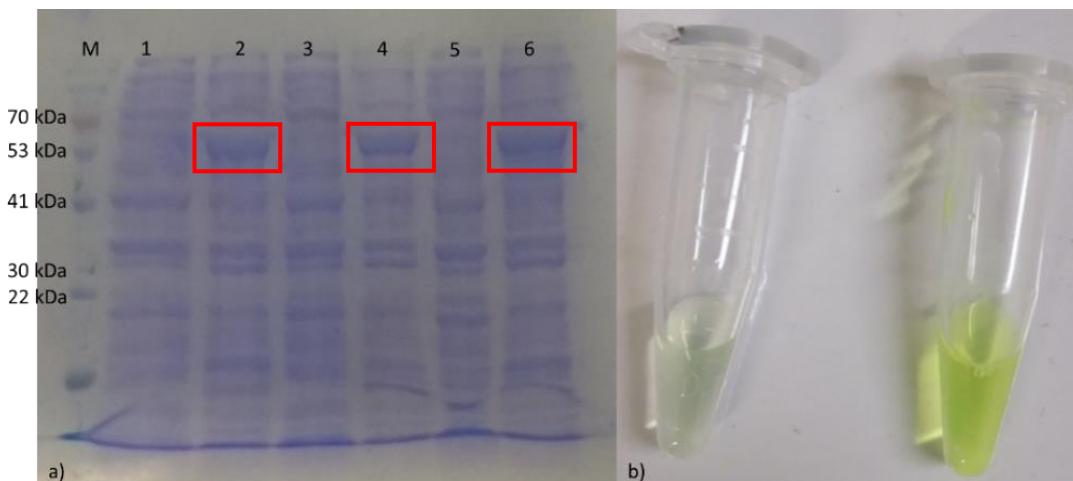


Figura 32. a) Expresión de la proteína PAS. M: Marcador. Carril 1, 3 y 5: diferentes cultivos tratados bajo las mismas condiciones a $t = 0$. Carriles 2, 4 y 6: diferentes cultivos tratados bajo las mismas condiciones después de 24 h de incubación con IPTG 0.4 mM. b) Prueba cualitativa con pNPS, a la izquierda se observa el experimento usado como blanco (extracto crudo al $t = 0$ y a la derecha el experimento que contiene el extracto crudo de un cultivo después de 24 h de expresión de la enzima PAS activa. El color amarillo indica la actividad de sulfatasa.

En los carriles 2, 4 y 6 del gel (Figura 32a) se cargaron extractos crudos del cultivo después de 24 h de expresión y se observó una banda mucho más intensa que las demás en la masa molecular esperada, 57 kDa, [42] y que no se observó en muestras del $t = 0$ (carriles 1, 3, 5), lo cual indica la sobreexpresión de la proteína de interés.

Además, se realizó una prueba de actividad enzimática cualitativa con p-nitrofenil sulfato (pNPS) para corroborar que la proteína se expresó y que estaba activa. El resultado positivo (Figura 32b) está indicado por la aparición de un color amarillo intenso debido a la hidrólisis, realizada por la enzima PAS, del pNPS en p-nitrofenol, el cual es un compuesto amarillo a pH básico (Figura 33).

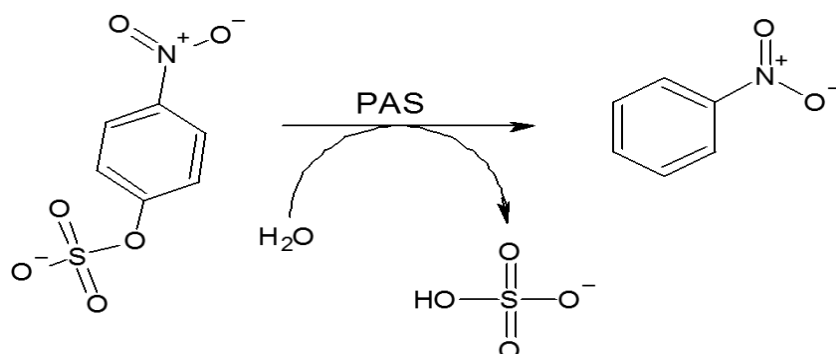


Figura 33. Reacción de hidrólisis del p-nitrofenil sulfato llevada a cabo por la enzima PAS.

5.2. Purificación parcial de la arilsulfatasa de *P. aeruginosa* recombinante.

Una vez realizada la lisis celular mediante sonicación, se conservó solo la parte soluble y se procedió a utilizar una columna de intercambio aniónico.

Se escogió trabajar con un buffer de lisis a pH 8 ya que un requisito para utilizar la columna de intercambio aniónico es que la proteína se encuentre en un medio con pH mayor al de su punto isoeléctrico, el punto isoeléctrico de la enzima PAS es 4.76 [42]. Bajo estas condiciones la carga neta de la proteína será negativa y se puede unir a los grupos funcionales cargados positivamente que contiene la

columna. La elución de las proteínas de la columna se realizó mediante la adición escalonada de cloruro de sodio (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de las fracciones obtenidas de la purificación de la proteína.

No. Fracción	Descripción
1-24	Muestras eluidas con buffer Tris-HCl 20 mM, 100 mM NaCl, pH 8.
25-30	Muestras eluidas con buffer Tris-HCl 20 mM, 200 mM NaCl, pH 8.
31-35	Muestras eluidas con buffer Tris-HCl 20 mM, 400 mM NaCl, pH 8.

En la Figura 34 se muestra el SDS-PAGE de algunos de los eluatos obtenidos de la columna de intercambio aniónico al agregar 100 mM de NaCl (Fracciones 1-24) y 200 mM de NaCl (fracción 25). Se observa que tanto el extracto crudo como la fracción 1 tienen gran cantidad de proteínas. En los carriles con las fracciones 2, 3, 6, 11, 16, 21 y 24, se observa una franja muy marcada a 57 kDa (masa molecular de la proteína de interés). Además, se observa que a poco más de 30 kDa y 22 kDa también hay proteínas en concentración apreciable (debido a la intensidad de la franja) y otras en menor concentración. Todas esas franjas representan proteínas contaminantes que no lograron separarse de la proteína PAS en este paso, sin embargo, para el objetivo de esta tesis no es esencial contar con la enzima con un alto grado de pureza, pues las demás proteínas presentes no interfieren en la reacción enzimática de interés. No existe riesgo de que alguna de las proteínas presentes sea una sulfatasa perteneciente a *E. coli* ya que la cepa utilizada en la expresión carece de este tipo de enzimas [29]. y el extracto crudo de un cultivo de la cepa sin el plásmido pRSFDuet-1-PAS no muestra hidrólisis del pNPS.

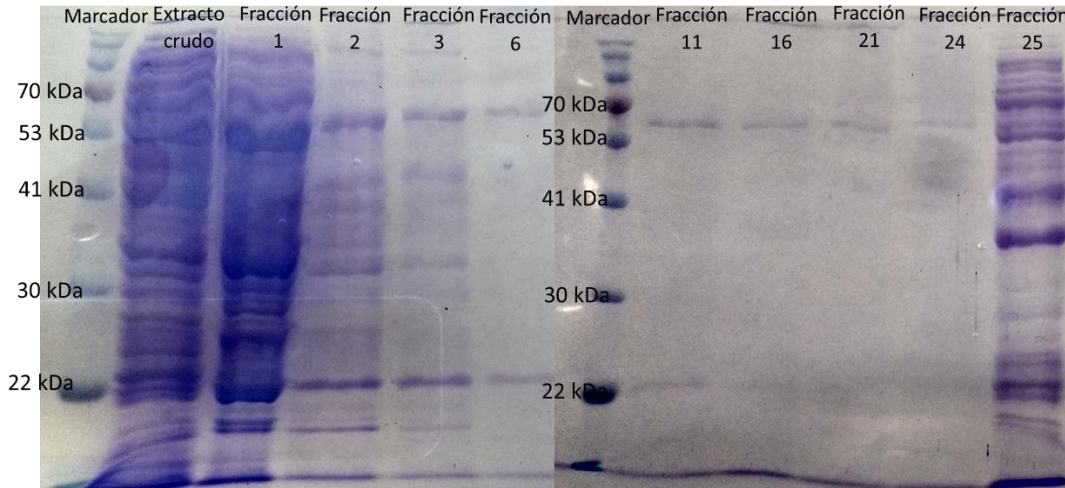


Figura 34. SDS-PAGE de distintas fracciones resultantes de la purificación de la enzima PAS.

En el carril de la fracción 25 (200 mM de NaCl) se observa que, aunque la proteína de interés aún está presente, también se encuentran grandes cantidades de otras proteínas contaminantes y, por eso, no se trabajó con esta ni con fracciones posteriores.

5.3. Determinación de la concentración total de proteína

Se utilizó el reactivo de Bradford para determinar la cantidad de proteína total de los eluatos resultantes de la purificación. Para ello, fue necesario realizar primero una curva patrón para poder asignar un valor de concentración a cierta absorbancia. La curva de calibración se realizó utilizando BSA en concentración desde 0 a 1.5 mg/mL (Figura A-1 “ANEXO. Curvas de calibración en espectrofotómetro”). Las muestras cuya respuesta fue mayor a la cubierta por esta curva de calibración se diluyeron hasta que su absorbancia estuviera dentro del intervalo de la curva de calibración y posteriormente se calculó la concentración original.

En la Figura 35 se observa que la cantidad de proteína eluida primero disminuye conforme aumenta el número de fracción y vuelve a aumentar drásticamente en la

fracción 25 y 31. Estos aumentos se deben a que al eluir estas fracciones (25 y 31) se cambió la concentración de NaCl a 200 mM y 400 mM, respectivamente, provocando que las proteínas con mayor carga eléctrica negativa se despegarán de la columna.

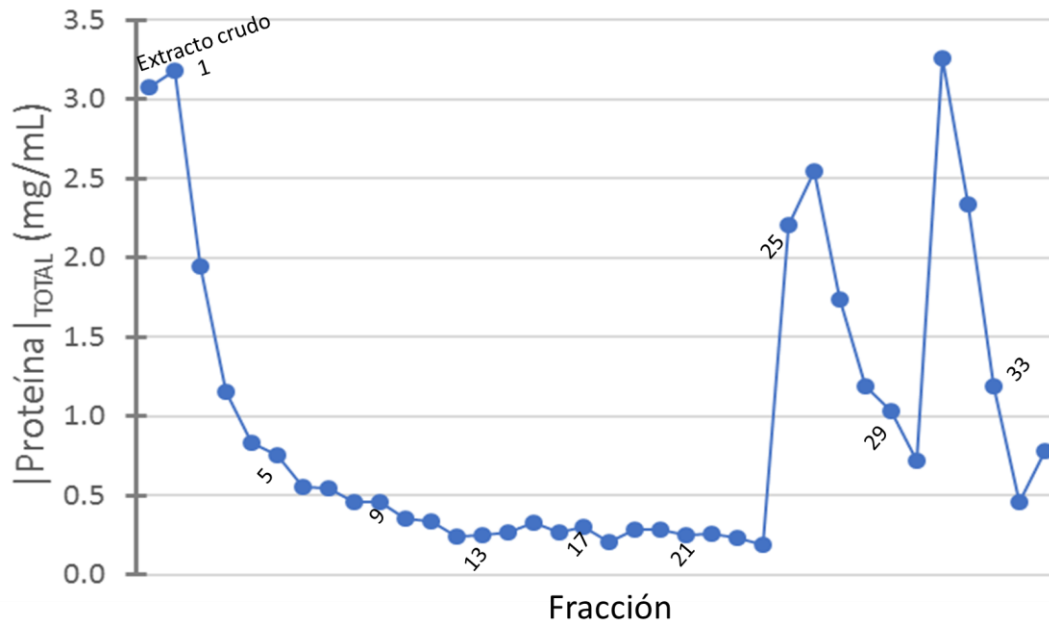


Figura 35. Concentración de proteína total en las distintas fracciones obtenidas del proceso de purificación.

También, se observa que la concentración de proteína total del extracto crudo es menor a la concentración de proteína en las fracciones 1 y 31. Esto se debe a que la columna usada en la purificación se cargó con 15 mL de la muestra resultante de la lisis celular (sección 4.1), provocando que las proteínas que se quedaron unidas a la columna se concentraran mientras que el extracto crudo no se concentró.

5.4. Determinación de la actividad específica de PAS en las fracciones 1-25.

Para conocer la cantidad relativa de PAS en cada eluato se midió la velocidad inicial de algunas fracciones utilizando 4-MUS como sustrato en concentración 60 μM utilizando un espectrofotómetro. Con estos datos y los obtenidos de la proteína total en las distintas fracciones, se hizo un cociente para conocer la actividad específica la cual se muestra en la siguiente gráfica (Figura 36).

En esta gráfica se puede observar que en la fracción 1 la enzima se purificó unas 6 veces respecto del extracto crudo, mientras que las fracciones 6-24 en promedio se enriquecieron tres veces. Sin embargo, en el gel de SDS-PAGE estas últimas fracciones se observaban más limpias, esto podría deberse a que las impurezas se encuentran mucho más diluidas y no alcanzan a observarse. Las fracciones que tenían relaciones adecuadas se mezclaron (1-24) para obtener el stock de proteína con el que se trabajó en todos los experimentos posteriores.

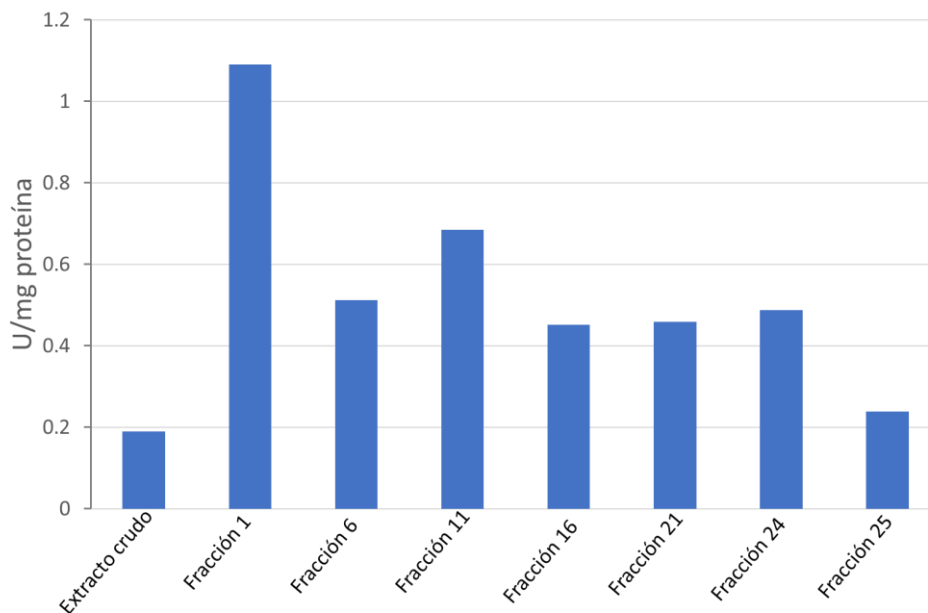


Figura 36. Actividad específica de la enzima PAS medida en cubetas en distintas fracciones antes (extracto crudo) y después de la purificación parcial.

5.5. Determinación de las constantes cinéticas K_m para dos sustratos

Con los resultados de los dos experimentos anteriores se determinó que las fracciones 1-24 eran las que contaban con mayor pureza de la proteína PAS por lo que se procedió a mezclarlas para los experimentos siguientes, los cuales incluyen la determinación de las constantes cinéticas y los ensayos de inhibición.

Para determinar el valor de las constantes cinéticas de la enzima PAS, tanto con pNPS y 4-MUS, se utilizaron distintas concentraciones de sustrato y a partir de los distintos datos de velocidad inicial, se obtuvieron los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$. En la Figura 37 se observan los resultados obtenidos con el sustrato pNPS, mientras que los resultados con 4-MUS se observan en la Figura 38. Las Figuras 37c y 38c se obtuvieron al graficar los resultados de velocidad inicial en GraphPad Prism. Ambas determinaciones se realizaron en espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent Tech).

Con la información obtenida de las constantes cinéticas en las Figuras 37c y 38c se observa que la reacción ocurre a mayor velocidad cuando el sustrato es pNPS, sin embargo, la enzima es casi 3.5 veces más afín (menor K_m) al sustrato 4-MUS que al pNPS.

Para la determinación de las velocidades iniciales que se observan en las Figuras 37a, 37b, 38a y 38b se consideraron los datos en los que la respuesta presenta un comportamiento lineal (menos del 20% del avance de la reacción). Además, para graficar en el eje Y la concentración de producto y no la absorbancia se hizo uso de del ajuste lineal obtenido de la curva patrón de cada producto (Figuras A-2 y A-3 “ANEXO. Curvas de calibración en espectrofotómetro”).

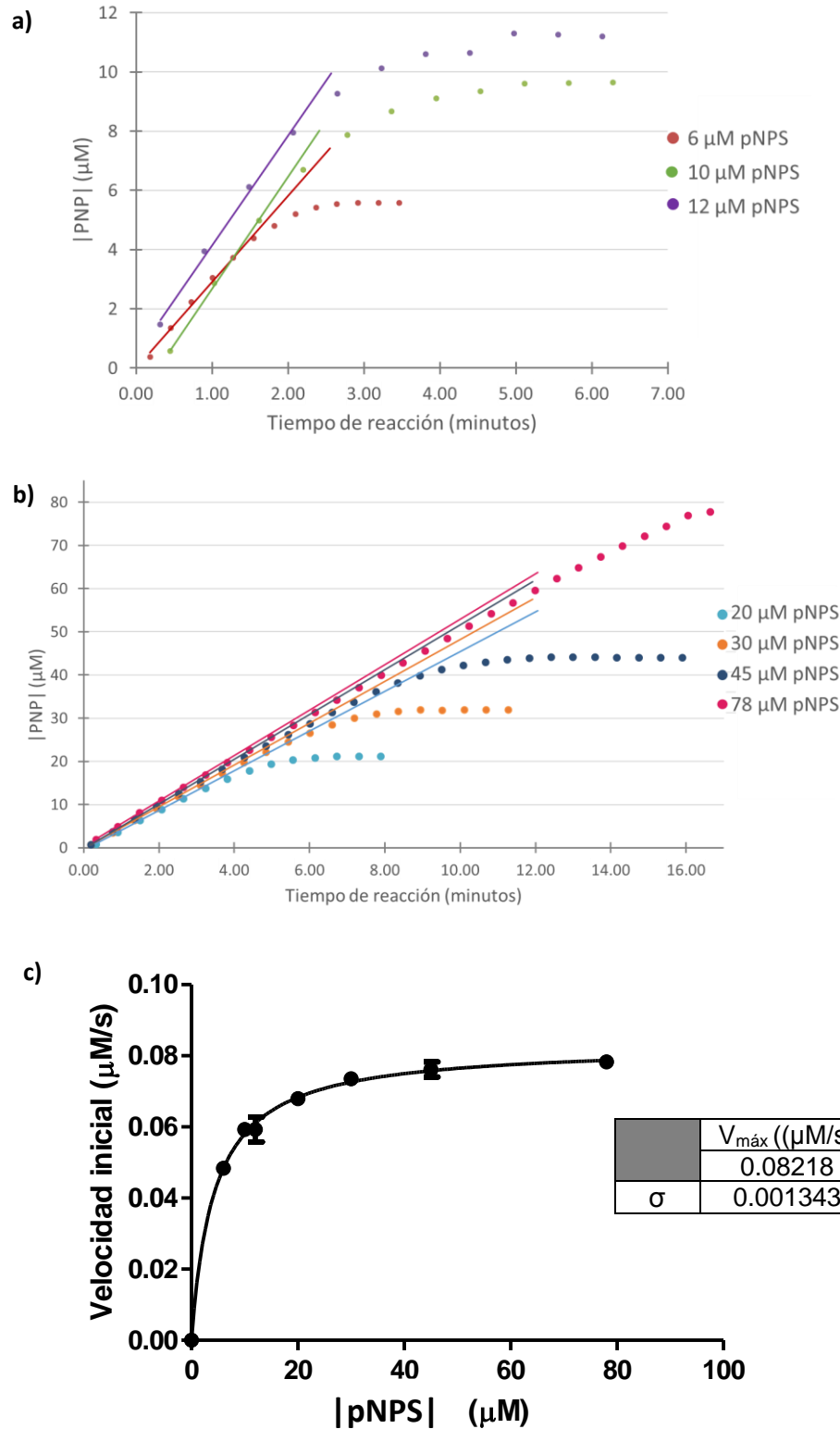


Figura 37. a), b) Curva de progreso de la reacción de la enzima PAS al hidrolizar pNPS a diferentes concentraciones iniciales de este en buffer Tris-HCl pH 8.0 a 25°C. Las líneas continuas representan la velocidad inicial de cada reacción. Determinaciones realizadas en espectrofotómetro. c) Gráfica de Michaelis-Menten para la hidrólisis del pNPS, con la enzima PAS en buffer Tris-HCl pH 8.0, a 25°C.

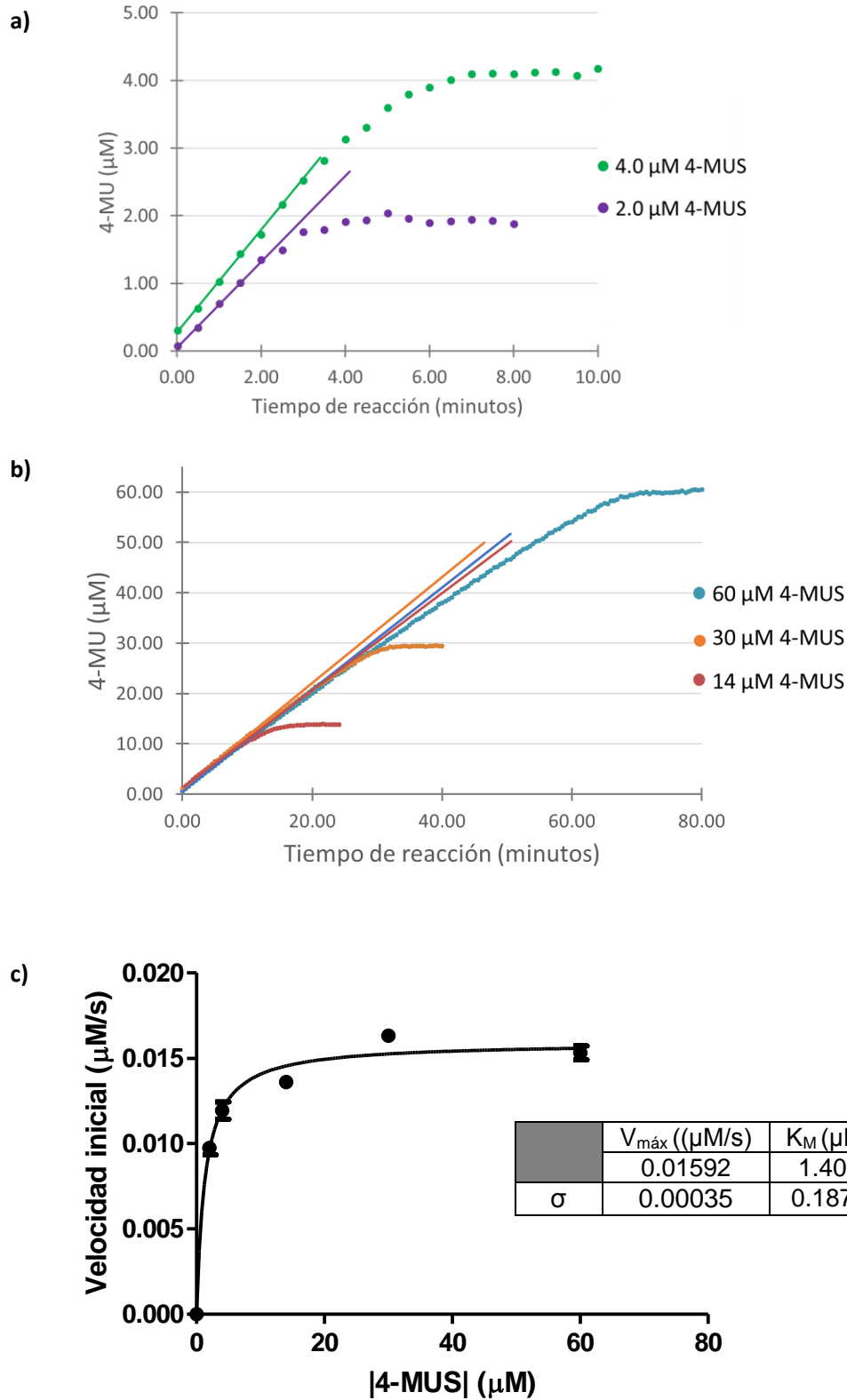


Figura 38. a), b) Curva de progreso de la reacción de la enzima PAS al hidrolizar 4-MUS a diferentes concentraciones iniciales de este en buffer Tris-HCl pH 8.0 a 25°C. Las líneas continuas representan la velocidad inicial de cada reacción. Determinaciones realizadas en espectrofotómetro. c) Gráfica de Michaelis-Menten de la enzima PAS utilizando concentraciones de 4-MUS, 0.0-60.0 μM en buffer Tris-HCl a 25 °C.

La reacción de hidrólisis del sustrato 4-MUS, llevada a cabo por la enzima PAS, se muestra en la Figura 39.

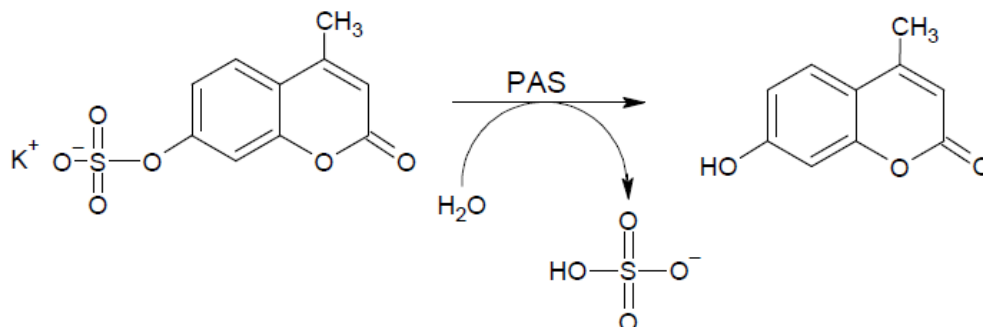


Figura 39. Reacción de hidrólisis del 4-MUS llevada a cabo por la enzima PAS.

5.6. Inhibición enzimática de la enzima PAS.

Debido a que no hay reportes en la literatura de compuestos químicos comerciales que actúen como inhibidores competitivos de la enzima PAS, se realizó un ensayo en presencia del sustrato p-nitrofenil fosfato (presente en una concentración de 3.3 mM), el cual es hidrolizado 620 veces más lento que el pNPS (presente en una concentración de 12.5 μM) [31]. Bajo estas condiciones el sustrato alternativo pNPP bloquea el sitio activo, pero prácticamente no es hidrolizado, actuando como un inhibidor competitivo [59]. Al llevar a cabo el ensayo con pNPP se observó la disminución de la velocidad inicial en un 57 % con respecto al control sin dicho compuesto (Figura 40).

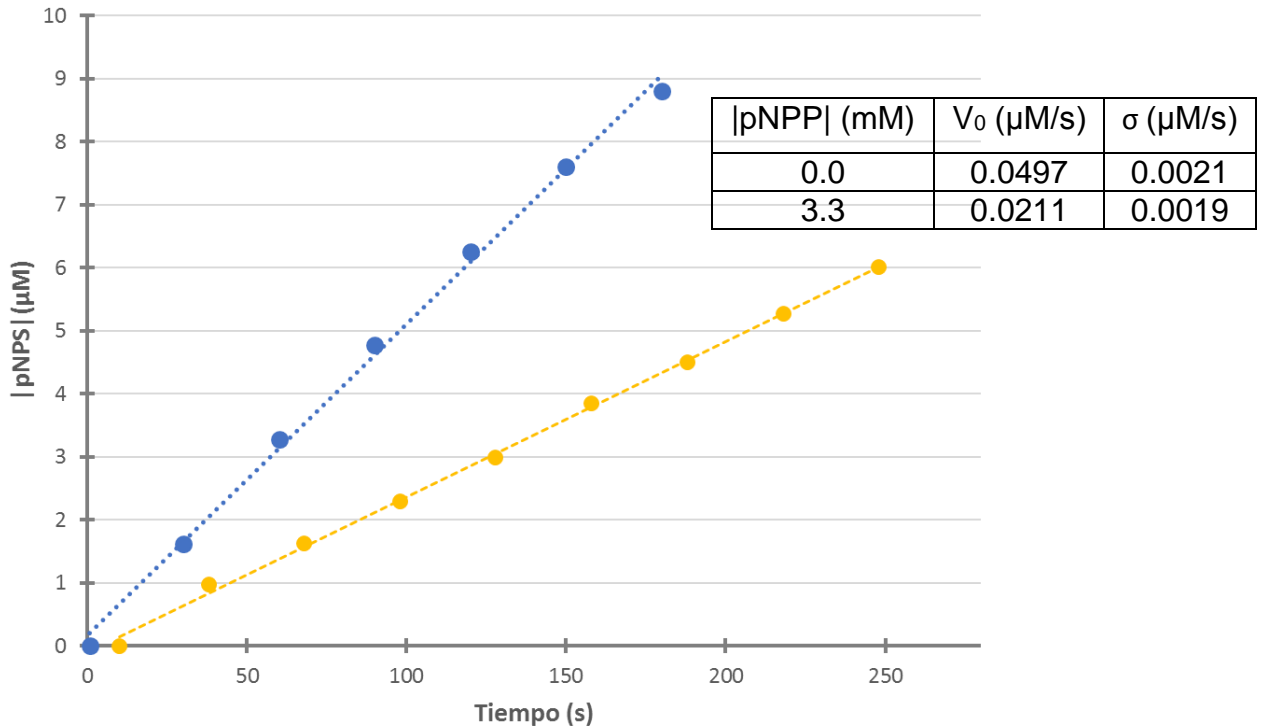


Figura 40. Reacción de la enzima PAS (5.79 nM), monitoreada en espectrofotómetro, utilizando como sustrato pNPS 12.5 μM y agregando pNPP 3.3 mM como inhibidor (serie amarilla). La serie azul representa la reacción en ausencia de pNPP.

5.7. Actividad de la enzima PAS en presencia de disolventes orgánicos

Se realizaron algunos ensayos de la actividad enzimática de PAS en presencia de diferentes cantidades de metanol y acetonitrilo, pues en un principio se planeó buscar inhibidores de la enzima separando un extracto natural mediante HPLC y estos dos disolventes. El metanol y acetonitrilo son disolventes comúnmente utilizados en este tipo de cromatografía, y fue importante conocer cómo trabaja la enzima de interés bajo las condiciones que se utilizarían para separar el extracto natural. Con ello se podría diseñar una estrategia para acoplar la separación en el equipo de HPLC con los ensayos en los microchips.

Para determinar la actividad de la enzima PAS en presencia del metanol y el acetonitrilo, se usaron las mismas condiciones de reacción que en los experimentos

para la determinación de las constantes cinéticas: el volumen de reacción fue de 100 μ L, T= 25°C, buffer Tris-HCl, la concentración de la enzima fue 5.8 nM y el sustrato elegido fue 4-MUS en concentración 14 μ M.

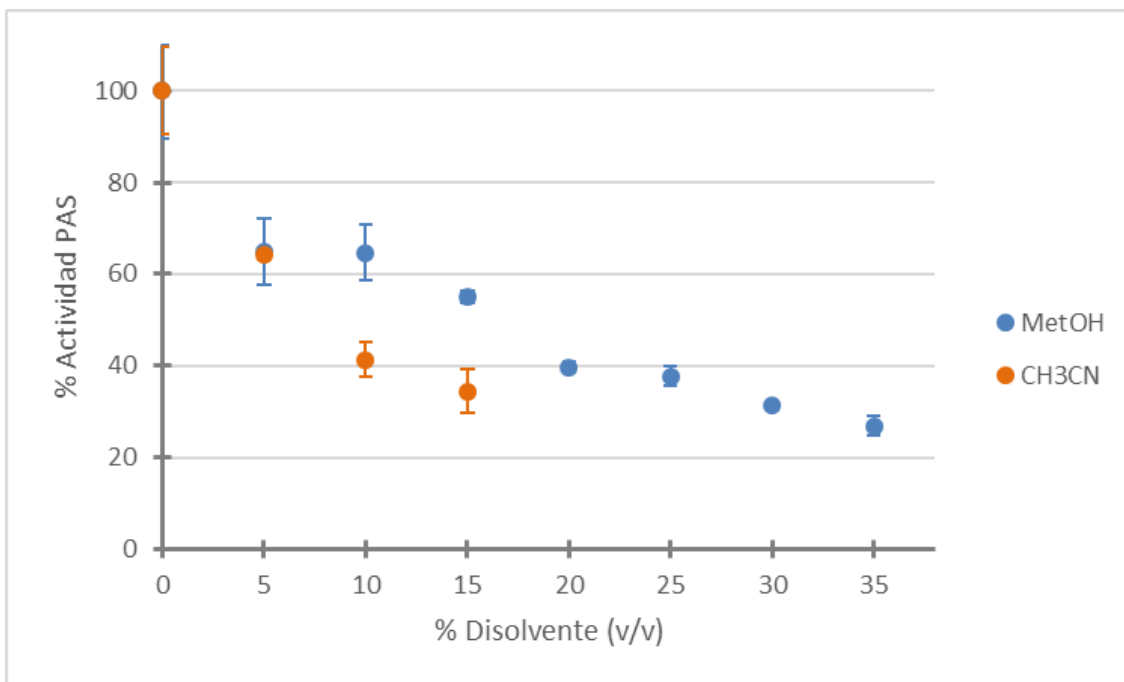


Figura 41. Gráfica que representa la disminución del porcentaje de actividad de la enzima PAS en presencia de metanol (serie azul) y acetonitrilo (serie anaranjada). Los experimentos se llevaron a cabo usando buffer Tris-HCl y agua destilada para ajustar el volumen de cada reacción y a 25 °C).

En la Figura 41 se muestran los resultados de estos experimentos. Se observa que ambos disolventes provocan una gran disminución de la actividad de la enzima (~36%) con tan solo 5% v/v de concentración. En el caso del metanol, la pérdida de actividad no sigue una tendencia tan drástica con las siguientes dos concentraciones (10% y 15% v/v), pero se observa también, que cuando la concentración de este disolvente llega a 35%, la actividad de la enzima es solo del 27% respecto a la original. En el caso de los experimentos realizados con acetonitrilo, la actividad de la enzima PAS disminuye drásticamente ya que con una concentración de 15% v/v, la enzima ha perdido ya el 66% de actividad, mientras

que con metanol la enzima necesitaría entre 25% y 30% v/v para la misma pérdida de actividad. Además, realizar experimentos con mayores concentraciones de acetonitrilo fue imposible debido a la precipitación de las sales presentes tanto en el buffer usado para ajustar el volumen final de cada experimento, como en el buffer en el que está disuelta la enzima. También, es posible que sea la misma enzima la que se encuentre precipitando a concentraciones más altas de acetonitrilo.

5.8. Diseño del microchip

El diseño de microchip que se utilizó para realizar los ensayos enzimáticos se muestra en la Figura 42, este diseño se basó en trabajos anteriores realizados en el mismo grupo de investigación [3] y solo se hicieron pequeñas modificaciones con la finalidad de evitar problemas presentados en trabajos anteriores (de éstas se hablará más adelante). El microchip puede dividirse en dos secciones. La primera es la sección en la que se introducen los reactivos en disolución acuosa para, posteriormente, mezclarse e intersectarse con una fase orgánica inyectada a un flujo mucho mayor, provocando la formación de las microgotas. La segunda sección corresponde a un área con diseño de fractal. En esta área las microgotas recorren los canales cuya longitud total es de 28.89 cm. Es en esta área, en la que las reacciones ocurren y en donde se detecta el producto fluorescente, para seguir la cinética de cada reacción. Cabe destacar que los canales del microchip se encuentran representados por las líneas negras y no por los espacios blancos entre estas. Cada una de las cruces que forma el fractal se identifica con un número y por cada cruz hay cuatro secciones del canal. Cada una de estas secciones corresponde a un tiempo distinto de residencia de una gota dentro del microchip por lo que se decidió llamar a cada uno de estos canales como “a”, “b”, “c” y “d”; siendo “a” el canal con el menor tiempo de residencia y “d” el del mayor tiempo de residencia de la cruz con la que se esté trabajando.

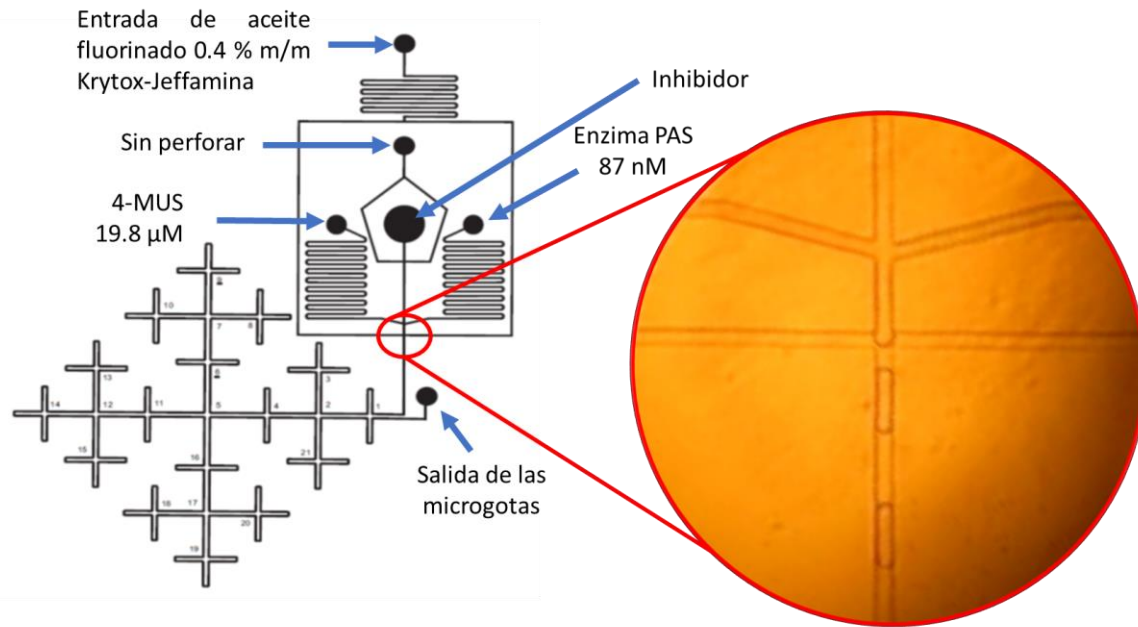


Figura 42. Diseño completo del microchip. En el acercamiento hecho de esta figura se observa una fotografía de la cruz en la que se interceptan la fase acuosa y la fase orgánica, generando las microgotas.

Las modificaciones realizadas a este chip son dos: la entrada de las fases acuosas que corresponde a enzima y sustrato y la entrada del aceite fluorinado la fase orgánica. Estas tres entradas se diseñaron con un serpentín que tienen que recorrer las disoluciones inyectadas antes de llegar a la interfase en donde se formarán las microgotas. Se diseñó este serpentín para proveer mayor resistencia hidráulica a las disoluciones entrantes, esta resistencia confiere mayor estabilidad al flujo, evitando grandes fluctuaciones debido al mecanismo pulsátil de la inyección por las bombas [43]. La entrada del extracto natural no se diseñó con este serpentín debido a un efecto conocido como dispersión de Taylor. Debido a este efecto, una disolución en flujo continuo que recorre un canal no lo hace a la misma velocidad en todas las partes del canal. La velocidad de esta disolución es mayor en el centro del canal y disminuye al acercarse a las paredes de este. No es deseable que dicho cambio de velocidad se presente en el extracto natural ya que esto provocaría un

gradiente de concentración (ver Figura 2) de cada compuesto presente en el extracto, provocando que su concentración en las microgotas también sea diferente.

Continuando con el diseño de la entrada del extracto natural, se observa que ésta es de un diámetro mayor que el de las otras entradas. Esto se debe a que se planea que, en trabajos posteriores, el extracto natural sea separado mediante una columna de HPLC. El flujo proveniente de esta columna (6000 $\mu\text{L/h}$) es mucho más grande que el flujo con el que se inyectan las demás disoluciones de fase acuosa (60 $\mu\text{L/h}$), por lo que la tubería con la que se introducen las disoluciones debe ser de un diámetro mayor. También, se observa en el área de introducción de disoluciones que hay un orificio sin perforar. Este orificio funciona como una purga para la disminuir el flujo proveniente del HPLC.

Regresando a las entradas de la fase acuosa en el microchip, debido a que se cuenta con tres entradas independientes de fase acuosa y a que en cada una de éstas se introduce un flujo de la misma magnitud que los otros dos, cada una de las disoluciones se diluye tres veces al juntarse con las otras dos. Así, las concentraciones que se colocaron en las jeringas con fase acuosa y se introdujeron al microchip se diluyeron tres veces ya que siempre se trabajó con un flujo de la misma magnitud en cada una de las entradas.

5.9. Caracterización de los canales

Los canales diseñados en Adobe Illustrator se planearon para tener un ancho de 150 μm , y el resultado obtenido es muy cercano del deseado (ver Tabla 6). La variación es sólo del 9.59% y puede ser debida a la resolución de la impresora con la que se obtuvo la impresión del acetato en negativo.



Figura 43. Vista lateral de dos canales del microchip.

Los resultados de esta caracterización física se muestran en la Figura 44:

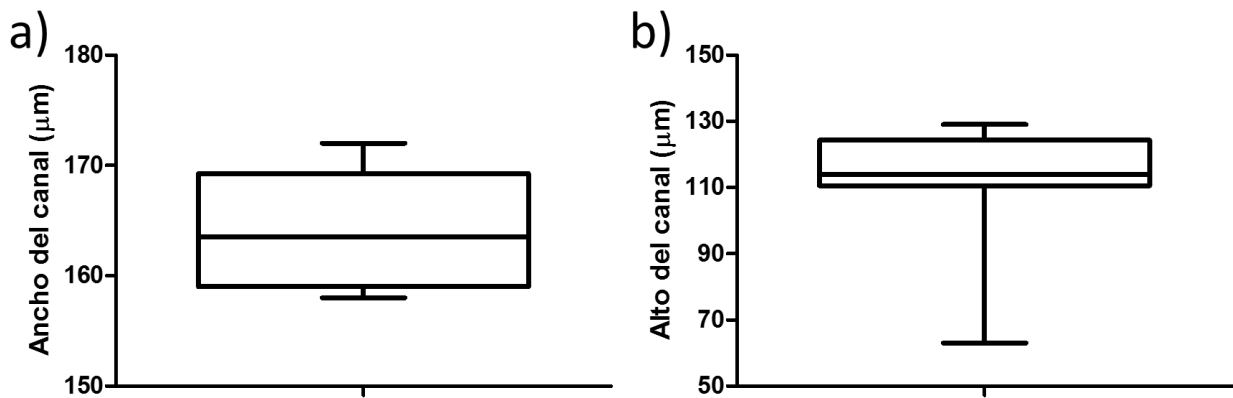


Figura 44. Resumen de los resultados obtenidos de la caracterización física del microchip.

Por otra parte, la altura de los canales es debida a la cantidad de resina fotosensible agregada a la oblea de silicio y la eliminación de la resina sobrante con el spincoater. El programa aplicado en el spincoater [44] fue diseñado para generar un espesor de la resina de $100 \mu\text{m}$ y, aunque el promedio obtenido en la altura de los canales es muy parecido a este valor (10.57% de diferencia), la desviación estándar equivale a un 18.97%. La causa de esta desviación tan grande es que la oblea de silicio no haya estado bien alineada con el spincoater, por lo que la resina no se distribuyó uniformemente sobre toda la superficie de la oblea, ocasionando que en algunas partes el grosor de la resina haya sido mayor que en otras.

5.10. Tiempo de residencia de las microgotas en el microchip.

Para calcular el tiempo que pasa una gota en el microchip (desde que se forma hasta que sale), se midió la velocidad a la que viaja una gota en trece distintas zonas del fractal (ver Figura 45):

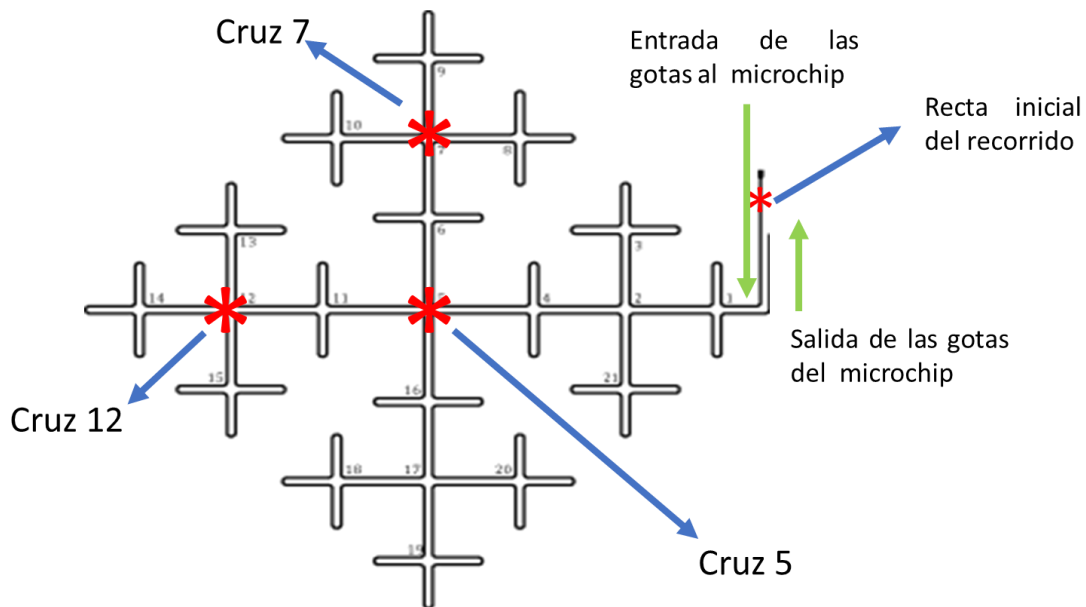


Figura 45. Sección del microcanal en forma de fractal por el que viajan las microgotas. Los puntos en rojo indican las trece secciones en las que se calculó la velocidad de las gotas y en las que después se determinó la intensidad de fluorescencia de las microgotas. Estas secciones son: a) La recta de inicio del fractal, b) la cruz 5 en sus cuatro distintos canales, c) la cruz 7 en sus cuatro distintos canales y d) la cruz 12 en sus cuatro distintos canales.

La velocidad de las gotas se midió utilizando el programa PCC2.2. La velocidad promedio de las gotas es de (7.33 ± 0.74) mm/s. Este promedio equivale a las mediciones realizadas en las trece áreas marcadas en la Figura 45. Los datos individuales de cada medición se muestran en la Tabla 4.

Es importante aclarar que esta velocidad es a la que viajan las gotas bajo las condiciones de flujos impuestos en cada bomba ($180 \mu\text{L/h}$ para la suma de las fases acuosas y $250 \mu\text{L/h}$ para la fase orgánica). A esta velocidad, el tiempo de residencia total de cada gota es de 39.41 s.

Tabla 4. Velocidad de las microgotas en diferentes secciones del microchip.

Velocidad de las microgotas (mm/s)				
Sección del microchip	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4
Recta inicial del recorrido	6.31	6.24	6.46	6.33
Cruz 5	8.10	8.12	8.54	8.54
Cruz 7	7.03	7.27	7.64	7.29
Cruz 12	7.63	7.21	6.83	7.63

Los datos presentados en la Tabla 4 muestran pequeñas diferencias entre sí. La velocidad a la que viajan las microgotas por los canales puede variar debido a la geometría de los canales (si son más o menos anchos o si la profundidad cambia de uno a otro).

Los tiempos de residencia de cada uno de los canales en los que se midió la fluorescencia se muestran en la Tabla 5.

5.11. Formación de microgotas y ensayos enzimáticos dentro del microchip.

Para determinar la actividad enzimática de PAS en las microgotas se decidió utilizar el sustrato 4-MUS, ya que el producto de la reacción, 4-MU, es un compuesto fluorescente y se puede monitorear fácilmente en las microgotas (esta reacción se muestra en la Figura 39).

Tabla 5. Tiempo de residencia de las microgotas en las tres cruces en las que se grabaron los experimentos de cinética enzimática.

	Canal	Distancia recorrida (mm)	Tiempo de residencia (s)	% del tiempo de residencia total
Cruz 5	a	39.90	5.44	13.80
	b	109.71	14.97	37.98
	c	179.51	24.49	62.14
	d	249.31	34.01	86.30
Cruz 7	a	49.80	6.79	17.23
	b	66.47	9.07	23.01
	c	83.14	11.34	28.77
	d	99.81	13.62	34.56
Cruz 12	a	119.60	16.32	41.41
	b	136.27	18.59	47.17
	c	152.94	20.86	52.93
	d	169.61	23.14	58.72

5.11.1. Curva de calibración en el microchip.

Para obtener la curva de calibración del producto de la reacción se inyectó en cada una de las entradas de fase acuosa disoluciones de 4-MU de la concentración requerida (0.0, 2.2, 4.4 o 6.6 μM). Se tomó un vídeo de 10 minutos para cada concentración, en las cruces 5, 7 y 12, en cada uno de sus canales (a, b, c y d). Se analizaron los datos y se promediaron los resultados de cada canal y cada cruz. El resultado final se observa en la Figura 46.

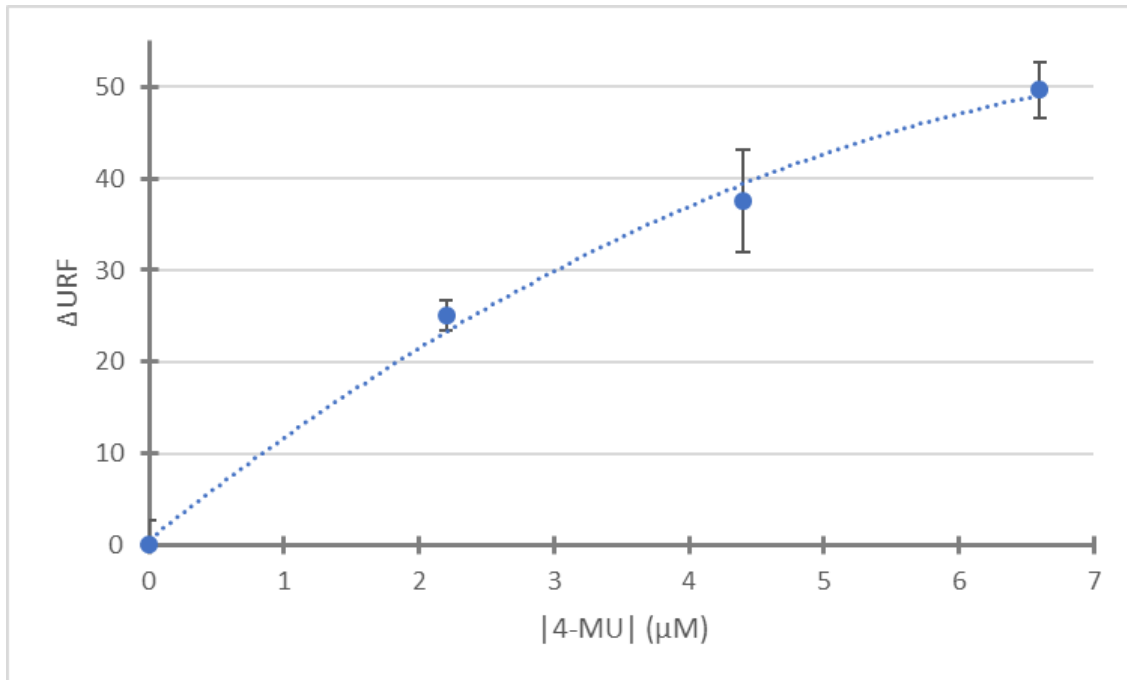


Figura 46. Curva de calibración de 4-MU en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 8, realizada en el microchip. La ecuación que representa el comportamiento de estos datos está representada por la línea punteada y corresponde a la forma $URF = a[4-MU]^2 + b[4-MU] + c$.

La ecuación que describe el comportamiento de los datos obtenidos en la curva de calibración es una ecuación de segundo grado:

$$URF = -0.6727[4 - MU]^2 + 11.781[4 - MU] + 0.6084 \quad 2)$$

$$R^2 = 0.9945$$

Esta ecuación será utilizada en las siguientes secciones para transformar los datos obtenidos en URF a unidades de concentración.

Idealmente, las curvas de calibración deben presentar un comportamiento lineal. En esta tesis no fue posible realizar una curva de calibración con comportamiento lineal porque, si se utilizaban concentraciones intermedias además de las que se escogieron (como 1.1, 3.3 o 5.5 μM), no era posible distinguir entre los valores que correspondían a la concentración 2.2 μM de los que correspondían

a la 1.1 μM , por ejemplo. Esto es debido al sistema de detección (ver sección 4.10.4. “Análisis de imágenes”), que no detecta solo un punto, sino una serie de ellos que deben ser sometidos a un tratamiento posterior. Sin embargo, aunque los puntos de la curva de calibración no siguen un comportamiento lineal, el último punto (6.6 μM), sí presenta una respuesta diferente, y posible de cuantificar, respecto al punto correspondiente a 4.4 μM .

5.11.2. Reacción de hidrólisis de 4-MUS con la enzima PAS en microgotas sin ningún inhibidor

Para realizar este ensayo, se utilizaron flujos de 60 $\mu\text{L/h}$ en cada una de las entradas de fase acuosa y de 250 $\mu\text{L/h}$ para la fase orgánica. En la primera de las entradas de fase acuosa con un canal largo en forma de serpentín se introdujo la enzima 87 nM (29 nM dentro de las microgotas), en la otra se introdujo el sustrato 4-MUS en concentración 19.8 μM (6.6 μM dentro de las microgotas) y en la entrada de en medio se introdujo buffer Tris-HCl. Los resultados mostrados en la Figura 47 corresponden al promedio de tres distintos experimentos realizados en diferentes días bajo las mismas condiciones.

En la Figura 47 se ha graficado cada uno de los puntos correspondientes a cada cruz y canal del microchip donde se llevaron a cabo las mediciones.

Utilizando la ecuación de la curva de calibración, ecuación 2), los datos en URF de la Figura 47 fueron transformados a unidades de concentración. La gráfica resultante de este análisis se muestra en la Figura 48. La ecuación de la recta que describe el comportamiento de los primeros cuatro puntos (30% de avance de la reacción considerando que la cantidad inicial de sustrato fue 6.6 μM), de la Figura 48 es:

$$|4 - MU| = 0.13 \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{s}} \right) [\text{Tiempo residencia}] + 0.42 \quad 3)$$
$$R^2 = 0.9852$$

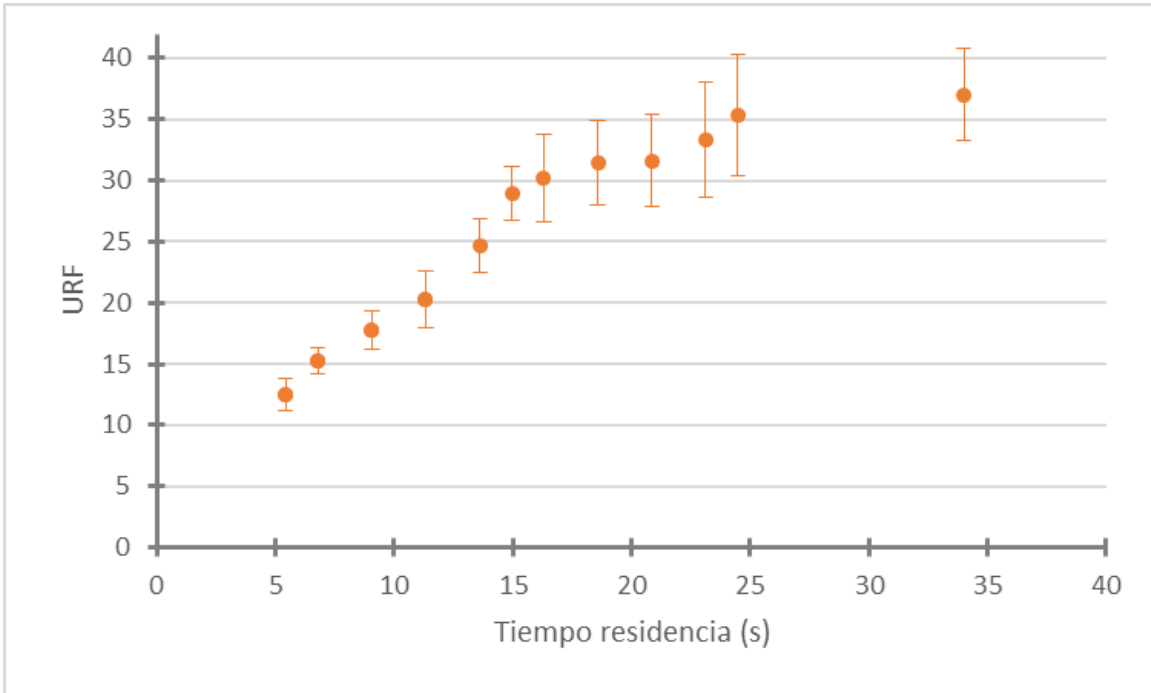


Figura 47. Curva de progreso de la reacción de la enzima PAS (29 nM), en el microchip, utilizando como sustrato 4-MUS 6.6 μM . El aumento de fluorescencia es debido a la hidrólisis del sustrato en la molécula 4-MU.

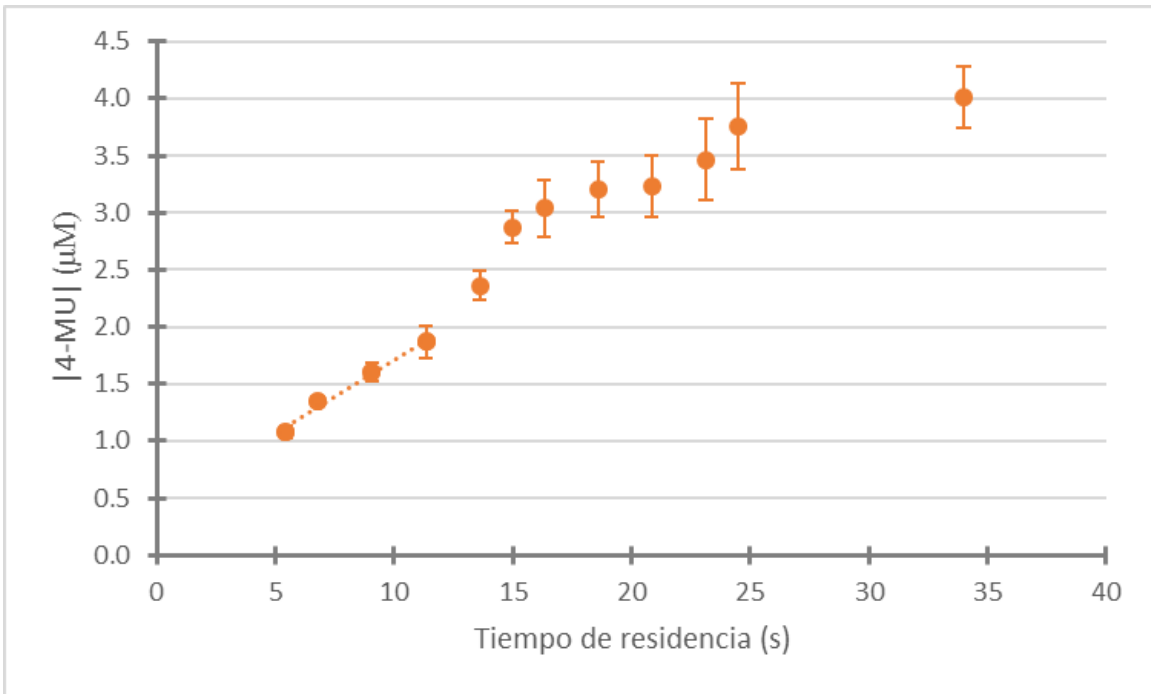


Figura 48. Progreso de la reacción de la enzima PAS (29 nM), en el microchip, utilizando como sustrato 4-MUS 6.6 μM . Los primeros cuatro puntos equivalen al 30% de avance de reacción.

Estrictamente, la fase inicial de la reacción dura hasta que máximo 10-15% de la concentración inicial de sustrato ha sido transformada a producto [61]. Sin embargo, en este trabajo en ninguna de las reacciones monitoreadas en el microchip se tienen suficientes puntos experimentales para calcular la velocidad cuando la reacción lleva este porcentaje de avance por lo que fue necesario utilizar la ecuación integrada de Michaelis-Menten. Utilizando esta ecuación fue posible comparar las velocidades iniciales obtenidas experimentalmente (cuando la reacción lleva un 30% de avance) con las que resultan al utilizar la ecuación antes mencionada. Como resultado, se concluyó que las velocidades iniciales obtenidas experimentalmente son entre 20 y 40% menores a las obtenidas teóricamente, por lo que fue necesario utilizar estas últimas para comparar los resultados de inhibición. El procedimiento para calcular las velocidades iniciales de forma teórica se encuentra en el anexo “Cálculo de las velocidades iniciales de reacción mediante la ecuación integrada de Michaelis-Menten”. En los siguientes casos, inhibición con pNPP y con extracto de cebolla, se considera el mismo avance de reacción, para calcular la pendiente de la recta que describe a estos puntos para después compararla con la calculada teóricamente.

En la Figura 49 se muestran tres series de datos distintas y todas ellas corresponden a la reacción de hidrólisis del 4-MUS por la enzima PAS, en ausencia de inhibidores. La línea azul corresponde al progreso de la reacción calculada teóricamente, como se menciona en el anexo mencionado en el párrafo anterior. La segunda serie representa los datos obtenidos experimentalmente (serie anaranjada). Estos datos son los mismos que se encuentran en la Figura 48, pero se decidió ponerlos en esta segunda figura para que la comparación visual entre estos datos y los calculados sea más sencilla. Por último, la serie color rosa representa los valores de la primera serie que fueron utilizados para conocer la velocidad inicial de reacción teórica. Estos valores fueron elegidos de tal forma que la reacción llevara un avance del 5% (0.33 μ M de producto formado).

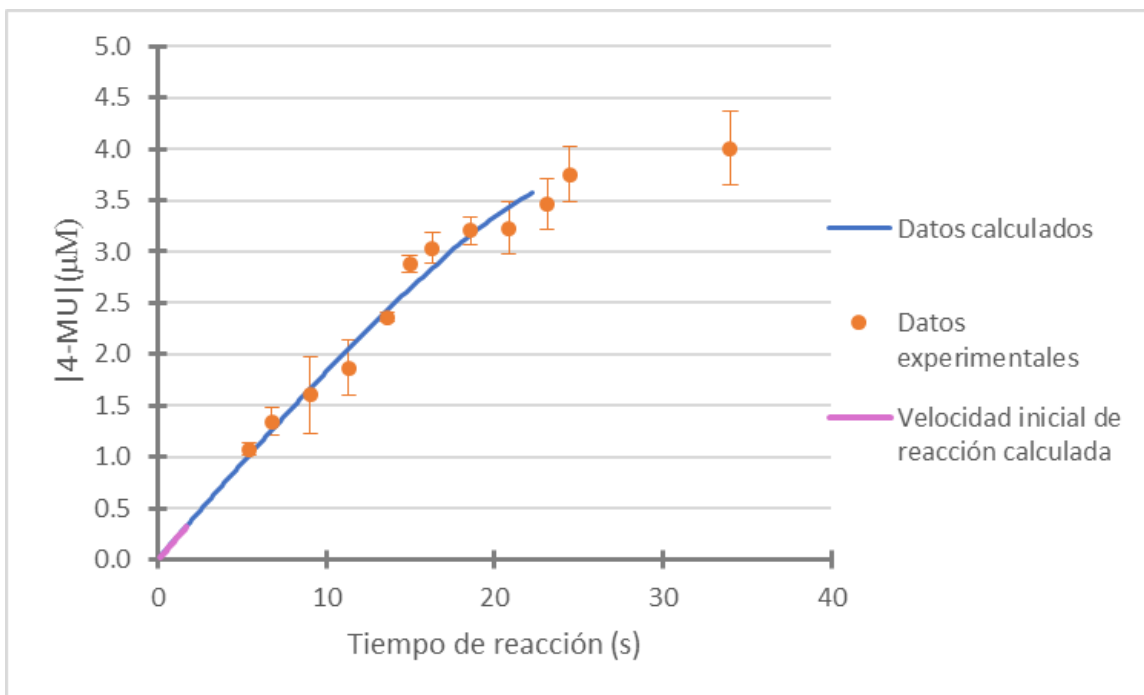


Figura 49. Curva calculada del progreso de reacción de la enzima PAS al hidrolizar 4-MUS (6.6μM), en buffer Tris-HCl 100 mM, 0.2% BSA, pH 8.0 (línea azul), junto con los datos experimentales de esta misma reacción en el microchip (serie anaranjada) y la velocidad inicial de reacción calculada (línea rosa).

La velocidad inicial de reacción calculada es:

$$|4 - MU| = 0.18 \left(\frac{\mu M}{s} \right) [Tiempo de reacción] + 0.0004 \quad 4)$$

La pendiente de la ecuación 4) es 38% más grande que la de la ecuación 3), aunque ambas representan a la misma reacción. Debido a que la velocidad inicial de reacción está representada por la pendiente de este tipo de gráficas, queda clara la importancia del cálculo realizado para conocer la velocidad inicial en la etapa en la que se ha consumido solo el 5% del sustrato.

En las gráficas de inhibición siguientes (sección 5.11.3. “Control positivo de inhibición. Inhibición con p-nitrofenilfosfato” y sección 5.11.4. “Inhibición con extracto de cebolla”) se siguió el mismo procedimiento para conocer la velocidad

inicial de reacción. Las ecuaciones reportadas en estas secciones serán las calculadas teóricamente mediante el ajuste antes mencionado. Las gráficas individuales obtenidas en el microchip, así como las ecuaciones que las describen se encuentran en el anexo 10.3. “Curvas de progreso de reacción obtenidas en el microchip”.

5.11.3. Control positivo de inhibición. Inhibición con p-nitrofenilfosfato.

Se usó pNPP para simular un inhibidor de enzima PAS. Se sabe que esta enzima tiene actividad promiscua de fosfatasa [4]. Este compuesto se introdujo en una concentración inicial de 5.94 mM (1.98 mM en las microgotas).

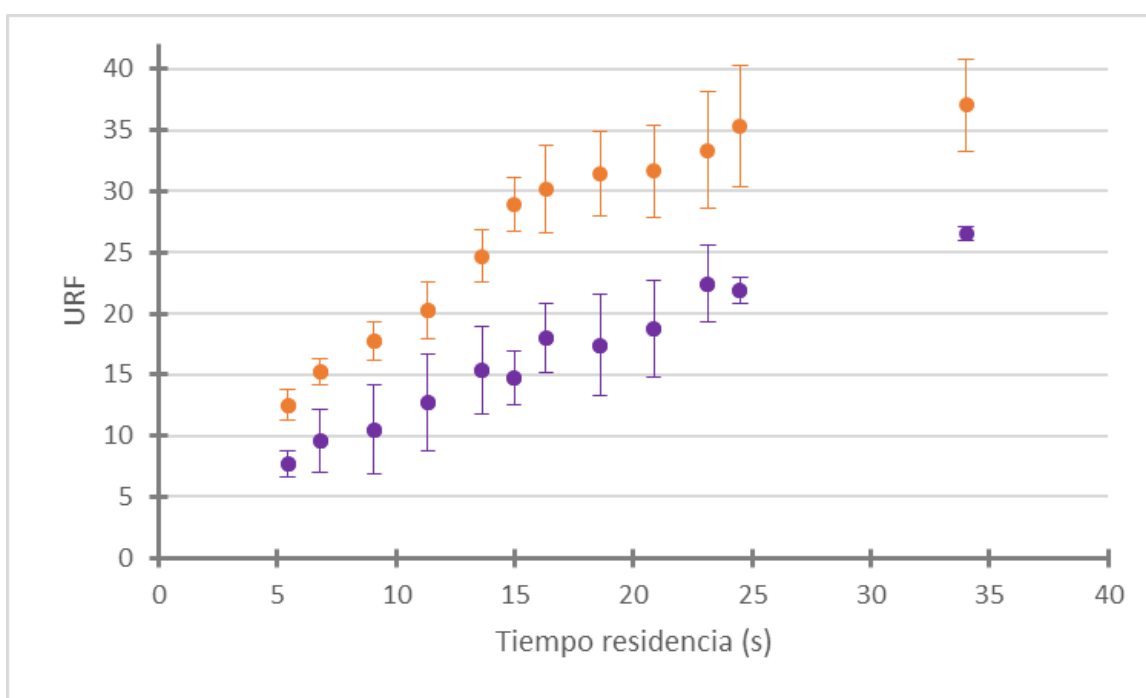


Figura 50. Progreso de la reacción de la enzima PAS (29 nM), en el microchip, utilizando como sustrato 4-MUS 6.6 μ M y agregando pNPP 1.98 mM como inhibidor. La serie anaranjada corresponde a la reacción sin inhibidor mientras que la morada corresponde a la reacción con pNPP.

De la misma forma que en el caso de la Figura 48, los valores de URF son transformados a unidades de concentración (Figura 51, serie morada).

El avance de reacción considerado para obtener la velocidad inicial y el porcentaje de inhibición, de este ensayo fue el mismo que en el caso anterior: 5%. El tiempo en el que se alcanzó este avance de reacción fue mayor que en el ensayo sin ningún inhibidor, por lo que una mayor cantidad de datos fueron utilizados.

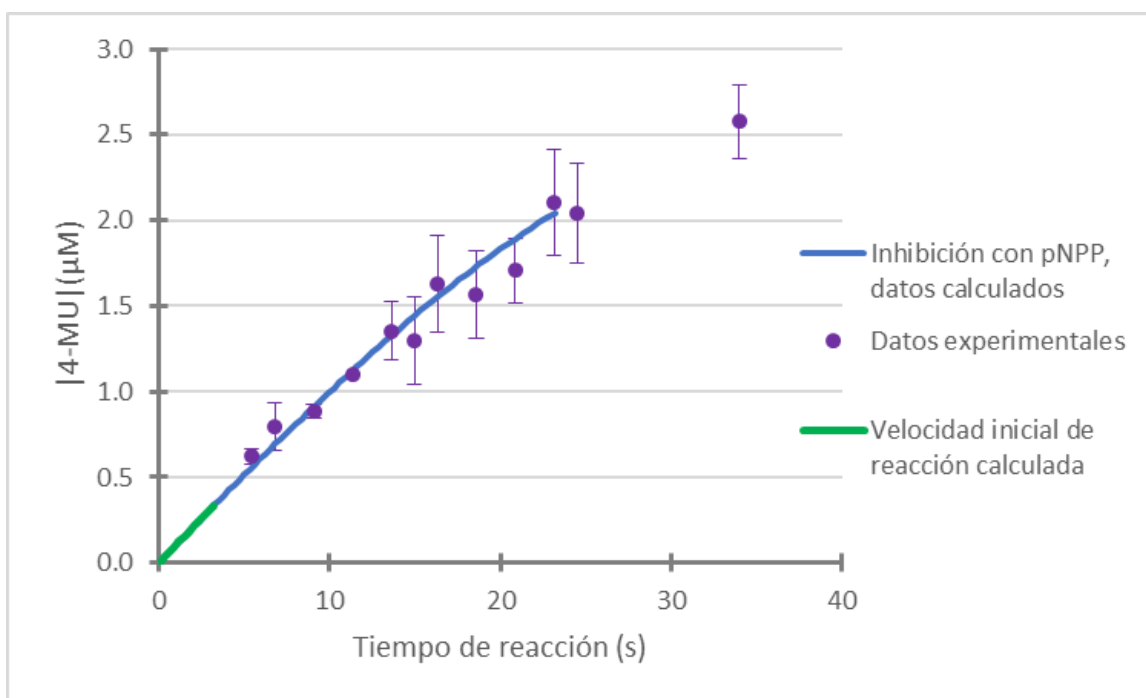


Figura 51. Progreso de la reacción de enzima PAS (29 nM), en el microchip, utilizando como sustrato 4-MUS 6.6 μM y agregando pNPP 1.98 mM como inhibidor. La línea azul corresponde a los datos calculados teóricamente mientras que los datos en morado son los experimentales. En color verde se observa el 5% de avance de la reacción.

La ecuación que describe el comportamiento de la reacción con pNPP es:

$$|4 - MU| = 0.10 \left(\frac{\mu M}{s} \right) [Tiempo\ residencia] + 0.0008 \quad 5)$$

La disminución de la velocidad inicial de la reacción con pNPP respecto a la que no tiene inhibidor es del 44%.

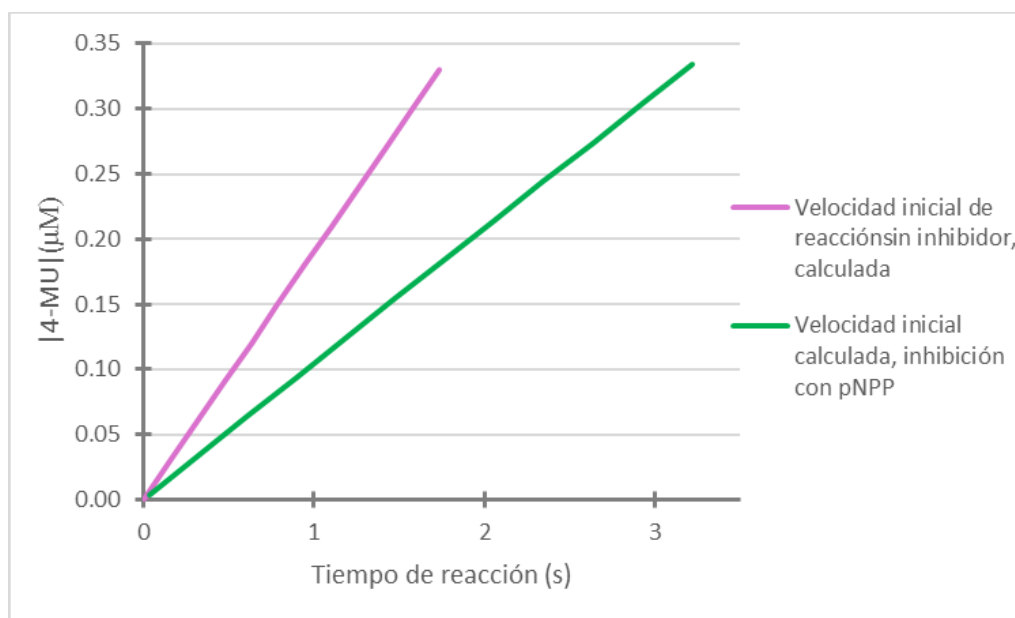


Figura 52. Velocidades iniciales de reacción de la enzima PAS (29 nM), en el microchip, utilizando como sustrato 4-MUS 6.6 μM y agregando pNPP 1.98 mM como inhibidor. La línea rosa corresponde a la reacción sin inhibidor mientras que la verde corresponde a la reacción con pNPP.

5.11.4. Inhibición con extracto de cebolla

Con el objetivo de demostrar que los extractos naturales son una buena fuente de compuestos con propiedades biológicas, se realizaron ensayos para probar los compuestos presentes en un extracto de cebolla preparado en el laboratorio.

Se decidió trabajar con el extracto de cebolla porque existen estudios de que la quercetina (compuesto natural abundante muchas plantas), presenta actividad inhibitoria de una sulfatasa humana [34]. Dado que todas las sulfatasas conocidas comparten hasta un 60% de similitud (considerando la longitud total de la secuencia de aminoácidos de la enzima) y el diseño del sitio activo es el mismo [28], se pensó

que era muy probable que un compuesto que inhibe a una sulfatasa humana sería capaz de inhibir también a la sulfatasa de *P. aeruginosa*. Con esto en mente, se buscó en la bibliografía estudios que reportaran la presencia de este compuesto en algún extracto natural y se encontró que existe en gran cantidad en la cebolla [45,46].

Este extracto fue introducido en el microchip tal como se hizo con la disolución de pNPP, que corresponde al control positivo de inhibición. El primer paso consistió en preparar el extracto, como se describe en la sección 4.10.5 para posteriormente introducirlo en el microchip.

Este extracto se compone de compuestos que presentan fluorescencia bajo las condiciones en las que se desarrolló el experimento, por lo que fue necesario tomar un blanco para conocer cuánta de esa fluorescencia provenía del extracto y cuánta se debía a la hidrólisis del 4-MUS. En las siguientes gráficas ya se ha restado la fluorescencia de los extractos tal como se describió en la sección 4.10.5. “Experimentos de inhibición con un extracto de cebolla” de la metodología.

El primer experimento se realizó introduciendo el extracto sin diluir, lo cual equivale a una concentración de 95 mg/mL del extracto en las microgotas y los resultados se muestran en la Figura 53 con la serie en color azul.

La conversión de los datos en URF a unidades de concentración se hizo utilizando la ecuación 2). Los resultados se muestran en la Figura 54.

El avance de reacción considerado para obtener la velocidad inicial, y el porcentaje de inhibición, de este ensayo fue el mismo que en los dos casos anteriores: 5%. La ecuación que representa este comportamiento es:

$$|4 - MU| = 0.08 \left(\frac{\mu M}{s} \right) [Tiempo\ residencia] + 0.0007 \quad 6)$$

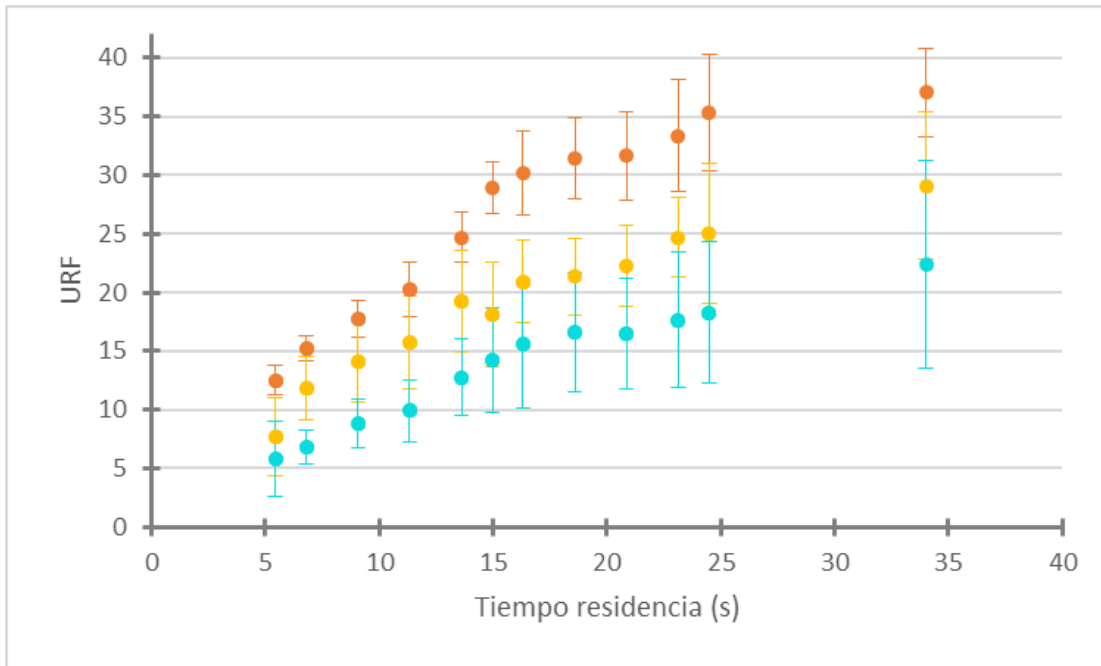


Figura 53. Reacción de enzima PAS (29 nM), en el microchip, utilizando como sustrato 4-MUS 6.6 μM y utilizando el extracto de cebolla como fuente de un compuesto inhibidor de la enzima estudiada. La serie en color azul representa las microgotas con 95 mg/mL del extracto y la amarilla corresponde a una concentración de 48 mg/mL del extracto. La serie color anaranjado representa al experimento sin inhibidor.

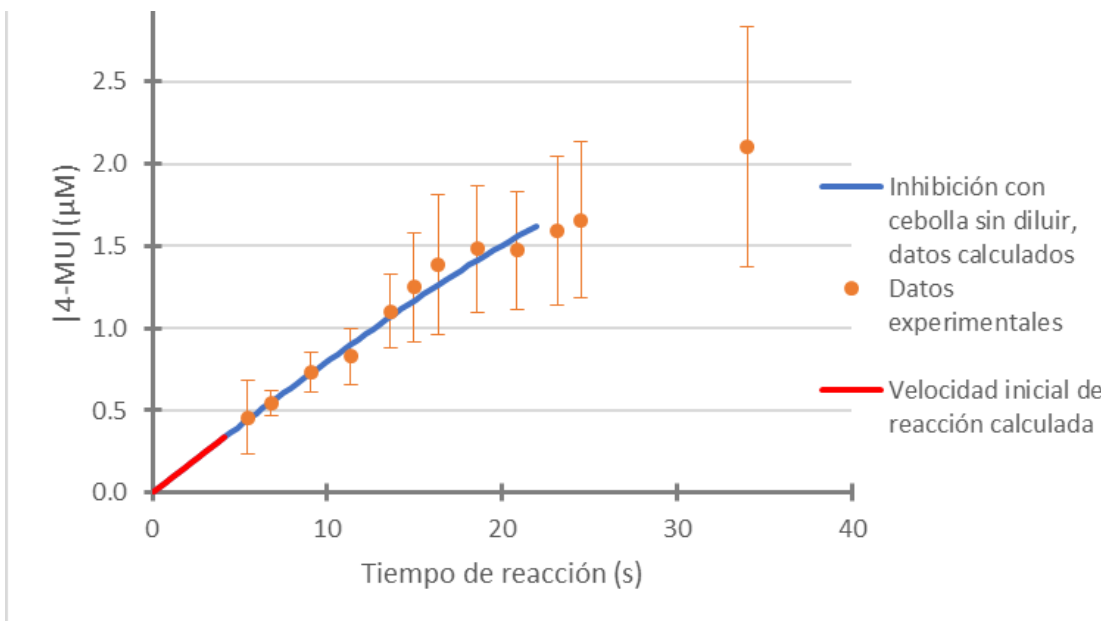


Figura 54. Progreso de la reacción de la enzima PAS (29 nM) utilizando como sustrato 4-MUS, en el microchip, 6.6 μM y utilizando el extracto de cebolla (95 mg/mL del extracto) como fuente de un compuesto inhibidor de la enzima estudiada. La línea azul corresponde a los datos calculados teóricamente mientras que los datos en anaranjado son los experimentales. En color rojo se observa el 5% de avance de la reacción.

La disminución de la velocidad inicial de este experimento con el extracto de cebolla (95 mg/mL del extracto) respecto al experimento sin ningún inhibidor es del 56%.

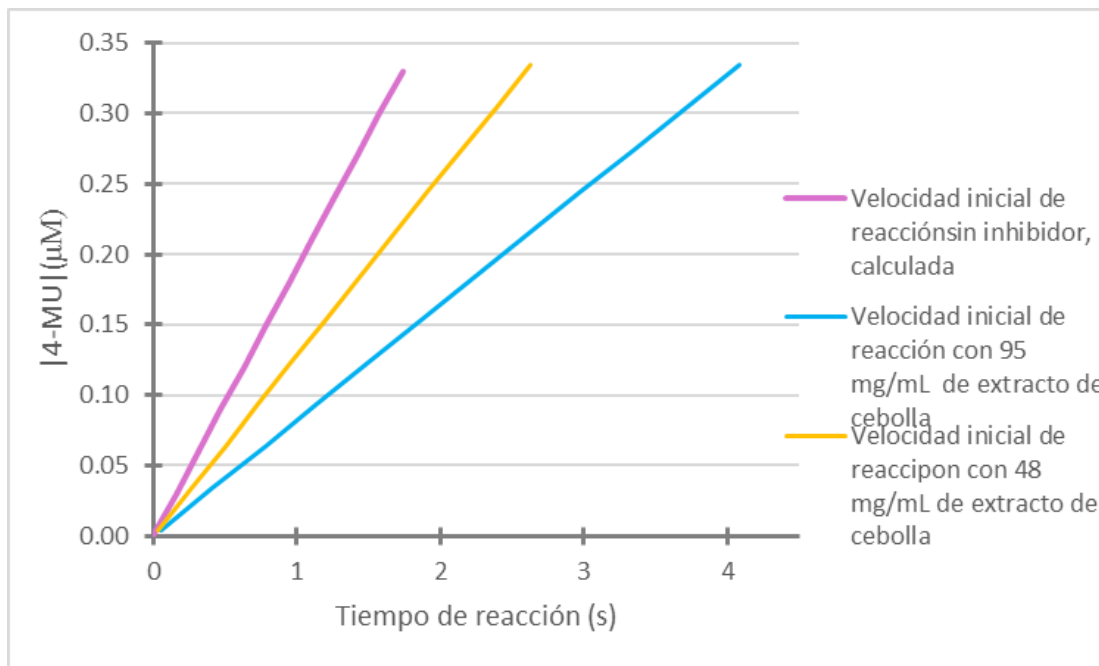


Figura 55. Velocidades iniciales de reacción de la enzima PAS (29 nM), en el microchip, utilizando como sustrato 4-MUS 6.6 μM y agregando extracto de cebolla en concentración 95 mg/mL (línea azul) y 48 mg/mL (línea amarilla). La línea rosa corresponde a la reacción sin inhibidor.

El segundo ensayo con el extracto de cebolla consistió en la dilución de este mismo dos veces (48 mg/mL de extracto en las microgotas). La gráfica de este ensayo se muestra en color amarillo en las Figuras 53 (en URF) y 56 (en unidades de concentración). La ecuación que representan el comportamiento de los puntos calculados al inicio de la reacción es:

$$|4 - MU| = 0.13 \left(\frac{\mu M}{s} \right) [Tiempo\ residencia] + 0.0006 \quad 7)$$

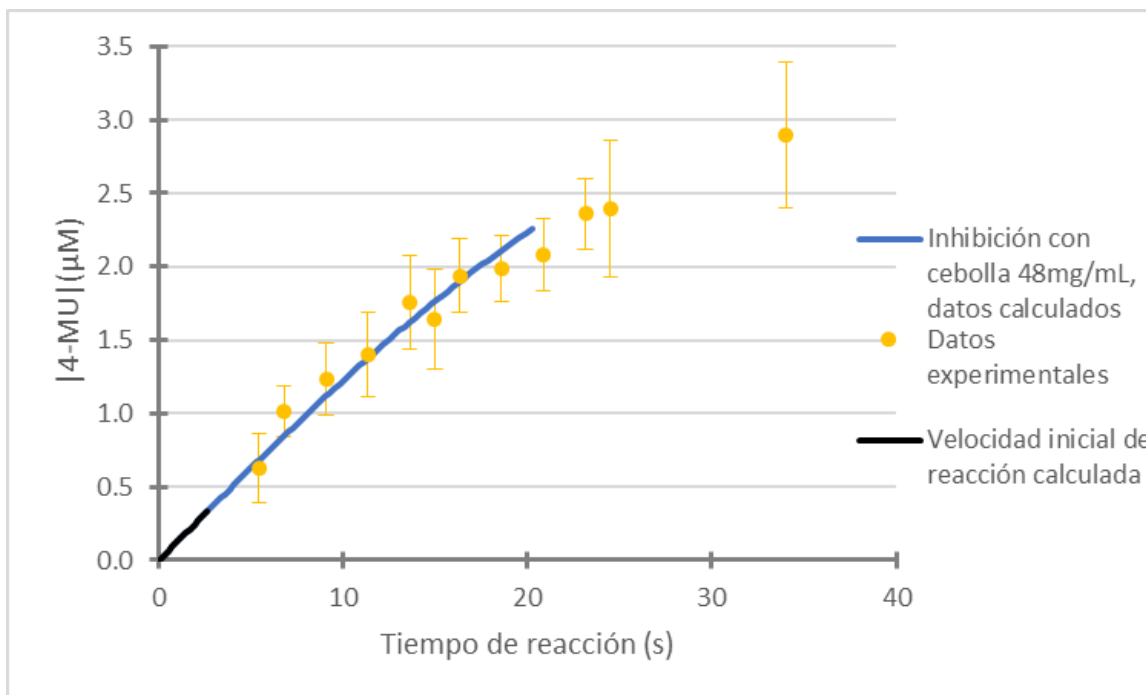


Figura 56. Progreso de la reacción de la enzima PAS (29 nM) utilizando como sustrato 4-MUS, en el microchip, 6.6 μM y utilizando el extracto de cebolla (48 mg/mL del extracto) como fuente de un compuesto inhibidor de la enzima estudiada. La línea azul corresponde a los datos calculados teóricamente mientras que los datos en amarillo son los experimentales. En color negro se observa el 5% de avance de la reacción.

La disminución de la velocidad inicial de este experimento respecto a la original (serie en color azul) es del 27%. En la Figura 55 se observan las velocidades iniciales de la reacción sin inhibidor y con el extracto de cebolla en dos concentraciones.

Una de las principales ventajas que presenta la técnica aquí descrita para la realización de los ensayos enzimáticos, es la cantidad de replicados que se pueden realizar. Con los flujos utilizados durante el desarrollo de este trabajo, la formación de las microgotas se lleva a cabo a razón de 6 gotas por cada segundo y considerando que los experimentos se grabaron durante 10 minutos, se tiene que en este tiempo se realizaron 3600 ensayos independientes ya que cada gota es un reactor distinto. La segunda gran ventaja de esta técnica es la cantidad de reactivos utilizados, lo cual disminuye los costos de cada ensayo realizado. Por cada hora de trabajo se utilizaron 430 μL (entre disoluciones acuosas y aceite fluorinado).

También, como secuencia de la disminución de la cantidad de reactivos utilizados, se disminuye la cantidad de desechos generados, provocando que el costo del tratamiento de residuos disminuya y dando un carácter amigable con el medio ambiente a esta técnica. Por último, es importante destacar que el diseño de los microchips es fácil, rápido y de bajo costo por lo que se pueden diseñar distintos patrones que cumplan con las características especiales que requiera el experimentador.

6. Resumen de resultados

Se evaluó la actividad enzimática de la proteína PAS en microgotas de microfluídica utilizando como sustrato al 4-MUS y se evaluó el porcentaje de inhibición de dos disoluciones distintas: p-nitrofenilfosfato y extracto de cebolla. El pNPP se utilizó como control positivo de inhibición mientras que el extracto de cebolla fue la muestra problema que resultó inhibir el 56% de la actividad inicial, cuando el extracto estaba en concentración 95 mg/mL, y 27% cuando el extracto estaba en concentración 48 mg/mL.

7. Conclusiones

Se evaluó la actividad enzimática de la arilsulfatasa de *P. aeruginosa* dentro de microgotas de microfluídica utilizando la fluorescencia como método de detección, demostrándose que la técnica desarrollada en este trabajo es adecuada para la identificación de extractos naturales que contengan inhibidores de esta misma enzima.

8. Perspectivas

Se podría acoplar un equipo de HPLC al microchip para así separar los compuestos que integran al extracto de cebolla y conocer si la inhibición de la enzima PAS es debida a uno o más compuestos de los presentes en el extracto. Así mismo, el acoplamiento de esta técnica de separación permitirá analizar una gran cantidad de extractos naturales (y los compuestos que los componen) y su uso se extendería al estudio de otras enzimas de interés.

Evaluar si el diseño del microchip utilizado en este trabajo es adecuado para el acoplamiento del HPLC.

Adquirir estándares de los compuestos que se piensa contiene el extracto natural de cebolla y estudiarlos en el HPLC bajo el mismo programa de elución que se utiliza con el extracto crudo. Si el estándar eluye al mismo tiempo que cierto pico del extracto, es muy probable que se trate del mismo compuesto (aunque esta no sea una prueba contundente).

9. Referencias

1. Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368–373.
2. Abalde-Cela, S., Taladriz-Blanco, P., De Oliveira, M. G., & Abell, C. (2018). Droplet microfluidics for the highly controlled synthesis of branched gold nanoparticles. *Scientific Reports*, 8(1), 2240.
3. Ochoa, A., Álvarez-Bohórquez, E., Castellero, E., & Olguin, L. F. (2017). Detection of Enzyme Inhibitors in Crude Natural Extracts Using Droplet-Based Microfluidics Coupled to HPLC. *Analytical Chemistry*, 89(9), 4889–4896.
4. Dittrich, P. S., Jahnz, M., & Schwille, P. (2005). A new embedded process for compartmentalized cell-free protein expression and on-line detection in microfluidic devices. *ChemBioChem*, 6(5), 811–814.
5. Damean, N., Olguin, L. F., Hollfelder, F., Abell, C., & Huck, W. T. S. (2009). Simultaneous measurement of reactions in microdroplets filled by concentration gradients. *Lab on a Chip*, 9(12), 1707–1713.
6. Kim, J. Y., Cho, S. W., Kang, D. K., Edel, J. B., Chang, S. I., Demello, A. J., & O'Hare, D. (2012). Lab-chip HPLC with integrated droplet-based microfluidics for separation and high frequency compartmentalisation. *Chemical Communications*, 48(73), 9144–9146.
7. Boehm, D. A., Gottlieb, P. A., & Hua, S. Z. (2007). On-chip microfluidic biosensor for bacterial detection and identification. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 126(2), 508–514.
8. Nge, P. N., Rogers, C. I., & Woolley, A. T. (2013). Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications. *Chemical Reviews*, 113(4), 2550-2583.
9. Okushima, S., Nisisako, T., Torii, T., & Higuchi, T. (2004). Controlled production of monodisperse double emulsions by two-step droplet breakup in microfluidic devices. *Langmuir*, 20(23), 9905–9908.

10. Christopher, G. F., & Anna, S. L. (2007). Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *40*(19), R319.
11. Riess, J. G., & Krafft, M. P. (1998). Fluorinated materials for in vivo oxygen transport (blood substitutes), diagnosis and drug delivery. *Biomaterials*, *19*(16), 1529–1539.
12. Etienne, G., Kessler, M., & Amstad, E. (2017). Influence of Fluorinated Surfactant Composition on the Stability of Emulsion Drops. *Macromolecular Chemistry and Physics*, *218*(2), 1–10.
13. Roach, L. S., Song, H., & Ismagilov, R. F. (2005). Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluorosurfactants. *Analytical Chemistry*, *77*(3), 785–796.
14. Holtze, C., Rowat, A. C., Agresti, J. J., Hutchison, J. B., Angilè, F. E., Schmitz, C. H. J., ... & Johnson, J. S. (2008). Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab on a Chip*, *8*(10), 1632–1639.
15. Price, A. K., & Paegel, B. M. (2016). Discovery in Droplets. *Analytical Chemistry*, *88*(1), 339–353.
16. Song, H., & Ismagilov, R. F. (2003). Millisecond Kinetics on a Microfluidic Chip Using Nanoliters of Reagents. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(47), 14613–14619.
17. Cai, L. F., Zhu, Y., Du, G. S., & Fang, Q. (2012). Droplet-based microfluidic flow injection system with large-scale concentration gradient by a single nanoliter-scale injection for enzyme inhibition assay. *Analytical Chemistry*, *84*(1), 446–452.
18. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, *79*(3), 629–661.
19. Carnero, A. (2006). High throughput screening in drug discovery. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *8*(7), 482–490.

20. Hertzberg, R. P., & Pope, A. J. (2000). High-throughput screening: New technology for the 21st century. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(4), 445–451.
21. Mayr, L. M., & Bojanic, D. (2009). Novel trends in high-throughput screening. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5), 580–588.
22. Dunn, D. A., & Feygin, I. (2000). Challenges and solutions to ultra-high-throughput screening assay miniaturization: Submicroliter fluid handling. *Drug Discovery Today*, 5(12), S84–S91.
23. World Health Organization (2015). Essential medicines. [en línea] Disponible en: http://www.who.int/medicines/services/essmedicines_def/en/ [Consultado 20 Agosto, 2018].
24. Hobkirk, R. (1993). Steroid sulfation: current concepts. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 4(2), 69-74.
25. Hatzios, S. K., & Bertozzi, C. R. (2011). The regulation of sulfur metabolism in mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 7(7), 1–8.
26. Sánchez-Romero, J. J., & Olguin, L. F. (2015). Choline sulfatase from *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*: Characterization of the unmodified enzyme. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 3, 161–168.
27. Von Figura, K., Schmidt, B., Selmer, T., & Dierks, T. (1998). A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: Its role in catalysis and disease. *BioEssays*, 20(6), 505–510.
28. Hanson, S. R., Best, M. D., & Wong, C. H. (2004). Sulfatases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(43), 5736–5763.
29. Dierks, T., Miech, C., Hummerjohann, J., Schmidt, B., Kertesz, M. A., & von Figura, K. (1998). Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25560-25564.
30. Bojarová, P., & Williams, S. J. (2008). Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5), 573–581.

31. Olguin, L. F., Askew, S. E., O'Donoghue, A. M. C., & Hollfelder, F. (2008). Efficient catalytic promiscuity in an enzyme superfamily: An arylsulfatase shows a rate acceleration of 10¹³ for phosphate monoester hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 130(49), 16547–16555.
32. O'Brien, P. J., & Herschlag, D. (1998). Sulfatase activity of E. coli alkaline phosphatase demonstrates a functional link to arylsulfatases, an evolutionarily related enzyme family [10]. *Journal of the American Chemical Society*, 120(47), 12369–12370.
33. Guerra, W. F., Verity, M. A., Fluharty, A. L., Nguyen, H. T., & Philippart, M. (1990). Multiple sulfatase deficiency: clinical, neuropathological, ultrastructural and biochemical studies. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 49(4), 406-423.
34. Huang, Z., Fasco, M. J., & Kaminsky, L. S. (1997). Inhibition of estrone sulfatase in human liver microsomes by quercetin and other flavonoids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 63(1–3), 9–15.
35. Ahmed, S., Owen, C., James, K., Sampson, L., & Patel, C. (2002). Review of estrone sulfatase and its inhibitors: an important new target against hormone dependent breast cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 9(2), 263–273.
36. World Health Organization. (2015). *The top 10 causes of death*. [en línea] Disponible en: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Revisado 20 Agosto, 2018].
37. Boltes, I., Czapinska, H., Kahnert, A., Von Bülow, R., Dierks, T., Schmidt, B., & Usón, I. (2001). 1.3 Å structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family. *Structure*, 9(6), 483–491.
38. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. M. (1989). Molecular Cloning A Laboratory Manual. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*.
39. Copley, S. D. (2017). Shining a light on enzyme promiscuity. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, 167–175.

40. Pandya, C., Farelli, J. D., Dunaway-Mariano, D., & Allen, K. N. (2014). Enzyme promiscuity: Engine of evolutionary innovation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(44), 30229–30236.
41. Novagen. (2003). pET System Manual Novagen, 1–68.
42. Beil, S., Kehrl, H., James, P., Staudenmann, W., Cook, A. M., Leisinger, T., & Kertesz, M. A. (1995). Purification and Characterization of the Arylsulfatase Synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO During Growth in Sulfate-Free Medium and Cloning of the Arylsulfatase Gene (*atsA*). *European Journal of Biochemistry*, 229(2), 385–394.
43. Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W. L., Weitz, D. A., Griffiths, A. D., & Heyman, J. A. (2013). Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature Protocols*, 8(5), 870–891.
44. Procedure, S. O. (2007). SU-8 Photoresist Processing. *Emergency Medical Services*, 73246(617), 0–4.
45. Wach, A., Pyrzyńska, K., & Biesaga, M. (2007). Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry*, 100(2), 699–704.
46. Kumar, B., Smita, K., Kumar, B., Cumbal, L., & Rosero, G. (2014). Microwave-Assisted Extraction and Solid-Phase Separation of Quercetin from Solid Onion (*Allium cepa* L.). *Separation Science and Technology*, 49(16), 2502–2509.
47. Shembekar, N., Chaipan, C., Utharala, R., & Merten, C. A. (2016). Droplet-based microfluidics in drug discovery, transcriptomics and high-throughput molecular genetics. *Lab on a Chip*, 16(8), 1314–1331.
48. Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3(4), 200.
49. Lee, C. Y., Wang, W. T., Liu, C. C., & Fu, L. M. (2016). Passive mixers in microfluidic systems: A review. *Chemical Engineering Journal*, 288, 146–160.
50. Zhou, J., Ellis, A. V., & Voelcker, N. H. (2010). Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. *Electrophoresis*, 31(1), 2–16.

51. Song, H., Tice, J. D., & Ismagilov, R. F. (2003). A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(7), 768–772.
52. Stroock, A. D., Dertinger, S. K. W., Ajdari, A., Mezić, I., Stone, H. A., & Whitesides, G. M. (2002). Chaotic mixer for microchannels. *Science*, 295(5555), 647–651.
53. Álvarez, E. (2013). *Evaluación de extractos naturales con posible efecto inhibitorio de la actividad enzimática de la neuraminidasa de Clostridium perfringens por medio de ensayos espectrofotométricos* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Mx.
54. Ochoa, A. (2016). *Identificación de inhibidores de la enzima neuraminidasa de Clostridium perfringens en un dispositivo de microfluídica asociado a un equipo de HPLC* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Mx.
55. Castillero, J. E. (2015). *Acoplamiento de un instrumento de HPLC a un microchip de microfluídica para ensayos de inhibición enzimática* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Mx.
56. Bhatia, S. N., & Ingber, D. E. (2014). Microfluidic organs on chips. *Nature Biotechnology*, 32(8), 760–772.
57. Chong, Z. Z., Tan, S. H., Gañán-Calvo, A. M., Tor, S. B., Loh, N. H., & Nguyen, N. T. (2016). Active droplet generation in microfluidics. *Lab on a Chip*, 16(1), 35–58.
58. Bielicki, J., Hopwood, J. J., Wilson, P. J., & Anson, D. S. (1993). Recombinant human iduronate-2-sulphatase: correction of mucopolysaccharidosis-type II fibroblasts and characterization of the purified enzyme. *Biochemical Journal*, 289(1), 241–246.
59. Cornish-Bowden, A., (1995). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, London, Portland Press.
60. Skhiri, Y., Gruner, P., Semin, B., Brosseau, Q., Pekin, D., Mazutis, L., & Mayot, E. (2012). Dynamics of molecular transport by surfactants in emulsions. *Soft Matter*, 8(41), 10618-10627.

61. Copeland, R. A. (2013). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*. John Wiley & Sons.

10.ANEXOS

10.1. Curvas de calibración en espectrofotómetro.

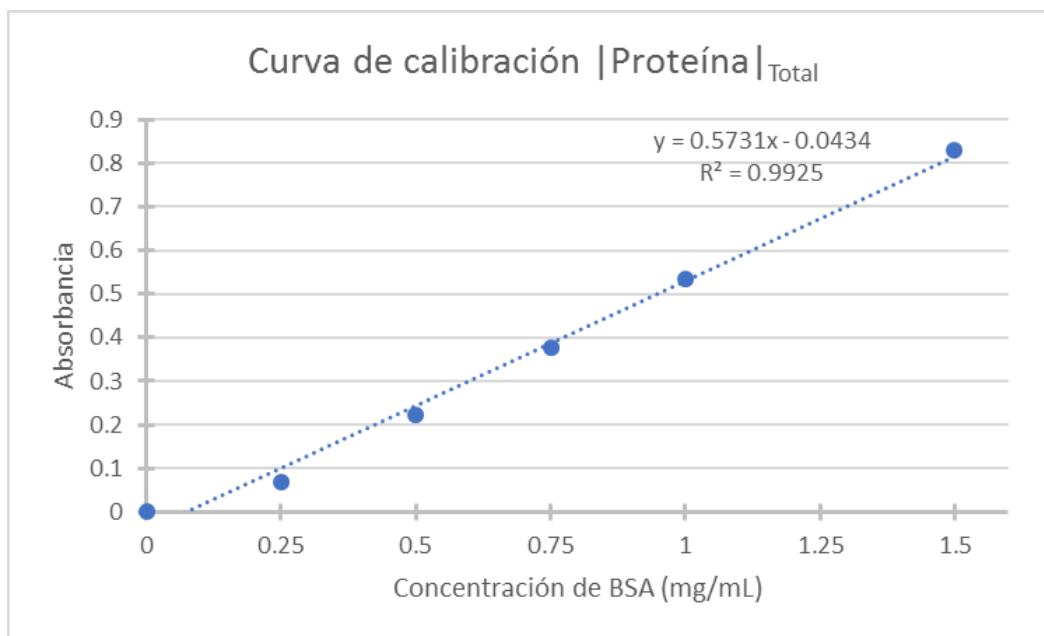


Figura A-1. Curva de calibración con BSA para determinar la concentración de proteína total en las muestras resultantes de la expresión de la proteína.

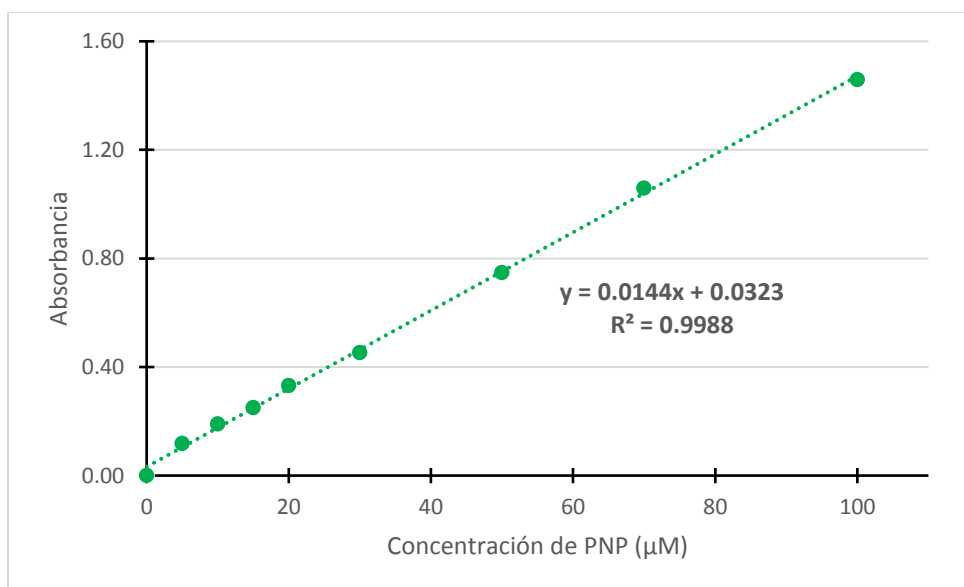


Figura A-2. Curva patrón de 4-nitrofenol en buffer Tris-HCl 100 mM, 0.2% BSA, pH 8.0.

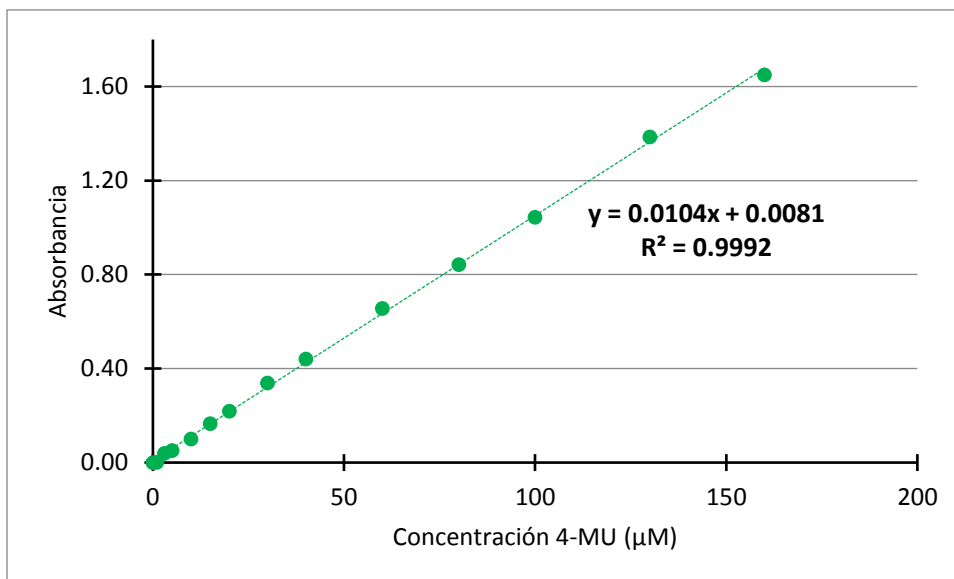


Figura A-3. Curva patrón de 4-MU en buffer Tris-HCl 100 mM, 0.2% BSA, pH 8.0.

10.2. Cálculo de las velocidades iniciales de reacción mediante la ecuación integrada de Michaelis-Menten

El procedimiento para calcular las velocidades iniciales cuando la reacción no tiene ningún inhibidor y cuando si lo tiene (pNPP y extracto de cebolla) se describe a continuación:

1. Linealizando la ecuación de Michaelis-Menten integrada:

$$\frac{t}{|S_0 - S|} = \frac{k_M}{V_{m\acute{a}x}} \frac{\ln(S_0/S)}{|S_0 - S|} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{A-1)}$$

se graficaron los datos experimentales de tiempo (t), cantidad de sustrato inicial (S_0) y cantidad de sustrato remanente (S) para obtener el valor de la pendiente ($\frac{k_M}{V_{m\acute{a}x}}$) y la ordenada al origen ($\frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$).

2. Se propusieron valores de S, cuidando que correspondieran a un avance de reacción de máximo 5%.
3. Con los datos anteriores se calcularon los valores correspondientes para distintas abscisas $\left(\frac{\ln(S_0/S)}{|S_0-S|}\right)$.
4. Con la pendiente y ordenada al origen (obtenidas en el paso 1) y los valores correspondientes de cada abscisa (obtenidos en el punto 3), se calcularon los datos correspondientes de las ordenadas $\left(\frac{t}{|S_0-S|}\right)$.
5. Se despejó el tiempo correspondiente a cada una de las ordenadas ($t = y * \ln \frac{S_0}{S}$) y se calculó su valor en cada punto utilizando los valores de S propuestos en el paso 2.
6. Finalmente, se graficó la cantidad de producto formado en función del tiempo calculado. Como comparación, en la misma gráfica se colocó la serie de datos experimentales para comprobar que el modelo se ajusta adecuadamente a ellos.

Las Figuras 47,49, 53 y 54 muestran el resultado de este análisis.

10.3. Curvas de progreso de reacción obtenidas en el microchip

La ecuación que representa la velocidad de la reacción cuando esta llevaba un 30% de avance en presencia de pNPP es:

$$|4 - MU| = 0.07 \left(\frac{\mu M}{s}\right) [\text{Tiempo de reacción}] + 0.28 \quad \text{A-2)}$$

La figura correspondiente es la A-4.

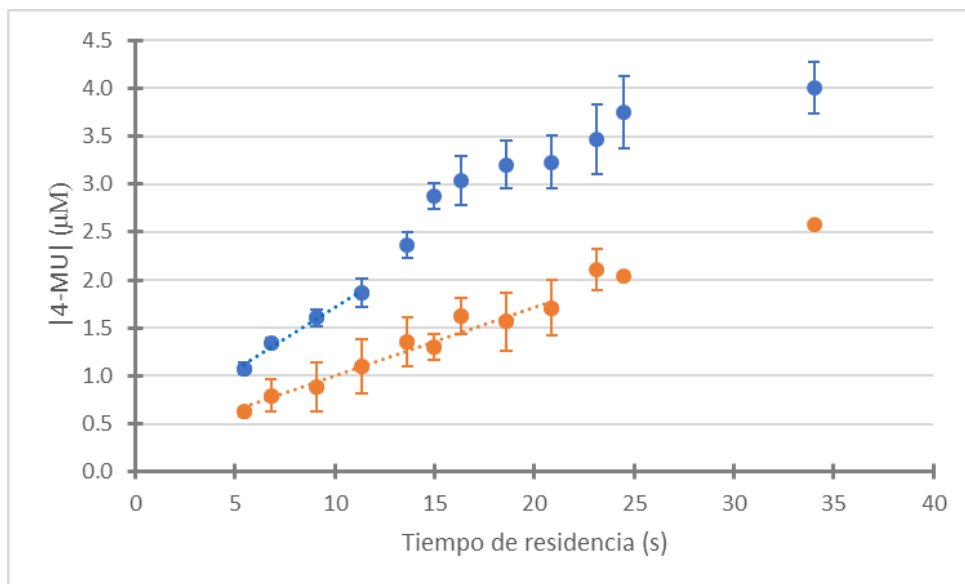


Figura A-4. Datos experimentales del progreso de la reacción de la enzima PAS (29 nM), en el microchip, utilizando como sustrato 4-MUS 6.6 μM y agregando pNPP 1.98 mM como inhibidor. La serie azul corresponde a la reacción sin inhibidor mientras que la anaranjada corresponde a la reacción con pNPP. Los valores en el eje Y fueron obtenidos a partir de la ecuación 2.

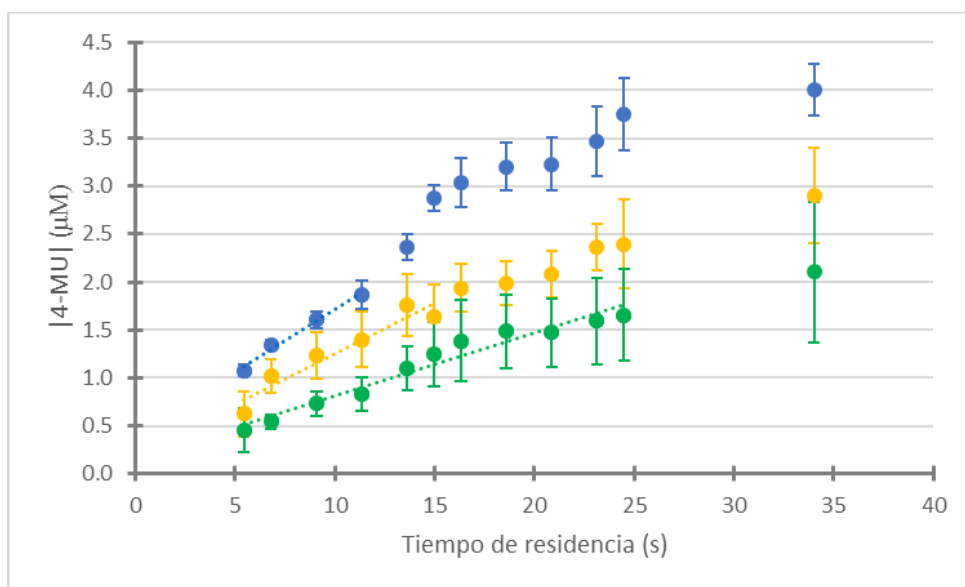


Figura A-5. Datos experimentales del progreso de la reacción de la enzima PAS (29 nM), en el microchip, utilizando como sustrato 4-MUS 6.6 μM y agregando extracto de cebolla como inhibidor en concentración 95 mg/mL (serie verde) y 48 mg/mL (serie amarilla). La serie azul corresponde a la reacción sin inhibidor. Los valores en el eje Y fueron obtenidos a partir de la ecuación 2.

La ecuación que representa la velocidad inicial calculada de los datos experimentales con el extracto de cebolla en concentración 48 mg/mL es la A-3 mientras que la A-4 corresponde a los datos con el extracto en concentración 95 mg/mL. Ambas ecuaciones fueron calculadas para los datos que corresponden al 30% de avance de la reacción.

$$|4 - MU| = 0.11 \left(\frac{\mu M}{s} \right) [\textit{Tiempo de reacción}] + 0.19 \quad \text{A-3)}$$

$$|4 - MU| = 0.06 \left(\frac{\mu M}{s} \right) [\textit{Tiempo de reacción}] + 0.16 \quad \text{A-4)}$$