



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS: DESARROLLO DE UN TENSOACTIVO FLUORADO QUE PERMITE LA
GENERACIÓN DE MICROGOTAS ESTABLES EN UN SISTEMA DE MICROFLUÍDICA
PARA EL DESARROLLO DE ENSAYOS BIOLÓGICOS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO

PRESENTA

ARMANDO

LÓPEZ LUNA



CDMX.

2020



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: Ernesto Carrillo Nava**
VOCAL: **Profesor: Joaquin Preza De La Vega**
SECRETARIO: **Profesor: Luis Fernando Olguín Contreras**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Luis Alejandro Diaz Flores**
2° SUPLENTE: **Profesor: Juan Rolando Vazquez Miranda**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 309, BIOFISICOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

SUSTENTANTE:

Armando López Luna

Agradecimientos.

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

“Búsqueda Masiva de Compuestos Antibacterianos Producidos por Microorganismos no Cultivables Utilizando una Plataforma de Microfluídica”

Clave: 284240

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

A la Dra. Itzel Guerrero por permitirnos realizar la síntesis del tensoactivo en el laboratorio F-209, así como dar su guía y apoyo técnico para lograr concluir con éxito este proyecto.

Índice de contenido

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introducción | 1 |
| 1.1 | Planteamiento del problema | 2 |
| 1.2 | Objetivos | 4 |
| 1.3 | Hipótesis | 5 |
| 2 | Antecedentes..... | 6 |
| 2.1 | Microfluídica | 7 |
| 2.1.1 | Dinámica de flujos en los dispositivos de microfluídica..... | 9 |
| 2.1.2 | Técnicas de separación acopladas a dispositivos de microfluídica basados en microgotas para realizar ensayos bioquímicos | 10 |
| 2.1.4 | Microgotas y su estabilidad | 11 |
| 2.2 | Tensoactivos en microfluídica basada en gotas | 12 |
| 3 | Materiales y metodología..... | 16 |
| 3.1 | Fabricación de microchips. | 17 |
| 3.1.1 | Fabricación de moldes mediante las técnicas de fotolitografía y litografía suave. | 18 |
| 3.1.2 | Fabricación de las réplicas de PDMS de microchips por medio de la técnica de litografía suave. | 20 |
| 3.1.3 | Caracterización física de microchips de PDMS. | 21 |
| 3.2 | Funcionamiento de los dispositivos de microfluídica..... | 23 |
| 3.2.1 | Generación de microgotas en el chip GAF..... | 25 |
| 3.2.2 | Reintroducción de microgotas en el chip R μ G..... | 26 |
| 3.2.3 | Espaciado de microgotas en el chip R μ G. | 27 |
| 3.3 | Síntesis de un tensoactivo fluorado..... | 28 |
| 3.3.1 | Síntesis del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE. | 28 |

| | |
|--|----|
| 3.4 Purificación del tensoactivo fluorado. | 29 |
| 3.5 Caracterización de materias primas y del tensoactivo fluorado. | 29 |
| 3.6 Preparación de mezclas aceite fluorado y tensoactivos (fase fluorada) | 30 |
| 3.6.1 Fases fluorada: Krytox-FH7500. | 30 |
| 3.6.2 Fase fluorada: Krytox/Jeffamina-FH 7500..... | 30 |
| 3.6.3 Fase fluorada: Tensoactivo PFPE-PEG-PFPE/FH7500..... | 30 |
| 3.7 Ensayos de estabilidad de emulsiones. | 31 |
| 3.7.1 Generación de microgotas con un gradiente de MeOH. | 31 |
| 3.7.2 Transferencia de microgotas..... | 33 |
| 3.7.3 Almacenamiento de microgotas. | 34 |
| 3.7.4 Encapsulamiento de células en microgotas..... | 34 |
| 3.8 Ensayos biológicos empleando la cepa BL21 de <i>E. coli</i> | 35 |
| 3.8.1 Cultivo de <i>E. coli</i> | 35 |
| 3.8.2 Preparación de disolución del antibiótico fosfomicina..... | 36 |
| 3.8.3 Preparación de tinta fluorescente. | 36 |
| 3.8.4 Tinción de células de <i>E. coli</i> | 36 |
| 3.8.5 Análisis de microgotas con el programa ImageJ..... | 37 |
| 3.9 Caracterización del sistema de microfluídica. | 42 |
| 3.9.1 Preparación de estándares de fosfomicina..... | 42 |
| 3.9.2 Preparación de estándares de 4MU..... | 42 |
| 3.9.3 Preparación de la mezcla de caracterización..... | 42 |
| 4 Resultados y análisis | 43 |
| 4.1 Tensoactivo fluorado PFPE-PEG-PFPE. | 44 |
| 4.1.1 Características físicas y propiedades del tensoactivo fluorado PFPE-PEG-PFPE . | 45 |

| | |
|--|----|
| 4.1.2 Caracterización por espectroscopia infrarroja de los reactivos y productos. | 45 |
| 4.2 Estabilidad de emulsión: Krytox / FH7500..... | 58 |
| 4.2.1 Generación de microgotas con un gradiente de MeOH. | 58 |
| 4.2.2 Transferencia de microgotas..... | 62 |
| 4.3 Estabilidad de emulsión: Krytox+Jeffamina / FH7500. | 64 |
| 4.3.1 Generación de microgotas con un gradiente de MeOH. | 65 |
| 4.3.2 Transferencia de microgotas..... | 66 |
| 4.3.3 Almacenamiento de microgotas. | 69 |
| 4.4 Estabilidad de la emulsión: PFPE-PEG-PFPE / FH7500..... | 71 |
| 4.4.1 Generación de microgotas con un gradiente de MeOH utilizando el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE. | 71 |
| 4.4.2 Transferencia de microgotas utilizando el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE. | 72 |
| 4.4.3 Almacenamiento de microgotas. | 74 |
| 4.5 Caracterización de un sistema de dispositivos de microfluídica acoplados a un equipo de HPLC empleando un compuesto fluorescente como marcador..... | 75 |
| 4.5.1 Determinación del tiempo de elución de la 4MU en el HPLC..... | 77 |
| 4.5.2 Determinación del tiempo de traslado de la 4MU desde el HPLC hasta el chip GAF. | 79 |
| 4.5.3 Determinación de la difusión del pico de 4MU durante su trayecto: HPLC a la encapsulación en microgotas en chip GAF. | 80 |
| 4.5.4 Determinación de la longitud óptima de tubería PTFE para contener una población particular de microgotas. | 82 |
| 4.5.5 Determinación del tiempo de residencia de la 4MU en el chip R μ G..... | 84 |
| 4.5.9 Difusión de analitos encapsulados en microgotas..... | 85 |
| 4.6 Encapsulamiento de células en microgotas..... | 87 |

| | |
|---|----|
| 4.6.1 Encapsulamiento de células de <i>E. coli</i> en microgotas empleando un sistema de microfluídica..... | 88 |
| 5 Conclusiones | 92 |
| 6 Perspectivas a futuro | 94 |
| 7 REFERENCIAS | 95 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2- 1 Dispositivo de microfluídica fabricado en PDMS que se emplea para el monitoreo de reacciones simultáneas en microgotas del mismo volumen pero de concentración diferente de reactivos. Fotografía tomada y modificada de [11]...... | 8 |
| Figura 2- 2 Diagrama que muestra las dos técnicas que se emplean en los dispositivos de microfluídica. En (1) se muestra cómo es que se da la mezcla entre reactivos presentes en la misma fase así como el gradiente de concentración que se presenta al emplear la técnica de flujo continuo. En (2) se muestra la técnica de flujo segmentado también conocido como microfluídica basada en microgotas. Aquí se utilizan dos fases inmiscibles en dónde una se denomina fase continua (Fase 2) y es en la que se dispersa la fase discontinua (Fase 1) generando así una emulsión “ordenada” en dónde cada microgota puede tener una amplia gama de aplicaciones. Tomado y modificado de [17]. | 10 |
| Figura 2- 3 Para que un tensoactivo se considere apto para la ejecución de análisis biológicos debe de poder viajar rápidamente del seno de la disolución a la interfase de la microgota (1) y formar una capa que brinde una buena estabilidad. Dependiendo de la naturaleza del ensayo que quiera llevarse a cabo al interior de las microgotas generadas se debe impedir la adsorción y/o escape del analito (2). Si lo que se desea realizar es un ensayo microbiológico entonces el tensoactivo debe ser biocompatible con la célula diana (3). Tomado y modificado de [24]. | 15 |
| Figura 3- 1 Diseños de los chips empleados, la cámara principal del chip R μ G encerrada en un cuadrado negro de líneas punteadas..... | 18 |
| Figura 3- 2 Procedimiento que se sigue durante el proceso de fabricación del molde maestro..... | 19 |
| Figura 3- 3 Procedimiento seguido para realizar la caracterización de los canales en el chip de microfluídica. | 22 |
| Figura 3- 4 Fotografía del sistema de microfluídica desarrollado en este trabajo. En primer plano se observan unas bombas de inyección en donde se colocan un par de jeringas que contienen el aceite fluorado con alguno de los tensoactivos empleados (1) y en otra la fase acuosa (2) que se conectan al chip GAF (3). En el | |

plano intermedio se tiene el chip R μ G (4) y la cámara de alta velocidad phantom (5). En el plano trasero se observa la fuente de la lámpara de fluorescencia (6) que sirve como detector al observar las microgotas reintroducidas en la cámara principal del chip R μ G, la bomba de inyección correspondiente a la purga que reduce el flujo de salida del HPLC (7) y el equipo de cómputo que permite la captura de imágenes y procesamiento de resultados (8)..... 24

Figura 3- 5 Diagrama que explica el funcionamiento del chip GAF. 25

Figura 3- 6 Diagrama que describe como ocurre la reinserción de microgotas acoplando el chip GAF y el chip R μ G. 26

Figura 3- 7 Diagrama que describe como ocurre la reinserción de microgotas empleando el chip E y el chip R μ G..... 27

Figura 3- 8 Diagrama que describe el funcionamiento del espaciado de microgotas en el chip R μ G. 28

Figura 3- 9 Programa de elución A5..... 32

Figura 3- 10 Programa de elución A5', empleando en la caracterización del sistema de microfluídica. 33

Figura 3- 11 Diagrama de la trasferencia de microgotas del chip GAF al chip R μ G por medio de un segmento de tubería PTFE. A) Microgotas siendo transferidas sin presencia de coalescencia. B) Microgotas aglomeradas (izquierda) que dan lugar a gotas de mayor tamaño (coalescen). C) Coalescencia en mayor grado de las microgotas. 34

Figura 3- 12 La mezcla entre el flujo proveniente del HPLC y la suspensión de bacterias ocurre antes de que se generen las microgotas en la intersección que se encuentra a la mitad de la base del pentágono en el chip GAF. 35

Figura 3- 13 La opción de abrir archivo permite seleccionar la foto que se desea procesar. 38

Figura 3- 14 La opción de substrar fondo permite eliminar la luz de fondo de la imagen, reemplazándola por un fondo oscuro..... 38

Figura 3- 15 Se selecciona una longitud de radio de 50 pixeles para procesar todas las imágenes analizadas con este software..... 39

| | |
|--|----|
| Figura 3- 16 La opción de umbral de color permite modificar los colores que componen la imagen. | 39 |
| Figura 3- 17 Para el análisis de todas las fotos se seleccionó un brillo de 30/255, un umbral de color rojo y un fondo oscuro. Así se transforma la imagen para que todos los colores de la imagen se reemplacen por diferentes tonalidades de rojo dependiendo de su brillo. | 40 |
| Figura 3- 18 La opción de convertir a binario permite transformar la imagen a blanco y negro, el fondo negro se convierte a blanco y los colores de la imagen (en este caso rojos) se vuelven negros. | 40 |
| Figura 3- 19 La opción de línea divisora permite definir mejor la imagen que se ha procesado en binario, esto lo hace agregando una línea divisora de un pixel de grosor entre un cumulo de pixeles que el software interpreta como un objeto junto a otro en la imagen. | 41 |
| Figura 3- 20 La opción de analizar partículas permite realizar el conteo de células en cada microgota una vez que se ha procesado hasta binario. | 41 |
| Figura 3- 21 Una vez que el software analiza las imágenes, los resultados obtenidos los despliegan en una tabla. Éstos a su vez se copian en una hoja de cálculo de Excel para su procesamiento. | 42 |
| | |
| Figura 4- 1 Esquema de la reacción de síntesis del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE. | 44 |
| Figura 4- 2 Estructura química del tensoactivo fluorado Krytox 157 FHS. | 45 |
| Figura 4- 3 Espectro FT-IT del tensoactivo Krytox 157 FHS. | 46 |
| Figura 4- 4 Acercamiento a la banda correspondiente al estiramiento del enlace C=O indicativo de la presencia del grupo carbonilo. | 47 |
| Figura 4- 5 Estructura de la poliamina Jeffamina. | 48 |
| Figura 4- 6 Espectro FT-IR de la poliamina Jeffamina. | 49 |
| Figura 4- 7 Acercamiento a las bandas correspondientes al puente de hidrógeno característico en las aminas secundarias. | 49 |
| Figura 4- 8 Estructura planteada para el tensoactivo PFPE-PEG-PEPF. | 50 |

| | |
|--|----|
| Figura 4- 9 Espectro FT-IR del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE..... | 51 |
| Figura 4- 10 Comparación entre los espectros FT-IR de ambas materias primas y el producto obtenido..... | 52 |
| Figura 4- 11 Comparación de las bandas ubicadas en la región 3000-2700 cm^{-1} en los espectros FT-IR de las materias primas y el producto obtenido. | 53 |
| Figura 4- 12 Comparación de las bandas ubicadas en la región de 1800-1700 cm^{-1} en los espectros FT-IR de las materias primas y el producto obtenido..... | 54 |
| Figura 4- 13 Comparación de las bandas ubicadas en la región de 1300- 1100 cm^{-1} en los espectros FT-IR de las materias primas y el producto obtenido..... | 55 |
| Figura 4- 14 Comparación entre las bandas ubicadas en la región de 1000-500 cm^{-1} en los espectros FT-IR de las materias primas y el producto obtenido. | 56 |
| Figura 4- 15 El funcionamiento del chip GAF se ve interrumpido a concentraciones mayores del 60% en el flujo que sale del HPLC (30% de metanol al interior de las microgotas). El problema consiste en que el flujo de la fase fluorada direcciona el flujo tanto de HPLC como de la suspensión de bacterias hacía la purga del chip y no hacía la salida del microchip. Por lo tanto, la generación de microgotas compuestas por la mezcla de la suspensión de bacterias y el flujo reducido del HPLC no se logra. Esto se asume que probablemente ocurra debido a un cambio en la viscosidad y/o tensión superficial del fluido sin embargo, el cambio en dichas propiedades no se determino experimentalmente. | 60 |
| Figura 4- 16 Comparación entre el programa de elución A5 y el programa de purga. Al momento de llegar a una concentración del 60% de metanol en la fase móvil que está saliendo del HPLC se procede a disminuir la succión genera por la purga del chip GAF para compensar los cambios en las propiedades reológicas de las microgotas y así no detener la generación de microgotas durante todo el programa de elución A5..... | 61 |
| Figura 4- 17 Fotografías de la “T” de formación de microgotas del chip GAF cuando se tienen concentraciones próximas al 50% de MeOH en la fase proveniente del HPLC. Aun cuando se modifica el flujo de la fase continua y la succión generada por la purga se incrementa, no es posible reestablecer la formación de microgotas. | |

Se identifica como responsable de esta falla en el funcionamiento del microchip a la composición de la fase proveniente del HPLC. 62

Figura 4- 18 Experimentos de transferencia de microgotas realizados empleando como fase continua una disolución de tensoactivo Krytox al 1.8 % m/m en aceite FH7500. La formación de las gotas se lleva a cabo en el chip GAF (izquierda), mientras nuevas gotas se generan estas son forzadas a desplazarse por un segmento de tubería PTFE de 15 cm. Al observar la cámara del chip $R_{\mu}G$ se observa que las microgotas han coalescido en su gran mayoría (derecha). 63

Figura 4- 19 Fotografías tomadas de la cámara principal del chip $R_{\mu}G$ en dos diferentes experimentos de reintroducción de la emulsión generada empleando como fase continua una disolución de tensoactivo Krytox al 1.8 % m/m. 64

Figura 4- 20 Las interacciones electrostáticas que se presentan en la interfase de las microgotas entre la cabeza polar del tensoactivo Krytox (cargada negativamente) y las cabezas polares de la Jeffamina (cargadas positivamente) aumentan la estabilidad de la emulsión significativamente. Tomado y modificado de referencia 17. 65

Figura 4- 21 Experimentos de transferencia de microgotas empleando como fase continua una disolución de tensoactivo Krytox (3.6 % m/m) en aceite FH7500 y como fase discontinua una solución agua-metanol con Jeffamina (1.8%). La formación de las gotas se lleva a cabo en el chip GAF (izquierda) en un intervalo de composición al interior de las microgotas del 5-50% de metanol. Al ser un sistema en flujo continuo, las gotas son forzadas por las nuevas a desplazarse por un segmento de tubería PTFE de 15 cm. Al observar la cámara principal de los dispositivos $R_{\mu}G$ (derecha) se observó que algunas de las microgotas han coalescido, sin embargo, una gran mayoría permaneció inalteradas (derecha). 67

Figura 4- 22 Diagrama de la transferencia de microgotas del chip GAF al chip $R_{\mu}G$ por medio de un segmento de tubería PTFE empleando la fase continua Krytox/Jeffamina. A) Microgotas siendo transferidas sin presencia de coalescencia. B) Microgotas aglomerándose (izquierda) que darán lugar a gotas de mayor tamaño (coalescen). C) Frente coalescente. 68

Figura 4- 23 Comparación de la reintroducción de microgotas que presentan una concentración de MeOH diferente. Las microgotas que presentan solo un 5% de MeOH en su interior (Izquierda) presentan el mismo problema de frente coalescente que las microgotas que presentan el 50% de MeOH. Por lo que se determinó que el frente coalescente no depende del cambio en la composición al interior de la microgotas. 69

Figura 4- 24 Diagrama de la reintroducción de microgotas que se incubaron fuera del chip (off-chip) empleando una versión modificada del chip GAF denominada chip E que permite la reintroducción de la emulsión al chip R μ G mediante el flujo de fase fluorada en la tubería PTFE que empuja la emulsión sin alterarla..... 70

Figura 4- 25 Esquema de los experimentos de transferencia de microgotas realizados empleando como fase continua una disolución de tensoactivo PFPE-PEG-PFPE (2 % m/m). La formación de las gotas se lleva a cabo en el chip GAF (izquierda) en un intervalo de composición al interior de las microgotas del 5-50% de metanol. Las gotas generadas fueron forzadas a desplazarse por un segmento de tubería PTFE de 15 cm por las gotas que se iban formando. Al observar la cámara del chip R μ G se observa que no hay microgotas que hayan coalescido (derecha). 73

Figura 4- 26 Comparación de la reintroducción de microgotas que viajan a diferentes longitudes de los canales del chip R μ G. En la primera imagen (izquierda) se observa cómo se empaquetan las microgotas saliendo de la cámara principal del chip R μ G y como éstas se compactan a medida que la longitud del canal va disminuyendo (derecha). Esto demuestra un aumento en la estabilidad de la emulsión en comparación con la generada con el tensoactivo Krytox y Krytox/Jeffamina ya que esto no se había observado en dichos experimentos. 74

Figura 4- 27 A) Determinación del tiempo de retención del compuesto fluorescente en una columna de HPLC de acuerdo con el programa de elución A5. B) Tiempo que tarda un compuesto separado en el equipo de HPLC en ser introducido al chip GAF. C) Tiempo que tarda un compuesto que está siendo introducido en el chip GAF en ser completamente encapsulado en microgotas. D) Tiempo que tarda un compuesto encapsulado en microgotas en viajar a través de un segmento de tubería

PTFE de 15, 25, 30 y 50 cm hasta llegar a ser detectado en el chip R μ G (tiempo de recorrido de tubería PTFE). E) Tiempo que transcurre desde la entrada de las microgotas con el compuesto fluorescente al chip R μ G y su detección en el canal de salida (tiempo de residencia de la emulsión en el chip R μ G)..... 77

Figura 4- 28 Cromatograma obtenido para la 4MU disuelta en disolución amortiguadora de fosfatos pH= 7.0 con 10% de metanol. En este se observan cuatro picos correspondientes a diferentes especies protonadas de la 4MU³⁰. Los picos A-C son las especies predominantes en la disolución y presentan fluorescencia. A tr= 10.86 min, B tr=13.37 min, C tr= 16.71 min. El pico D se trata de una impureza cuya identidad se desconoce. 78

Figura 4- 29 Una vez que se determina el tiempo de retención de un compuesto fluorescente (A) se determinó el tiempo que tarda éste compuesto en salir del sistema HPLC viajar por una tubería y ser introducido en el chip GAF (B). Este tiempo se obtiene cuando se observa la presencia de fluorescencia en una de las entradas del chip GAF. 79

Figura 4- 30 La detección de la fluorescencia se realiza en la parte superior del chip GAF en el canal dónde se conecta la tubería de salida del equipo HPLC. Se toma el tiempo con cronometro a partir de que se detecta la presencia de la fluorescencia en la parte superior del chip hasta que se deja de observar la última microgota formada con fluorescencia. Esta se observa en la base del pentágono del chip GAF en donde se interseca el flujo de aceite fluorado y el flujo proveniente del HPLC, es en este momento cuando se detiene el cronometro..... 80

Figura 4- 31 Un compuesto que es separado en un equipo de HPLC presenta difusión en su camino hacia al chip GAF, esto se presume a partir del aumento en el tiempo total de detección de la señal de fluorescencia en comparación con el mismo tiempo observado en la señal UV. 82

Figura 4- 32 Se experimentó con longitudes de tubería PTFE para encontrar aquella que pudiera almacenar a las microgotas donde se observa fluorescencia para ser analizadas posterior a su incubación. 84

Figura 4- 33 La obtención del tiempo de residencia de las microgotas fluorescentes en el chip R μ G se realiza introduciendo la emulsión que se genera en el chip GAF

y se almacenó en el tubo de PTFE de 35 cm. Se observa que la emulsión fluye en tres direcciones diferentes ilustradas por las flechas moradas en la imagen. Sin embargo, en las secciones A y B suelen depositarse las microgotas facilitando su análisis. Manteniendo el flujo generado por el chip GAF (270-570 $\mu\text{L/h}$; flujos correspondientes a la fase acuosa) no queda ninguna microgota fluorescente después de 9:17 minutos en promedio. 85

Figura 4- 34 Fotografía tomada a un segmento de tubería PTFE en dónde se había almacenado las microgotas que contenían el compuesto fluorescente. Al iluminar con la luz fluorescente la tubería se puede apreciar a simple vista que estás fluorescen..... 86

Figura 4- 35 Esquema en dónde se ejemplifica como es que se observan las microgotas que presentan fluorescencia desde el exterior de la tubería PTFE cuando se iluminan con una lámpara fluorescente. Esto da pista de que no existe una contaminación entre microgotas ya que aún en experimentos donde se dejó encubar la emulsión no se observó un aumento en la zona delimitada por la presencia de la fluorescencia al inicio..... 87

Figura 4- 36 En el chip GAF antes de que se generen las microgotas, se puede observar una interfase entre el flujo proveniente del HPLC y la introducción de las células teñidas (izquierda). Una vez formadas las microgotas, viajan por la tubería de PTFE y son introducidas en la cámara principal del chip $R_{\mu}G$ en dónde pueden ser estudiadas (derecha)..... 89

Figura 4- 37 Fotografías tomadas a las microgotas con células de *E. coli*. En la primera imagen (arriba) se observan las microgotas con células teñidas en su interior bajo el filtro DAPI-50L-A. En la segunda imagen (abajo) se observan las mismas microgotas bajo el filtro LF 561/LP-C. 90

Figura 4- 38 Número de células no viables teñidas con bromuro de etidio dentro de microgotas después de diferentes tiempos de incubación. 91

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 4-1 Frecuencia de las bandas IR, intensidad y grupo funcional asociado determinados para el tensoactivo Krytox 157 FSH..... | 48 |
| Tabla 4-2 Frecuencia de las bandas IR, intensidad y grupo funcional asociado determinados para el compuesto Jeffamina | 50 |
| Tabla 4-3 Frecuencia de las bandas IR, intensidad y grupo funcional asociado determinados para el tensoactivo PEG-PFPE-PEG | 57 |
| Tabla 4-4 Condiciones de los experimentos de formación de microgotas con el tensoactivo Krytox | 59 |
| Tabla 4-5 Condiciones de los experimentos de formación de microgotas con el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE..... | 71 |
| Tabla 4-6 Resultados de los experimentos realizados para determinar el tiempo de introducción de un analito al chip GAF..... | 79 |
| Tabla 4-7 Resultados de los experimentos de determinación del tiempo de residencia de un compuesto fluorescente | 81 |
| Tabla 4-8 Resultados de los experimentos de tiempo de recorrido de la emulsión | 83 |

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| EAE | Detección Sistemática de Alta Eficiencia |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| BrEt | 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio (Bromuro de etidio) |
| <i>i</i> -PrOH | Isopropanol |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| D | Diámetro |
| PFPE | poli(perfluoropropilen glicol) |
| PEG | poli(propil-etilenglicol) |
| MeOH | Metanol |
| FMA | Fase móvil A |
| FMB | Fase móvil B |
| 4MU | 4-Metilumbeliferona |
| OD | Densidad óptica |

1 Introducción

1.1 Planteamiento del problema

Alimentado por las malas prácticas médicas de prescripción de antibióticos y la automedicación, se ha registrado un aumento en la cantidad de microorganismos con algún tipo de resistencia a los antibióticos comerciales y los de última generación. Este es un creciente problema para el que los sistemas de salud a nivel mundial no están preparados para afrontar hasta el momento.

Actualmente los sistemas de Detección o Escrutinio de Alta Eficiencia (EAE), utilizan técnicas de muestreo robotizado en microplacas de 96, 384 y 1536 pozos que pueden tardar semanas en realizar el análisis de grandes bibliotecas de compuestos (hasta 10^6 compuestos) con presunta actividad bactericida. Estos sistemas de análisis son muy costosos por lo que la búsqueda de tratamientos para enfermedades que no son un objetivo primario en el mercado es limitada. Es por esto que ha surgido la necesidad de desarrollar nuevos sistemas de detección sistemática de alta eficiencia que reduzcan el costo de realizar diferentes ensayos y que permitan realizar pruebas determinantes que acorten el proceso de investigación y desarrollo de fármacos novedosos, consumiendo pocos reactivos y generando pocos desechos.^{1,2}

La microfluídica basada en microgotas se ha convertido en una alternativa a los sistemas convencionales de EAE. Esta técnica se enfoca en el estudio de emulsiones confinadas en microcanales y permite la manipulación de gotas cuyo volumen va desde nanolitros (nL o 10^{-9} L) hasta femtolitros (fL o 10^{-15} L). Cada microgota sirve como un microreactor en donde se pueden realizar diferentes tipos de experimentos. Esto convierte a la microfluídica basada en microgotas en una herramienta útil en el desarrollo de análisis químicos y biológicos de manera automatizada, en tiempos reducidos de experimentación o ensayo y con un consumo de reactivos drásticamente menores.^{3,4}

Un avance importante para utilizar a las microgotas en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica, es el acoplamiento de equipos de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento CLAR ó HPLC (High Performance

Liquid Chromatography) por sus siglas en inglés, a microchips de microfluídica.⁵ La cromatografía permite la separación de mezclas complejas como los extractos naturales y si la salida del equipo se acopla a un dispositivo de microfluídica basado en microgotas es posible encapsular y mantener la separación de cada uno de los componentes de una mezcla separados en el equipo HPLC. Además, es posible generar un gradiente de concentración de cada uno de los compuestos separados en una población de microgotas con las cuales se pueden hacer ensayos bioquímicos.⁶

El principal reto que presentan los sistemas de microfluídica acoplados a HPLC para el desarrollo de ensayos biológicos es la facilidad que tienen las microgotas a coalescer después de cierto tiempo de incubación, impidiendo así mantener confinados de forma independiente el contenido de las microgotas (ya sean compuestos, células individuales o una población de microorganismos). Por esta razón, el uso de aceites y tensoactivos nuevos que lleven a la generación de emulsiones más estables y que permitan su incubación es de gran relevancia. Sin embargo, se han tenido dificultades para encontrar estos compuestos que además presenten un cierto grado de biocompatibilidad ya que algunos de los compuestos empleados para aumentar la estabilidad de las microgotas modifican las condiciones al interior de estas como el pH o bien han resultado ser citotóxicos.⁷

En este trabajo se logró sintetizar un tensoactivo que permite generar una emulsión que es estable por varios días y que permitió la incubación de células de *Escherichia coli* en su interior. Además, se diseñaron y fabricaron dos dispositivos de microfluídica. El primero permitió la generación de una microemulsión al acoplarse a un equipo de HPLC. La microemulsión se logró incubar fuera de los dispositivos y después ser reintroducida al segundo dispositivo que permitió analizar las microgotas empleando un microscopio de fluorescencia. El sistema de microfluídica desarrollado en este trabajo sirve como base para el desarrollo de un sistema EAE que permita realizar la identificación de compuestos con actividad bactericida.

1.2 Objetivos

General

- Sintetizar un tensoactivo fluorado que permita la generación de microgotas con las siguientes tres características:
 - 1) Una alta estabilidad contra la coalescencia.
 - 2) Alta capacidad de retención de moléculas orgánicas en su interior.
 - 3) Tolerancia a la formación de microgotas con mezclas de agua:metanol.

Particulares

- Diseñar un dispositivo de microfluídica acoplado a la salida de un equipo de HPLC que permita encapsular en microgotas los compuestos separados por la columna del equipo.
- Diseñar un dispositivo de microfluídica que sirva para realizar el análisis de microgotas empleando un microscopio de fluorescencia.
- Encapsular *Escherichia coli* junto con un bactericida en microgotas con el tensoactivo sintetizado.

1.3 Hipótesis

Se puede mejorar la estabilidad de microgotas formadas en dispositivos de microfluídica si se emplea un tensoactivo fluorado polimérico tipo poli(propil-etilenglicol)- poli(perfluoropropilen glicol)- poli(propil-etilenglicol) (PEG-PFPE-PEG) en comparación a aquellas microgotas generadas empleando tensoactivos fluorados poliméricos tipo PFPE comerciales.

2 Antecedentes

2.1 Microfluídica

La microfluídica es una tecnología que explota las propiedades particulares que presentan los fluidos a microescala. Su objetivo principal es el desarrollo de herramientas analíticas eficientes y confiables que presenten un funcionamiento poco complejo y amigable con el usuario en donde se puedan llevar a cabo diferentes tipos de ensayos químicos o biológicos. Estas plataformas de microfluídica denominadas comúnmente como “laboratorios en un chip” o dispositivos de microfluídica, son un análogo químico a los microchips empleados en todos los dispositivos electrónicos modernos, sin embargo, en lugar de hacer fluir una corriente de electrones por un canal semiconductor, estos cuentan con canales de unas cuantas micras de diámetro en donde se hacen pasar diferentes tipos de fluidos.^{3,4,8}

La miniaturización de los ensayos químicos y biológicos conlleva una serie de beneficios. Entre los más importantes está un menor consumo de reactivos y por lo tanto, una generación reducida de residuos desechos. Lo anterior se traduce directamente en una disminución de los costos respecto a los métodos tradicionales de análisis como lo son la separación de mezclas en columnas cromatográficas preparativas, ensayos enzimáticos a volúmenes tradicionales (del orden de litros o mililitros) y ensayos celulares en placas de 96 pozos. Además, se pueden automatizar y por lo tanto acortar tiempos de análisis y aumentar el número de pruebas en un periodo de tiempo definido. El uso de programas de cómputo que acompañan el análisis de los resultados obtenidos convierte a la microfluídica en un motor de innovación con mucho potencial y futuro en la química, biología y bioquímica por la capacidad de facilitar el procesamiento de datos debido a la automatización. Hoy en día se pueden encontrar en diferentes revistas arbitradas de alto prestigio como Nature, Lab Chip y Analytical Chemistry (por mencionar algunas) artículos en donde el empleo de dispositivos de microfluídica ha llevado a la síntesis de nuevos materiales, ensayos enzimáticos, amplificación de genes por medio de la técnica de PCR, expresión genética y ensayos celulares de diferentes tipos de microorganismos como bacterias y levaduras por mencionar algunos⁹⁻¹¹.

Finalmente lo que vuelve aún más atractivo el uso de esta tecnología es que permite la fabricación de dispositivos altamente especializados a un bajo costo ya que la mayoría de los dispositivos se pueden crear a partir de la técnica de fotolitografía suave que permite transferir un patrón de canales hecho a la medida por medio de un programa de diseño digital en un molde maestro hecho a partir de una resina fotosensible, que es duradero y puede ser reutilizado en varias ocasiones para generar réplicas funcionales del dispositivo en un elastómero (polímero elástico que dada sus propiedades regresa a su forma original cuando se le deja de aplicar una fuerza externa) como el polidimetilsiloxano (PDMS)¹². El PDMS es un material de gran aplicación en la microfluídica ya que es un material barato, accesible, biocompatible, inerte, transparente, aislante, hidrófobo y permeable a gases. La flexibilidad que presenta este método de fabricación permite un desarrollo rápido y sencillo de prototipos que puede llevar a varias iteraciones de un dispositivo hasta encontrar las mejoras importantes en funcionalidad y diseño^{13,14}.

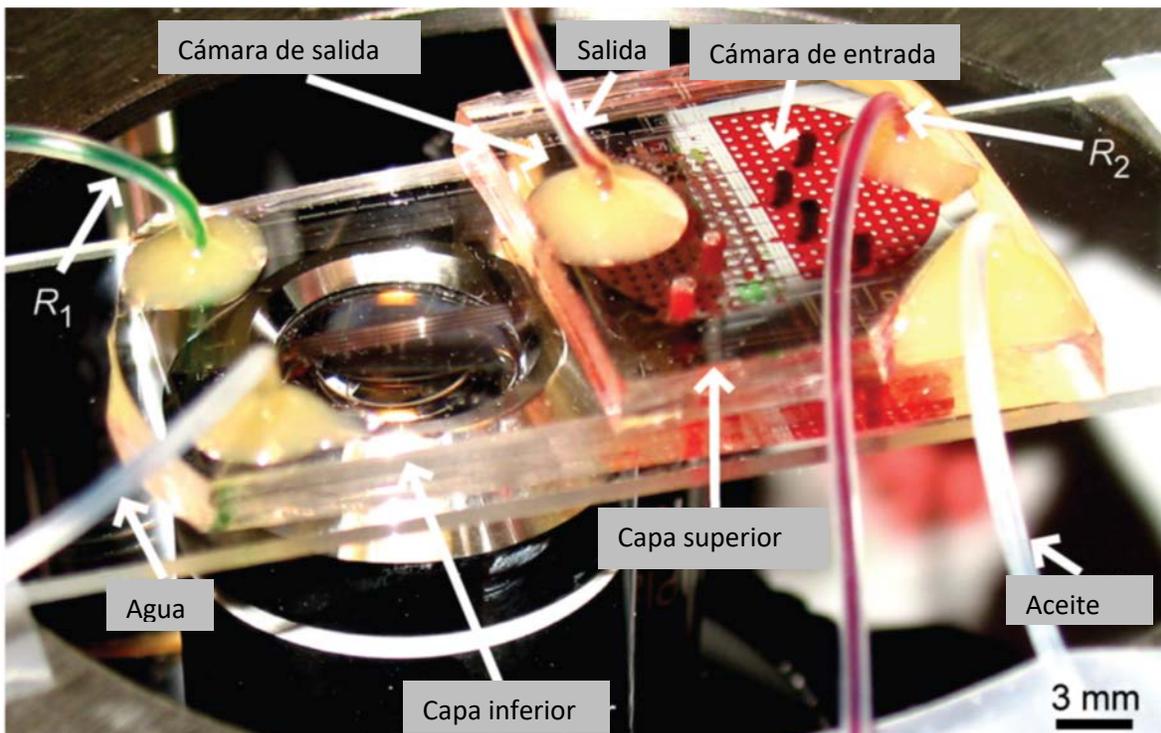


Figura 2- 1 Dispositivo de microfluídica fabricado en PDMS que se emplea para el monitoreo de reacciones simultáneas en microgotas del mismo volumen pero de concentración diferente de reactivos. Fotografía tomada y modificada de [11].

2.1.1 Dinámica de flujos en los dispositivos de microfluídica

Existen dos métodos de manipulación de fluidos en los dispositivos de microfluídica, el primero es el de flujo continuo en donde se hace circular a través de los microcanales fases miscibles; por ejemplo, un estudio particular como el número de interacciones bioquímicas entre dos disoluciones de interés, como lo puede ser una disolución acuosa con diferentes sustratos que se pone en contacto con otra disolución en donde se tiene una enzima a la que se le quiere evaluar su actividad frente a una biblioteca de compuestos, para la deposición de proteínas en una superficie en la manufactura de biosensores o para el desarrollo de plataformas de perfusión para cultivos celulares^{15,16}.

Este método presenta ciertas complicaciones ya que, debido a la presencia del flujo laminar al interior de los microcanales, la mezcla entre las disoluciones depende de la dispersión de los analitos, dificultando el seguimiento de una reacción química o enzimática. Además, una vez mezclados los reactivos y productos, seguirá habiendo una difusión a lo largo del canal si no se compartimentaliza la mezcla obtenida, volviendo poco atractiva esta técnica para realizar estudios en donde se quieren analizar de forma consecutiva varios reactivos (figura 2-2).¹⁷

Por otro lado, existe también la microfluídica basada en microgotas en donde se ponen en contacto dos fases inmiscibles para generar una emulsión monodispersa de gotas acuosa separadas por una fase continua que comúnmente es un aceite. Las ventajas que presenta la compartimentalización en microgotas es la limitación en la difusión de un analito a través de los microcanales, una mezcla controlada y más eficiente de reactivos al interior de las gotas así como la disminución en el bloqueo y subsecuente deformación en los microcanales.^{17,18}

El objetivo de la microfluídica basada en microgotas es generar microreactores en donde se pueda llevar a cabo un mismo ensayo, pero en donde la composición entre un reactor y otro se pueda modular y generar así una serie de experimentos donde se modifiquen una o más variables.⁵

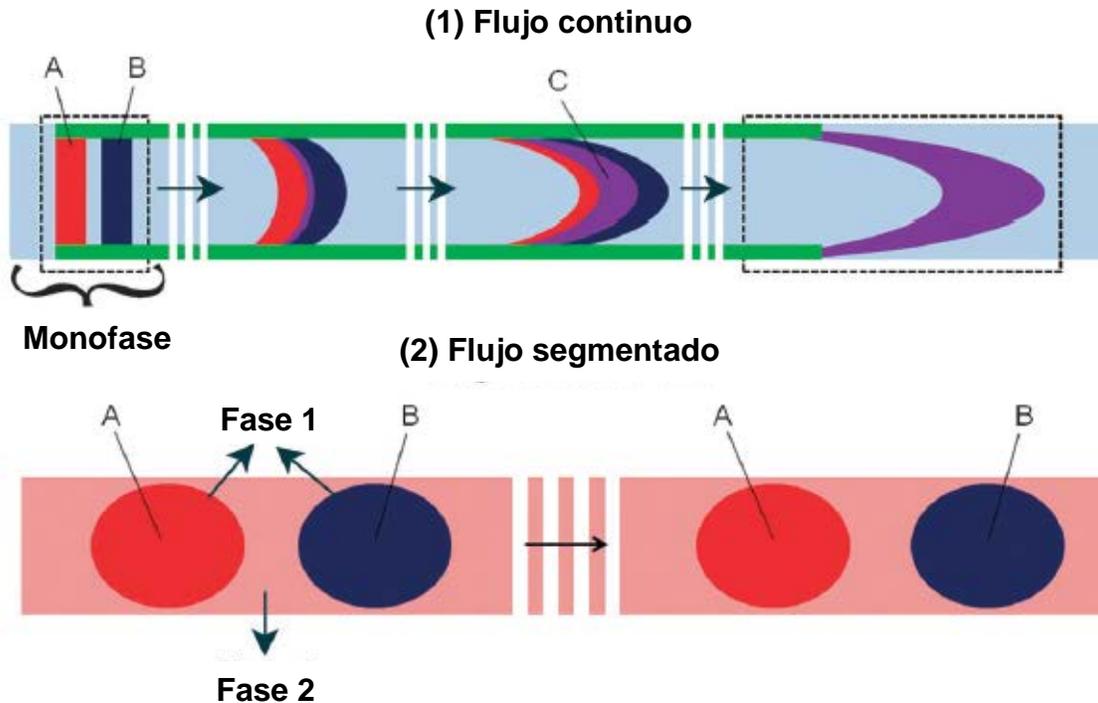


Figura 2- 2 Diagrama que muestra las dos técnicas que se emplean en los dispositivos de microfluídica. En (1) se muestra cómo es que se da la mezcla entre reactivos presentes en la misma fase así como el gradiente de concentración que se presenta al emplear la técnica de flujo continuo. En (2) se muestra la técnica de flujo segmentado también conocido como microfluídica basada en microgotas. Aquí se utilizan dos fases inmiscibles en donde una se denomina fase continua (Fase 2) y es en la que se dispersa la fase discontinua (Fase 1) generando así una emulsión “ordenada” en donde cada microgota puede tener una amplia gama de aplicaciones. Tomado y modificado de [17].

2.1.2 Técnicas de separación acopladas a dispositivos de microfluídica basados en microgotas para realizar ensayos bioquímicos

En los últimos diez años se han reportado algunos artículos sobre el acoplamiento exitoso de equipos de cromatografía líquida a sistemas de microfluídica basados en microgotas.^{6,19,20} El acoplamiento de esta técnica de separación con las plataformas de microfluídica ha llevado a la generación de herramientas útiles.

Por ejemplo, existen sistemas acoplados que permiten la generación de microgotas con un gradiente de concentración de algún analito de interés. La separación generada por el HPLC permite crear una población de microgotas en la cual se sigue el perfil de un pico cromatográfico.^{6,20}

Este acoplamiento también ha facilitado la generación de bibliotecas de compuestos al permitir la encapsulación en microgotas de los compuestos separados por el equipo de HPLC para su posterior manipulación y uso.¹⁹ La simplificación al

momento de generar bibliotecas de compuesto es importante para el desarrollo de nuevas plataformas para el descubrimiento de moléculas con actividad biológica como lo son los sistemas de escrutinio de alta eficiencia (EAE). Estos sistemas novedosos reducen el tiempo de análisis convencional y facilitan el descarte de compuestos que no son de interés.^{1,2,10,21}

También se ha logrado el acoplamiento de los equipos de HPLC a una plataforma de microfluídica para el análisis de la actividad enzimática al introducir una mezcla de sustratos al equipo de HPLC y/o dispositivos de microfluídica para determinar cuáles de ellos presentan una actividad inhibidora.³³ Este acoplamiento se puede extender a otras técnicas de separación como un paso previo a la manipulación, combinación o transformación de los analitos presentes en diferentes mezclas.^{5,17}

2.1.4 Microgotas y su estabilidad

La estabilidad que deben presentar las microgotas depende del tipo de ensayo que se desee ejecutar. Por ejemplo, para identificar un inhibidor enzimático por medio de fluorescencia, la estabilidad de las microgotas necesaria sólo es de unos cuantos segundos pues la reacción que se monitorea ocurre en el orden de los milisegundos una vez que se tiene homogéneo el interior de la gota. Así que lo que se buscaría al generar microgotas con este propósito es que la emulsión fuera lo suficientemente estable para soportar su recorrido al interior del chip de microfluídica sin romperse ni coalescer y que no exista ninguna especie química en la formulación que genere una desactivación de la enzima.²¹⁻²⁴

Sin embargo, existen otro tipo de aplicaciones en donde se necesitan microgotas que duren mayor tiempo (más de 24 horas). Un ejemplo de éstas aplicaciones es la identificación de un compuesto presente en un extracto natural que presente alguna actividad frente a un microorganismo diana de interés médico. Esto es debido a que las células y el compuesto de interés deben permanecer juntos por varias horas para detectar la muerte celular. Además, es importante que las microgotas resistan una mayor manipulación, muchas veces fuera del microchip, y que no exista intercambio de los compuestos orgánicos entre las gotas. También, al tratarse de ensayos microbiológicos, es importante la biocompatibilidad del tensoactivo con los

microorganismos y por último que la fase continua facilite el intercambio de gases con el medio exterior.

Experimentalmente se ha comprobado que generar microgotas de agua en un aceite fluorado (por ejemplo: Fluorinet FC-40 ó HFE-7500) puede cumplir con muchos de los requerimientos antes mencionados, siempre y cuando se tenga un buen tensoactivo.⁷

2.2 Tensoactivos en microfluídica basada en gotas

Los surfactantes o tensoactivos son el nombre que reciben un grupo de moléculas anfifílicas, es decir que presentan diferentes grupos funcionales dotándolas de diferentes afinidades por diferentes fases inmiscibles, por ejemplo, agua/aire, agua/aceite o aceite/aire. Esta propiedad dirige a la molécula hacia la interfase en donde la tensión interfacial entre ambas fases se ve disminuida. La disminución en la tensión interfacial se encuentra directamente relacionada por el número de moléculas adsorbidas en la interfase y se encuentra definida por la isoterma de adsorción de Gibbs para disoluciones diluidas.²³

$$\Gamma = -\frac{c}{RT} \frac{d\gamma}{dc}$$

Donde:

Γ es la concentración en la interfase,

c es la concentración en el seno de la disolución,

γ es la tensión interfacial,

T es la temperatura y

R es la constante de los gases ideales.

Los tensoactivos o surfactantes son un componente fundamental en la microfluídica basada en microgotas. Estos se encuentran involucrados en la estabilización de la interfase de las microgotas, en la biocompatibilidad que pueda presentar el sistema y en el proceso de intercambio de moléculas entre gotas.

En la familia de los surfactantes existen diferentes tipos. Están los surfactantes aniónicos, en donde la cabeza polar se encuentra cargada negativamente y generalmente se encuentra formada por grupos fosfato, sulfonato o carboxilato. Los surfactantes catiónicos se encuentran cargados positivamente y pueden estar compuestos por sales de amonio cuaternarias. Los surfactantes no iónicos no presentan ningún grupo funcional cargado y pueden estar formados por cadenas de poli(oxietileno). Finalmente existen también los surfactantes anfóteros que pueden presentar un grupo funcional betaína o el óxido de una amina.

La presencia de átomos de flúor en la molécula de un tensoactivo modifica drásticamente el comportamiento que presentará respecto al de los tensoactivos clásicos. Esto ya que le proporciona una estabilidad química y térmica muy importante. Es también gracias al flúor que este tipo de surfactantes presenten una tensión superficial baja en disolución acuosa incluso a bajas concentraciones.²⁴

En la generación de emulsiones de microfluídica los surfactantes tienen un rol básico que es garantizar que las gotas no coalescan, que es el requerimiento mínimo para poder emplear éstas como microrreactores. La coalescencia es un fenómeno de envejecimiento de las emulsiones en donde una o más gotas se fusionan. La dispersión de un fluido en otro es un sistema que se encuentra fuera del equilibrio termodinámico ya que el costo energético total para la formación del área de las interfases es poco favorable. Por otro lado, la energía mínima del sistema ocurre cuando ambos fluidos se encuentran totalmente separados en dos fases. Es así que la fuerza motriz que actúa hacia la homogenización del sistema se ve contrarrestada por la acción del tensoactivo. Al adicionar un tensoactivo se provee al sistema de una barrera energética que estabiliza la emulsión en un estado metaestable.

Además de la coalescencia, otro mecanismo de envejecimiento de las emulsiones es la maduración de Ostwald. En este proceso gotas pequeñas que presentan una presión de Laplace (que es la diferencia de presión entre el interior de una gota y el exterior de esta) mucho mayor que las de mayor tamaño tienden a disolverse en éstas llevando a un engrosamiento de la emulsión con el paso del tiempo. Esto

ocurre cuando la fase dispersa es un poco soluble en la fase adyacente y puede combatirse al agregar en las microgotas una especie que no sea soluble en la fase continua.²³

Otra propiedad que se desea tener en un tensoactivo empleado en ensayos biológicos en microgotas es la biocompatibilidad, es la capacidad de llevar a cabo las reacciones bioquímicas con la misma eficiencia al interior de las microgotas que como si se encontraran en el seno de una disolución. Un ejemplo de sistemas no biocompatibles son aquellos que promueven la adsorción o desnaturalización de proteínas en la interfase aceite/agua o la presencia de interacciones entre el tensoactivo y la membrana de alguna célula.

En concreto, los tensoactivos que se deseen emplear para ensayos bioquímicos dentro de microgotas deben cumplir tres requerimientos mínimos:

- I) Dar estabilidad a la emulsión
- II) Minimizar el intercambio de moléculas entre gotas y
- III) Ser biocompatibles (Figura 2.3).²³

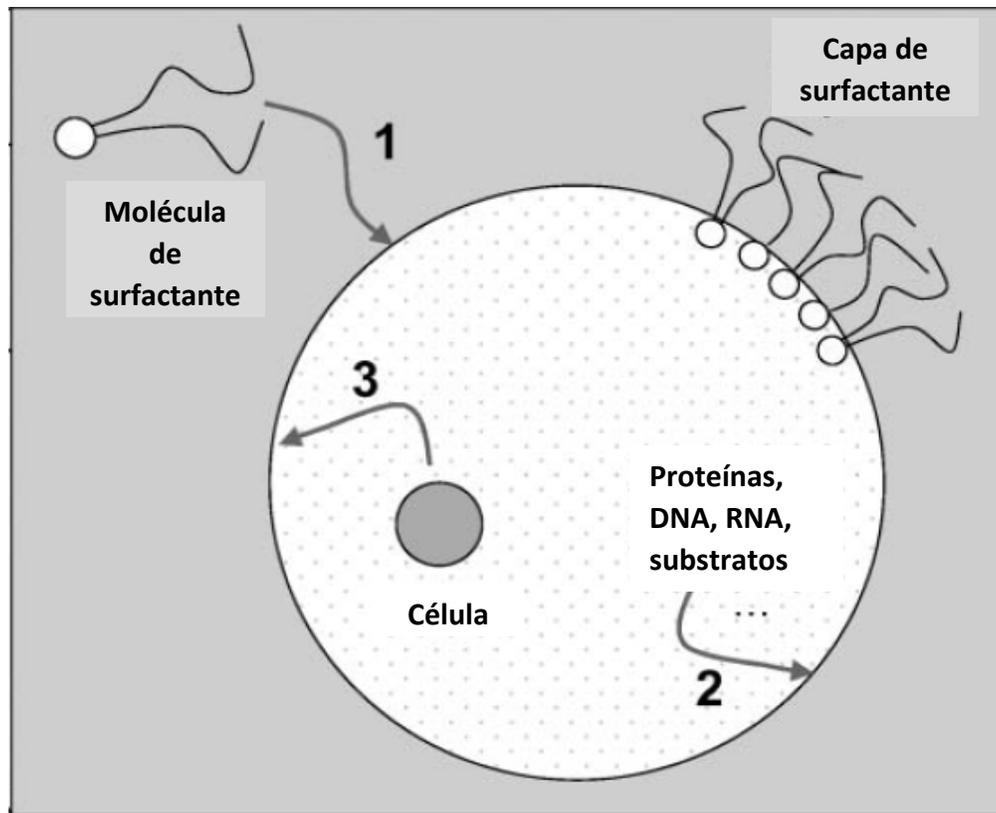


Figura 2- 3 Para que un tensoactivo se considere apto para la ejecución de análisis biológicos debe de poder viajar rápidamente del seno de la disolución a la interface de la microgota (1) y formar una capa que brinde una buena estabilidad. Dependiendo de la naturaleza del ensayo que quiera llevarse a cabo al interior de las microgotas generadas se debe impedir la adsorción y/o escape del analito (2). Si lo que se desea realizar es un ensayo microbiológico entonces el tensoactivo debe ser biocompatible con la célula diana (3). Tomado y modificado de [24].

3 Materiales y metodología

3.1 Fabricación de microchips.

La fabricación de los dispositivos de microfluídica, también denominados chips de microfluídica, inicia con el diseño del arreglo de los microcanales. La herramienta de diseño utilizada fue el software Adobe IllustratorCS6® (versión 16.0.3.691) que permite dibujar patrones de líneas cuyo grosor puede ser ajustado desde los decímetros hasta los micrómetros.

En la figura 3-1 se muestra el diseño de las dos plataformas de microfluídica que se utilizaron para realizar este trabajo. En el primero se observa el arreglo de microcanales correspondiente al chip generador de microgotas de alta frecuencia (chip GAF) cuyo diseño se tomó y modificó a partir de diseños anteriores desarrollados dentro del grupo de trabajo donde se realizó esta tesis. El segundo diseño se basó en un dispositivo de separación de microgotas desarrollado por el grupo de trabajo de Mazutis, et.al.²⁵. La plataforma se adaptó para poder introducir microgotas y analizar éstas por medio de espectroscopía de fluorescencia o mediante el análisis de fotos tomadas a las microgotas que se depositen en la cámara central del microchip. A este segundo dispositivo se le denomina chip de Reintroducción de Microgotas (chip R μ G).

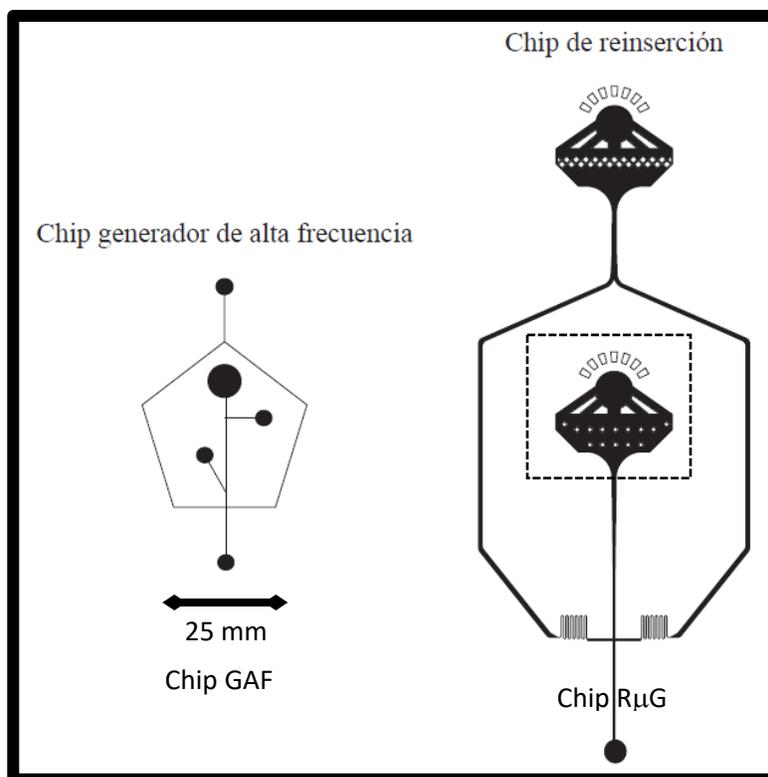


Figura 3- 1 Diseños de los chips empleados, la cámara principal del chip R μ G encerrada en un cuadrado negro de líneas punteadas.

Una vez que se terminó de diseñar los patrones de los canales de los dispositivos, se mandaron a imprimir en negativo sobre acetato (Gráficos Digitales Denver), los cuales sirvieron como máscaras para fabricar los moldes como se detalla a continuación.

3.1.1 Fabricación de moldes mediante las técnicas de fotolitografía y litografía suave.

La fabricación de los microchips se puede dividir en dos etapas, la primera se conoce como fotolitografía y consiste en la fabricación de un molde maestro a partir de una resina fotosensible llamada SU-8. En la segunda etapa, conocida como litografía suave, se obtienen réplicas del dispositivo que son funcionales elaborados a partir del polímero polidimetilsiloxano (PDMS).

En la figura 3-2 se describe el procedimiento para fabricar el molde maestro mediante la técnica de fotolitografía suave utilizando la resina fotosensible SU-8 3035 (Microchem).

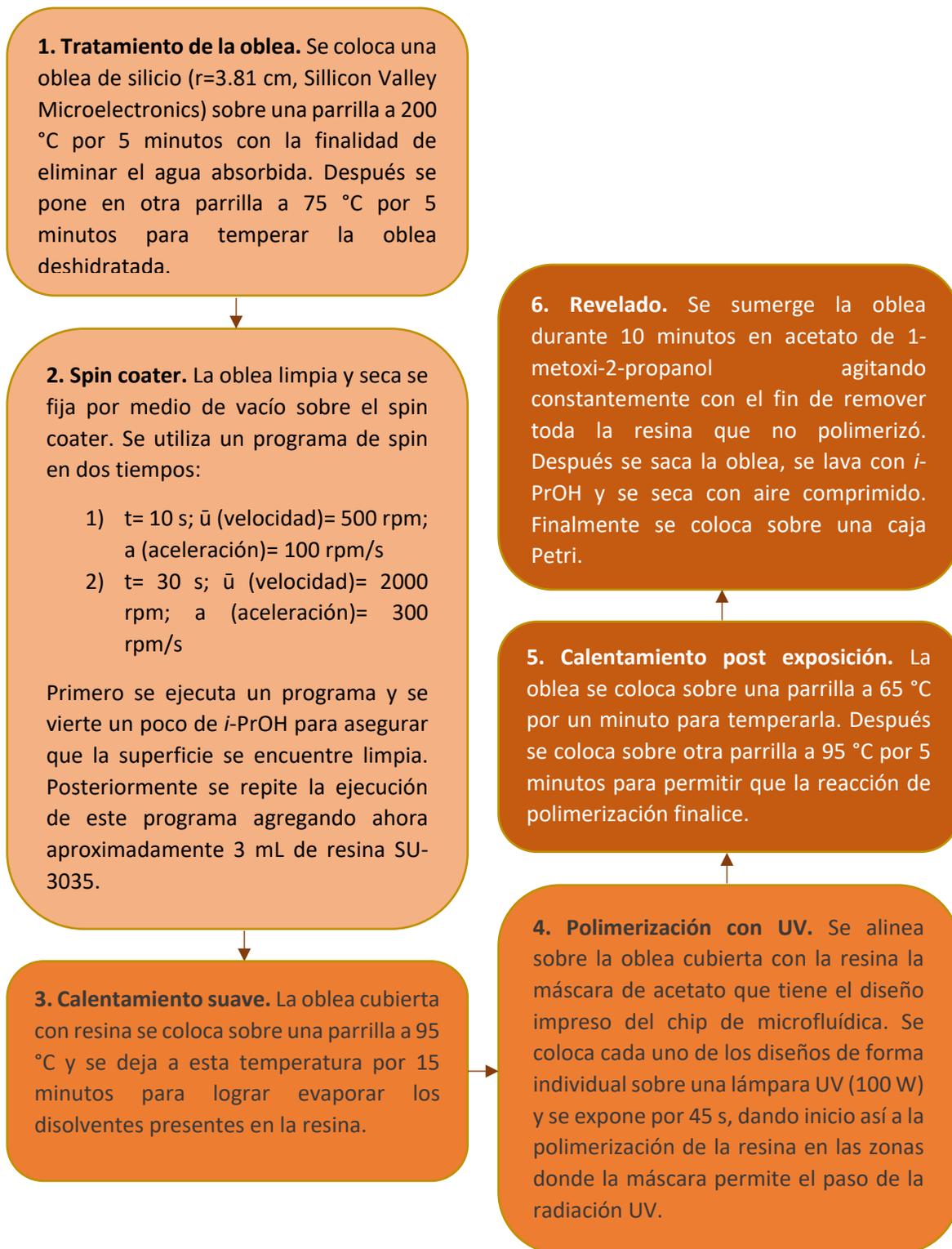


Figura 3- 2 Procedimiento que se sigue durante el proceso de fabricación del molde maestro.

3.1.2 Fabricación de las réplicas de PDMS de microchips por medio de la técnica de litografía suave.

El PDMS es uno de los polímeros que más se utilizan en la fabricación de dispositivos de microfluídica, el polímero cuenta con una gama de características que lo hacen altamente biocompatible, fácil de manipular y apto tanto para su uso en microfluídica así como en ensayos espectrofotométricos debido a que es transparente en la zona del espectro electromagnético ultravioleta y visible. A continuación se describe el procedimiento de fabricación de los dispositivos de microfluídica:

- 1) Se pesan 25 g de prepolimero de PDMS y se agrega después una proporción del 8.5 % de agente curante (Sylgard 184, Silicone Elastomer base, Dow Corning). La mezcla se agita manualmente durante algunos minutos hasta asegurar que se ha homogenizado la mezcla, esto se sabe cuando se deja de observar la presencia del agente curante cuya composición es menos viscosa a la del prepolimero y se asemeja en aspecto a un aceite.
- 2) Después se vierte la mezcla sobre un molde maestro de SU-8 generado sobre una oblea de silicio dentro de una caja Petri. Se somete a una presión de vacío dentro de un desecador durante una hora para remover la presencia de burbujas de aire en la mezcla.
- 3) Una vez que se han eliminado todas las burbujas se coloca la caja Petri en un horno a 75 °C por al menos 12 horas para acelerar la polimerización de la mezcla.
- 4) Concluido el tiempo de polimerizado se observa que el PDMS presenta una consistencia sólida y elástica. Se corta alrededor del diseño de SU-8 empleando un bisturí. Se desprende del molde suavemente apoyándose del bisturí.
- 5) Finalmente se realizan las perforaciones sobre el chip de PDMS de acuerdo al diseño del dispositivo para formar las entradas para las tuberías PTFE. Se emplean dos tipos de punzones uno de $D=0.75$ mm para la entrada de las fases acuosa y oleosa, otro de $D=1.5$ mm para la entrada de la tubería de salida del HPLC.

- 6) El chip de PDMS se fija sobre un portaobjetos de vidrio por medio de un tratamiento con plasma (Corona Treater, BD-20AC, Electro-technic Products). Se expone al plasma por 60 s a la superficie de vidrio y posteriormente por 15 s a la superficie del chip de PDMS. Se juntan ambas superficies expuestas y con ayuda de una espátula se remueven todas las burbujas de aire que quedan atrapadas entre ambas superficies presionando suavemente. El chip se deja reposar por al menos 24 horas en un horno a 75 °C.

3.1.3 Caracterización física de microchips de PDMS.

La caracterización de los microcanales del chip de microfluídica nos permite conocer exactamente cuáles son las dimensiones de los canales formados en cada réplica de PDMS.

Para hacer esto se realizan una serie de cortes en una réplica que no se fija a un portaobjetos de vidrio. Cada sección cortada se ve a través de un microscopio empleando un objetivo de x10 para determinar la longitud de los microcanales y de x20 para determinar la altura (Leica, NA = 0.25). Se obtuvieron al menos tres fotos de cada sección con una cámara Phantom. Cada fotografía fue analizada utilizando el programa ImageJ (National Institute of Health, versión 1.50b) el cual establece una relación entre el número de píxeles y la longitud de los microcanales. Para este fin fue necesario fotografiar una retícula microscopía de dimensiones conocidas (figura 3-3).

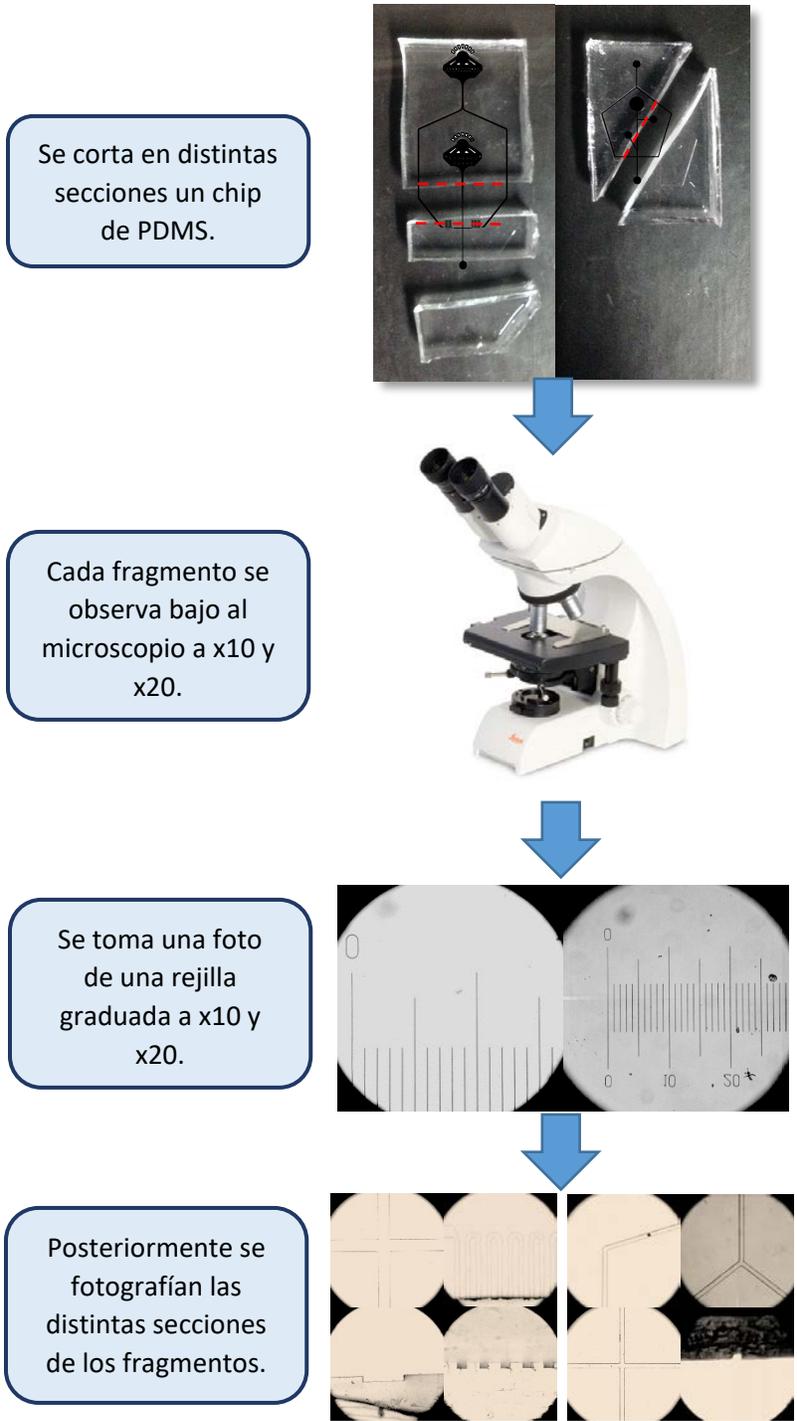


Figura 3- 3 Procedimiento seguido para realizar la caracterización de los canales en el chip de microfluídica.

3.2 Funcionamiento de los dispositivos de microfluídica.

Los dispositivos se diseñaron teniendo en cuenta las dos necesidades principales de este trabajo. El primer dispositivo se diseñó para que fuera el encargado de generar las microgotas, es por esto que se le denomina chip Generador de microgotas de Alta Frecuencia (chip GAF). El segundo tiene como objetivo ser la plataforma en dónde se puedan analizar las microgotas, esto se logra reintroduciendo la emulsión en éste y es por esto que se le denomina chip de Reintroducción de Microgotas (chip R μ G). Gracias a la versatilidad que ofrecen las réplicas de los dispositivos elaboradas en PDMS también se realizó una versión modificada del primer dispositivo a la que se le denominó chip de empuje (chip E) cuya función es únicamente hacer fluir fase continua (aceite fluorado) por sus canales para permitir la reintroducción de microgotas almacenadas fuera de los chips hacia el chip R μ G y así permitir su análisis. El funcionamiento detallado de cada uno de los dispositivos de microfluídica se explica a continuación (figura 3-4).

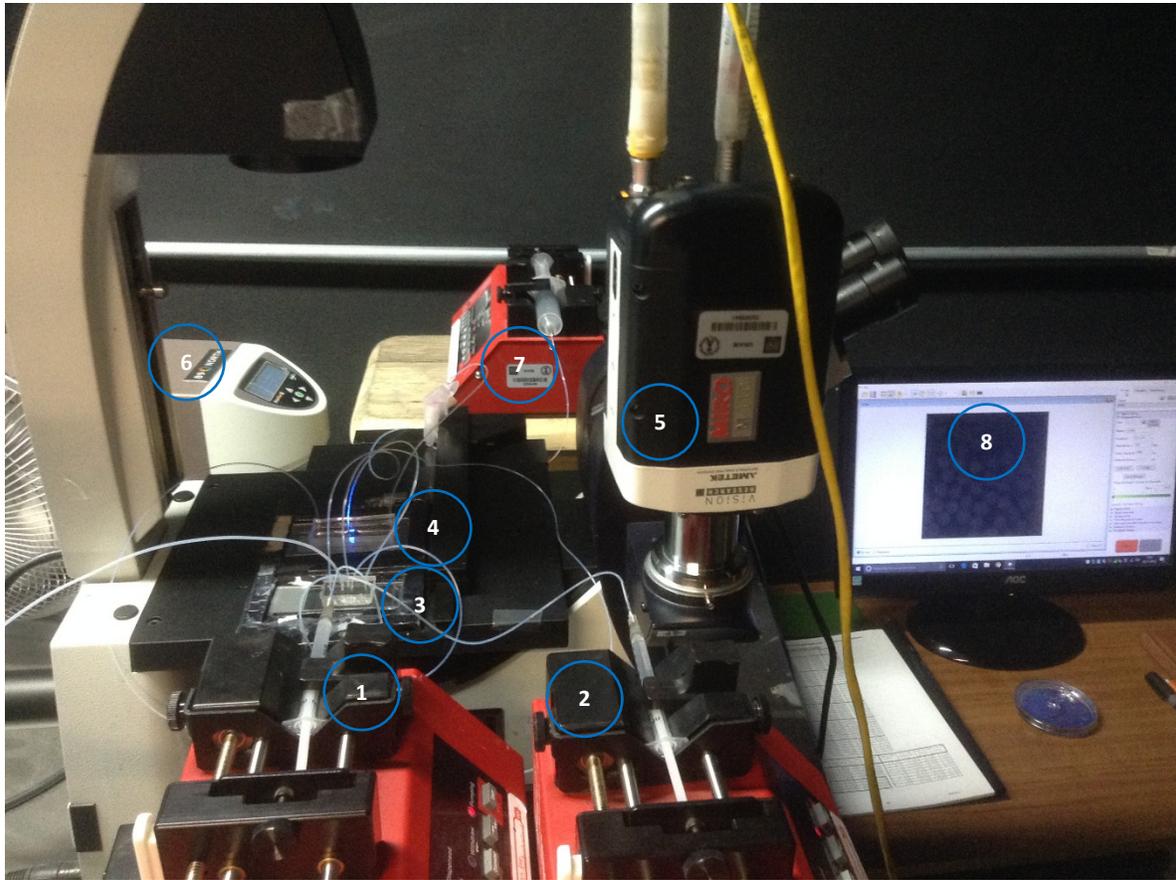


Figura 3- 4 Fotografía del sistema de microfluídica desarrollado en este trabajo. En primer plano se observan unas bombas de inyección en donde se colocan un par de jeringas que contienen el aceite fluorado con alguno de los tensoactivos empleados (1) y en otra la fase acuosa (2) que se conectan al chip GAF (3). En el plano intermedio se tiene el chip $R_{\mu}G$ (4) y la cámara de alta velocidad phantom (5). En el plano trasero se observa la fuente de la lámpara de fluorescencia (6) que sirve como detector al observar las microgotas reintroducidas en la cámara principal del chip $R_{\mu}G$, la bomba de inyección correspondiente a la purga que reduce el flujo de salida del HPLC (7) y el equipo de cómputo que permite la captura de imágenes y procesamiento de resultados (8).

3.2.1 Generación de microgotas en el chip GAF.

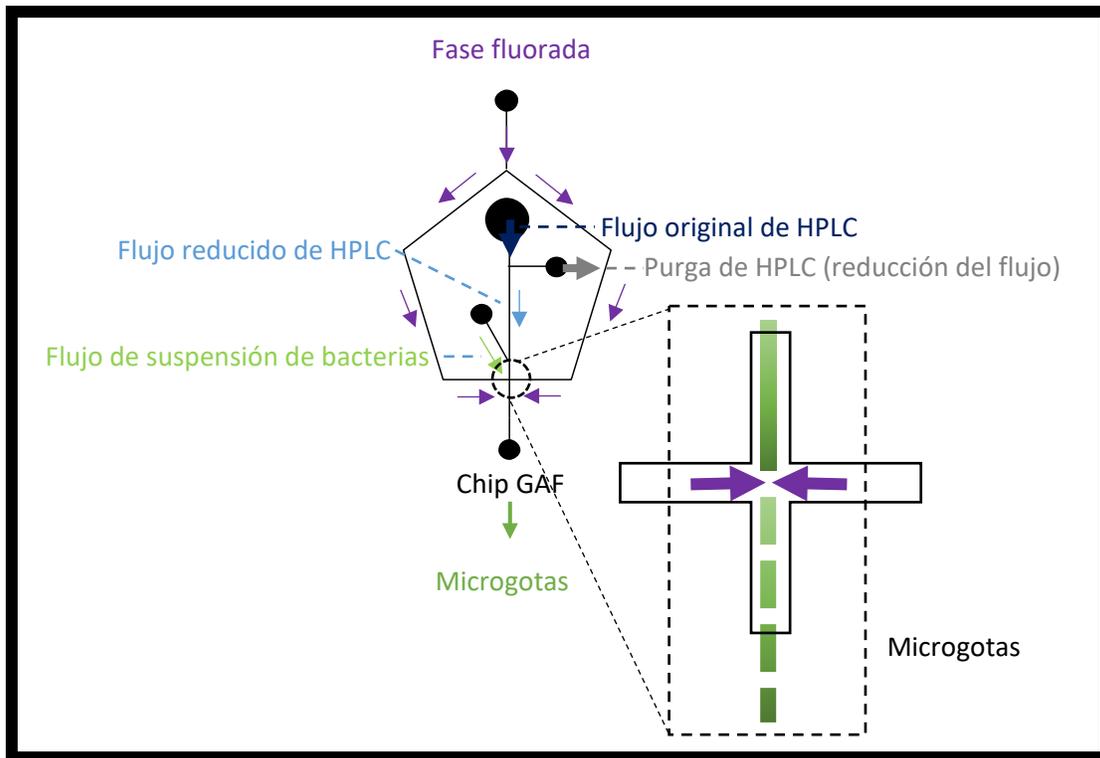


Figura 3- 5 Diagrama que explica el funcionamiento del chip GAF.

Como se muestra en la figura 3-5 en la parte superior del pentágono se introduce el aceite fluorado, este fluye por el perímetro del pentágono y se intersecta con la fase acuosa a la mitad de la base del pentágono generando así las microgotas por medio de la técnica de enfoque de flujos⁵. La entrada de mayor tamaño que se encuentra en el interior del pentágono próxima a la parte superior es dónde se acopla la salida del equipo de HPLC, debido a que el flujo de salida de éste es de $0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($6000 \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$) es necesario reducirlo por medio de una purga. La purga se encuentra a unos cuantos micrómetros de la entrada del HPLC en posición perpendicular a éste. En la purga se genera una diferencia de presión para disminuir el flujo de entrada del HPLC hasta $60 \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$. El canal que se conecta de forma diagonal al interior del pentágono sirve para introducir una fase acuosa que se combine con el flujo ya reducido del HPLC. La generación de las microgotas ocurre cuando la fase fluorada fluye por el pentágono y se intersecta con la fase acuosa (esta puede contener o no células suspendidas). Al ser inmiscibles ambas fases, la fuerza de corte generada por la fase fluorada en la intersección permite la formación de las microgotas, cuya

composición al interior es la combinación entre la fase acuosa proveniente del HPLC y la introducida en el canal diagonal.

3.2.2 Reintroducción de microgotas en el chip R μ G.

En la literatura se encontró con un diseño apropiado para un microchip que permitiera la reintroducción de la microgotas generadas en el chip GAF así como su análisis²⁵. En la figura 3-6 se presenta el diseño, así como el funcionamiento del chip R μ G.

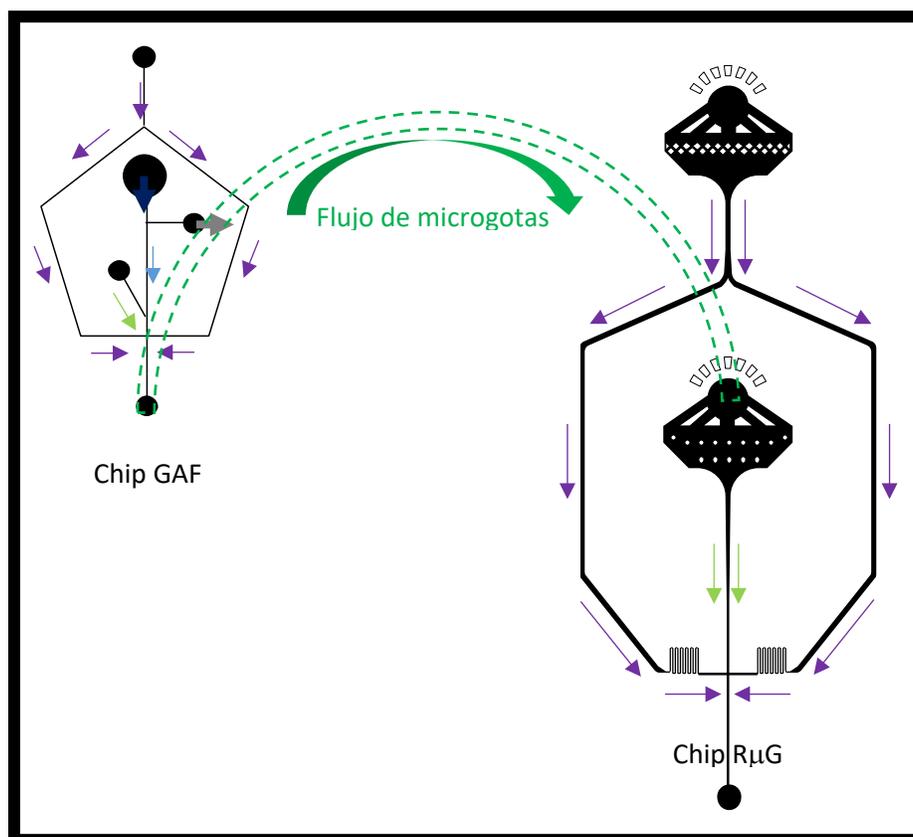


Figura 3- 6 Diagrama que describe como ocurre la reinsertión de microgotas acoplando el chip GAF y el chip R μ G.

También se puede realizar una ligera modificación al chip GAF para que solo presente la entrada correspondiente a la fase fluorada y la perforación correspondiente a la salida de la fase del chip. Esta modificación se realiza con la intención de tener un dispositivo cuya única función sea el bombear fase fluorada a una sección de tubería PTFE que puede contener microgotas almacenadas para su posterior introducción al chip R μ G.

La introducción de las microgotas ocurre en el chip $R_{\mu}G$ con apoyo del chip de empuje de microgotas (chip E). Las microgotas se introducen en la cámara ubicada a la mitad del diseño y gracias al flujo constante de fase fluorada se fuerzan a las microgotas a fluir por el dispositivo para permitir la detección de la viabilidad celular (figura 3-7).

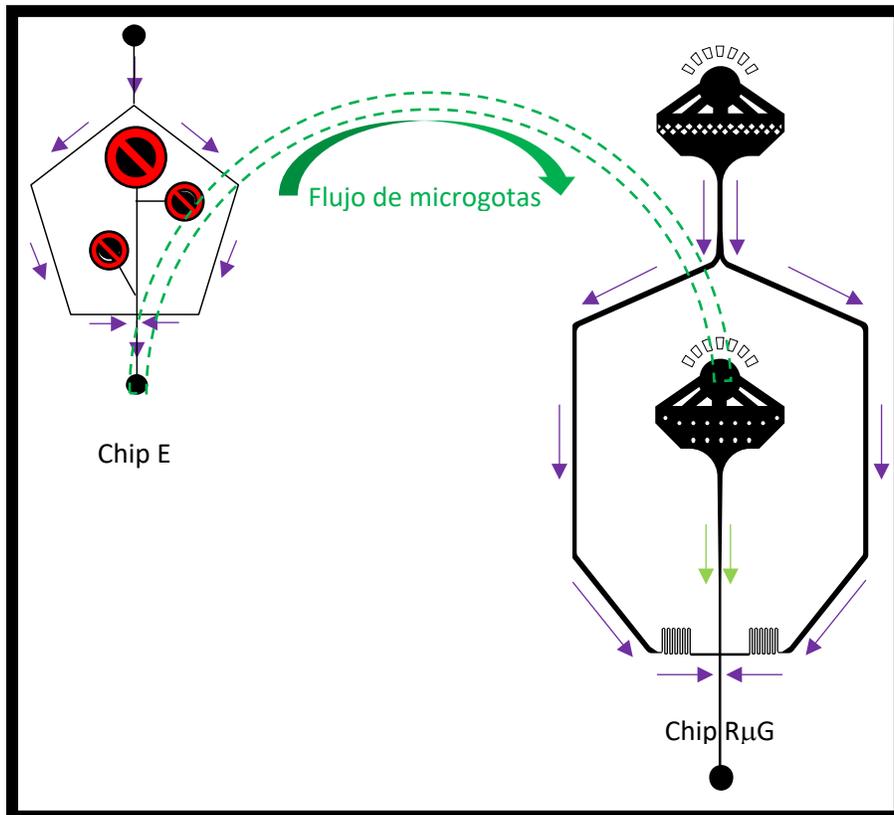


Figura 3- 7 Diagrama que describe como ocurre la reinscripción de microgotas empleando el chip E y el chip $R_{\mu}G$.

3.2.3 Espaciado de microgotas en el chip $R_{\mu}G$.

Una función adicional que presenta el chip $R_{\mu}G$ es el espaciar las microgotas reintroducidas. Como se aprecia en la figura 3-6 y 3-7 en la parte superior del chip $R_{\mu}G$ se introduce aceite fluorado (representado por flechas de color morado), éste recorre los microcanales exteriores y se interseca con las microgotas reintroducidas en la parte inferior del microchip logrando así la adición de pequeños volúmenes de aceite fluorado continuamente entre cada microgota generando así el espaciado de éstas (figura 3-8).

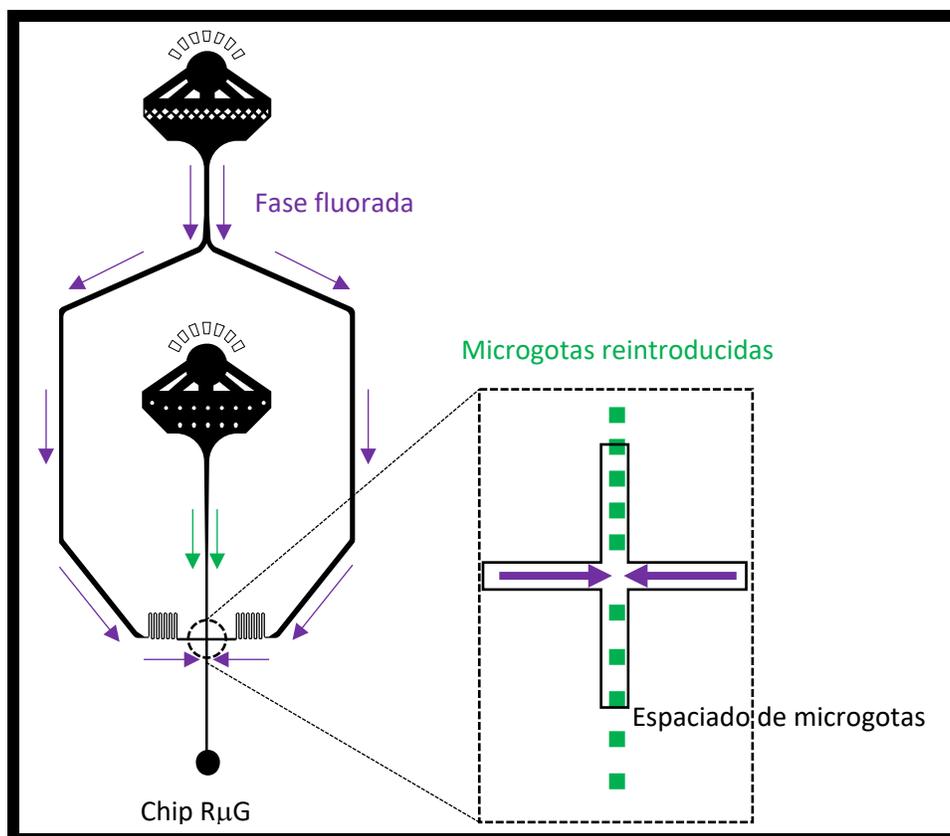


Figura 3- 8 Diagrama que describe el funcionamiento del espaciado de microgotas en el chip R μ G.

3.3 Síntesis de un tensoactivo fluorado.

La síntesis para un tensoactivo formado por dos cadenas de poli(perfluoropropilenglicol) (PFPE) y una de poli(propil-etilenglicol) (PEG) que se denomina PFPE-PEG-PEPF se encontró reportada en la literatura⁷. Sin embargo, la síntesis realizada en este trabajo sufrió de modificaciones que no se encontraron reportadas, por lo que se pudo realizar la síntesis de un tensoactivo tipo PFPE-PEG-PFPE a partir de esta ruta alterna.

3.3.1 Síntesis del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE.

Se pesaron 2 g de tensoactivo Krytox FH 7500 (DuPont) y se secaron bajo vacío por 18 h en un matraz Schlenk. Posteriormente, se agregaron 5 mL de aceite fluorado HFE 7500 (Novec, 3M) bajo atmósfera de N₂ seco. Después, se agregaron 0.35 g de cloruro de oxalilo (Sigma-Aldrich) por medio de una jeringa de plástico, se dejó calentando bajo reflujo (50 °C) y con agitación por 24 h. Una vez concluido el tiempo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se

evaporó a vacío el cloruro de oxalilo que no hubiera reaccionado, así como un volumen aproximado de 4 mL de aceite HFE 7500. En un segundo matraz Schlenk se colocaron 0.26 g (0.23 mL) de Jeffamina ED-900 (Sigma-Aldrich) y se dejaron secando por 20 h bajo vacío. Después se agregan 5 mL de aceite fluorado HFE 7500 y la mezcla se somete a agitación dando lugar a una emulsión en donde ambas fases son incoloras.

El crudo de la reacción entre el Krytox FH 7500 y el cloruro de oxalilo presenta un volumen aproximado de 1 mL, el cual se transfiere por medio de una cánula al matraz Schlenk que contiene una emulsión generada entre la Jeffamina y el aceite fluorado HFE 7500. Una vez concluida la transferencia se observa un cambio instantáneo en la apariencia de la mezcla tornándose de una emulsión clara y translúcida a una mezcla lechosa opaca. Ésta mezcla de reacción se dejó bajo reflujo a 60°C por 24 h con agitación. Después, el aceite fluorado se evaporó a presión reducida y se procedió a pesar el crudo de reacción obteniendo una masa final de 2.53 g.

3.4 Purificación del tensoactivo fluorado.

La purificación del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE se llevó a cabo por medio de tres extracciones con agua/aceite fluorado. Primero se disuelve en 5 mL de aceite fluorado HFE 7500 medidos con una jeringa de plástico de 10 mL una masa de 0.33 g del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE, después se agregan 5 mL de agua destilada y se mezclan suavemente. Se removió la fase acuosa y se recupera la fase fluorada. Esta operación se repite por triplicado y se lleva a un volumen final de 16.5 mL con aceite fluorado, este volumen se mide en la escala presente en el tubo cónico en donde se resguarda la mezcla. Después se pasa la disolución por un filtro de 0.2 μm y se almacena la disolución.

3.5 Caracterización de materias primas y del tensoactivo fluorado.

Las materias primas principales, así como el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE se caracterizaron por medio de la técnica de espectroscopia infrarroja en fase líquida (FTIR; GBC; CINTRA 6) empleando un espectrofotómetro IR.

3.6 Preparación de mezclas aceite fluorado y tensoactivos (fase fluorada)

Se prepararon tres mezclas fluoradas distintas, todas estas se emplearon para la generación de microgotas. La primera se trató de una disolución de tensoactivo Krytox al 1.8 % m/m en aceite fluorado HFE 7500. La segunda consiste en una disolución de Krytox al 3.6 % m/m en aceite fluorado HFE 7500 que se utilizó para formar gotas acuosas en un chip al entrar en contacto con una disolución acuosa de Jeffamina al 0.75% m/v. Finalmente la tercera se trató de una disolución al 2% m/m de tensoactivo PFPE-PEG-PFPE sintetizado y purificado en este trabajo.

3.6.1 Fases fluorada: Krytox en aceite fluorado HFE 7500.

Se ha reportado que las emulsiones generadas utilizando una disolución al 1.8 % m/m presentan una estabilidad mayor a las emulsiones en donde se emplea aceite mineral y un tensoactivo no fluorado que son las fases continuas típicas empleadas en los sistemas de microfluídica. Se preparó pesando 16 g de aceite fluorado HFE 7500 y posteriormente agregando 0.288 g de tensoactivo Krytox. La mezcla se almacena en un tubo Falcon de 15 mL y se homogeniza utilizando agitación vórtex. Al momento de ser empleada se transfiere a una jeringa de 1 mL a la que le ha sido adaptada una porción de tubería PTFE de 20 cm y que se acopla al chip GAF para la generación de microgotas.

3.6.2 Fase fluorada: Krytox/Jeffamina en aceite fluorado HFE 7500.

La fase fluorada Krytox/Jeffamina-HFE 7500 se prepara pesando 16 g de aceite fluorado HFE 7500 y posteriormente agregando 0.576 g de tensoactivo Krytox. La mezcla se almacena en un tubo Falcon de 15 mL y se homogeniza utilizando agitación vórtex. Por otra parte, se preparó una disolución de 0.75% m/v de jeffamina y colorante vegetal rojo suficiente para teñir la disolución. Al momento de ser empleada se transfiere cada una de las fases a una jeringa de plástico de 1 mL a la que le ha sido adaptada una porción de tubería PTFE de 20 cm y que se acopla al chip GAF para la generación de microgotas.

3.6.3 Fase fluorada: Tensoactivo PFPE-PEG-PFPE/FH7500.

La fase fluorada que contiene el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE tiene una concentración de éste del 2% m/m. Se prepara pesando 0.6 g del tensoactivo

purificado y disolviéndolo en 30 g del aceite fluorado FH7500. Se homogeniza la disolución empleando un agitador vórtex y posteriormente se filtra a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.2 μm . Al momento de ser empleada también se transfiere a una jeringa de 1 mL a la que se le ha sido adaptada un segmento de tubería PTFE de 20 cm y que se acopla al chip GAF para la generación de microgotas.

3.7 Ensayos de estabilidad de emulsiones.

La estabilidad de las microgotas generadas empleando cada una de las distintas fases fluoradas se determinó comparando tres características que son indispensables para que las microgotas puedan ser utilizadas como microreactores:

- Generación de microgotas con distintos porcentajes de metanol en agua utilizando un gradiente de agua-metanol con un equipo de HPLC.
- Que las microgotas no presenten coalescencia al ser transportadas de un dispositivo a otro.
- Almacenamiento de las microgotas fuera de los dispositivos en segmentos de tubería PTFE por hasta 72 h.

3.7.1 Generación de microgotas con un gradiente de MeOH.

Empleando el chip GAF acoplado a un sistema de HPLC se probó la capacidad de cada emulsión generada a partir de las tres fases fluoradas distintas que se prepararon de permitir la generación de microgotas conforme se corría un programa de elución que presentaba un gradiente de MeOH. El gradiente generado en el equipo de HPLC se explica a continuación.

3.7.1.1 Programa de elución.

Se desarrolló un programa de elución con gradiente de MeOH bajo las siguientes condiciones cromatográficas: flujo de 0.1 mL/min, volumen de inyección 20 μL , longitud de onda principal 280 nm y longitud de onda secundaria 320 nm. La fase móvil A (FMA) era una disolución acuosa de acetonitrilo al 5%. La fase móvil B (FMB) fue MeOH. El programa de elución se muestra en la figura 3-9.

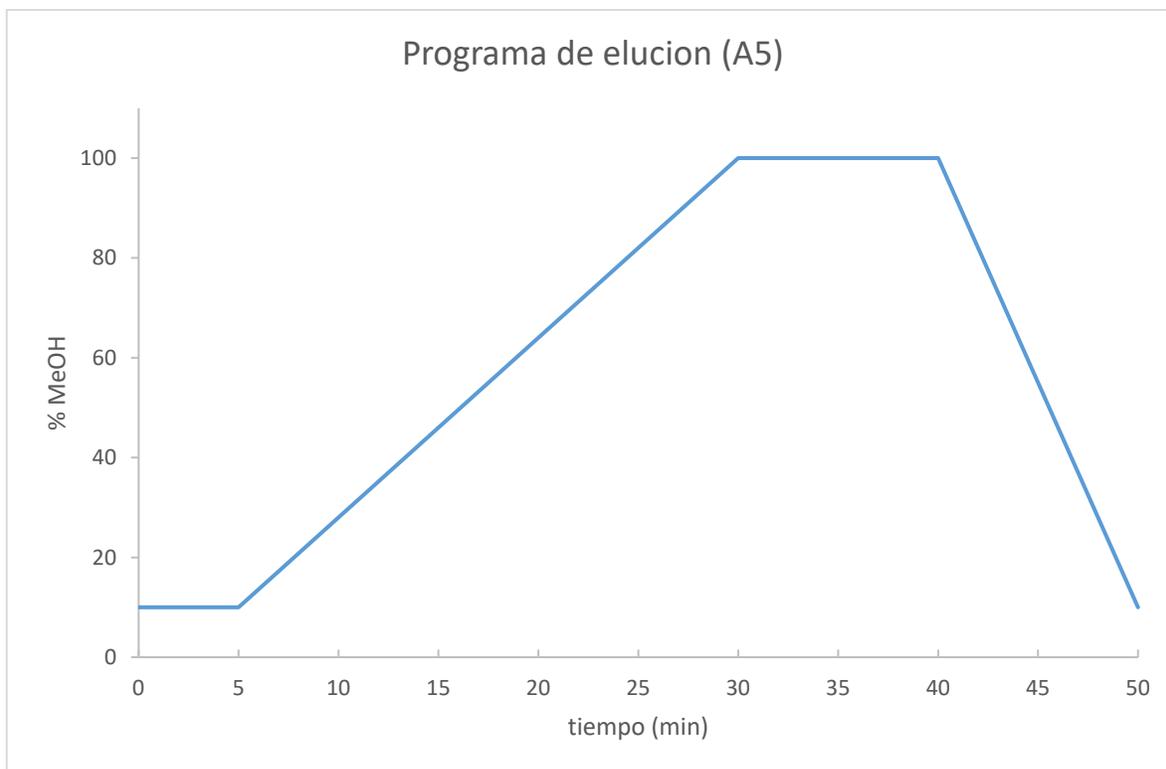


Figura 3- 9 Programa de elución A5.

Para la caracterización del sistema de microfluídica se empleó un estándar de 4-Metilumbeliferona (4MU), el tiempo de elución del compuesto va de los 10-20 minutos por lo que se tomó la decisión de generar una versión del programa de elución A5 más corta, a esta iteración se le denominó A5' (figura 3-10).

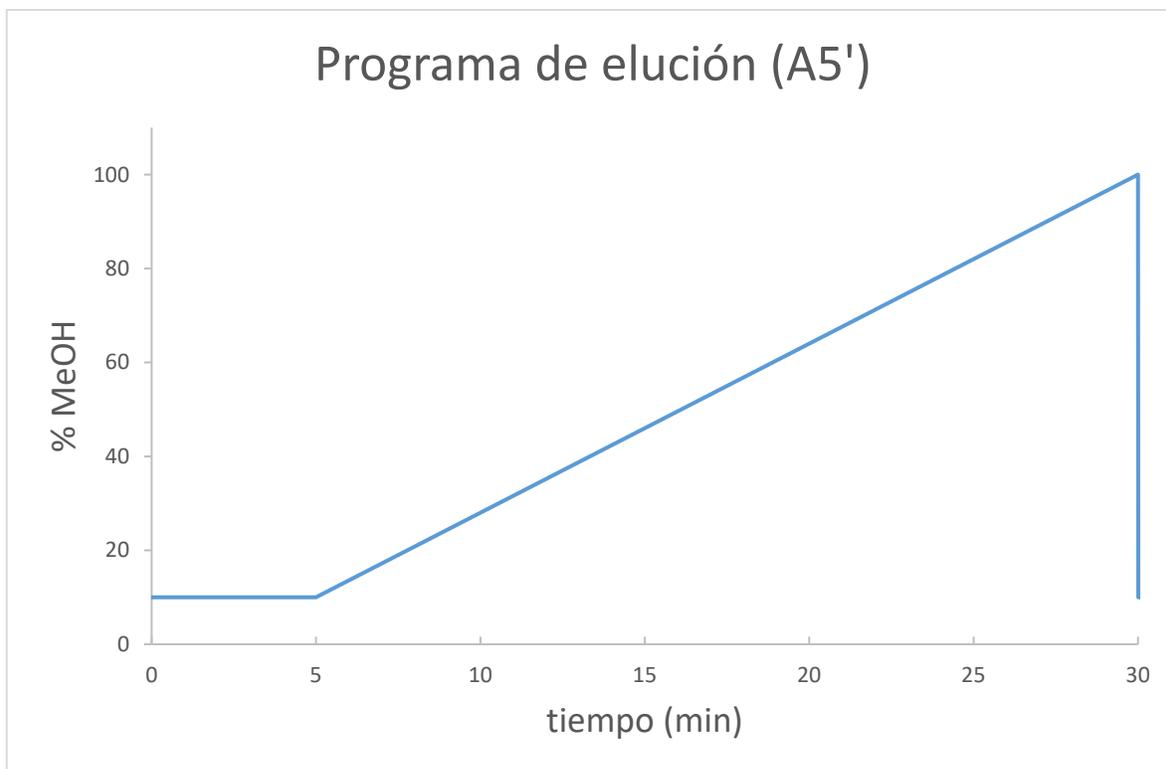


Figura 3- 10 Programa de elución A5', empleando en la caracterización del sistema de microfluídica.

3.7.2 Transferencia de microgotas.

La segunda propiedad que se midió a las tres disoluciones de aceite fluorado con tensoactivo fue la transferencia de las microgotas del chip GAF al chip R μ G. Esta transferencia ocurre mediante una tubería de PTFE de 35 cm de longitud conectada entre el chip GAF y el chip R μ G y que presenta un diámetro interno de 0.55 mm. La estabilidad de la emulsión se determina en función de la capacidad de la emulsión de viajar a través de la tubería sin que las microgotas presenten un alto grado de coalescencia. Esto puede observarse fácilmente en la tubería PTFE como secciones de la tubería en donde su aspecto es más claro en contraste con las secciones en donde no existe coalescencia y el aspecto de la tubería es opaco. Sin embargo, la coalescencia se puede observar instantáneamente bajo el microscopio al observar la cámara de reintroducción del chip R μ G (figura 3-11).

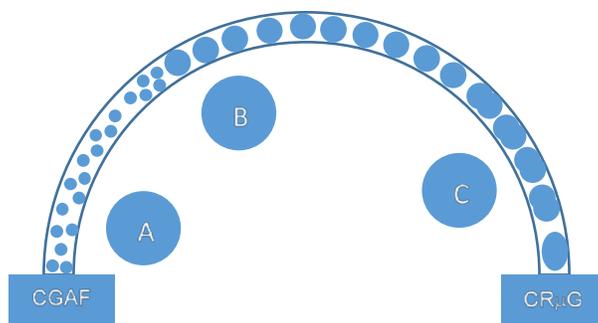


Figura 3- 11 Diagrama de la transferencia de microgotas del chip GAF al chip R μ G por medio de un segmento de tubería PTFE. A) Microgotas siendo transferidas sin presencia de coalescencia. B) Microgotas aglomeradas (izquierda) que dan lugar a gotas de mayor tamaño (coalescen). C) Coalescencia en mayor grado de las microgotas.

3.7.3 Almacenamiento de microgotas.

Si se separa el fragmento de tubería PTFE de los microchips chip GAF y chip R μ G y se protegen ambos extremos de la tubería con Parafilm se pueden almacenar las microgotas por un periodo de tiempo de hasta 72 horas. La estabilidad de la emulsión generada se evalúa tomando en cuenta dos parámetros:

- i) La capacidad de la emulsión de ser reintroducida y que presente la menor coalescencia posible y
- ii) La capacidad de la emulsión de no coalescer mientras se incuba al interior de la tubería PTFE.

3.7.4 Encapsulamiento de células en microgotas.

La encapsulación de células de *E. coli* se lleva a cabo en el chip GAF inyectando en el dispositivo una suspensión de células de *E. coli* con una densidad óptica (OD) medida bajo un espectrofotómetro UV/Vis a 600 nm igual a 1.0 a un flujo (Φ) de 60 μ L/h, el mismo que se tiene para el HPLC una vez que se activa la purga ($\Phi= 5940$ μ L/h). La encapsulación de las células en microgotas ocurre cuando el flujo combinado entre el proveniente del HPLC y el de las células se intersectan de forma perpendicular con el de la fase fluorada que tiene un flujo de 150 μ L/h como se muestra en la figura 3-12.

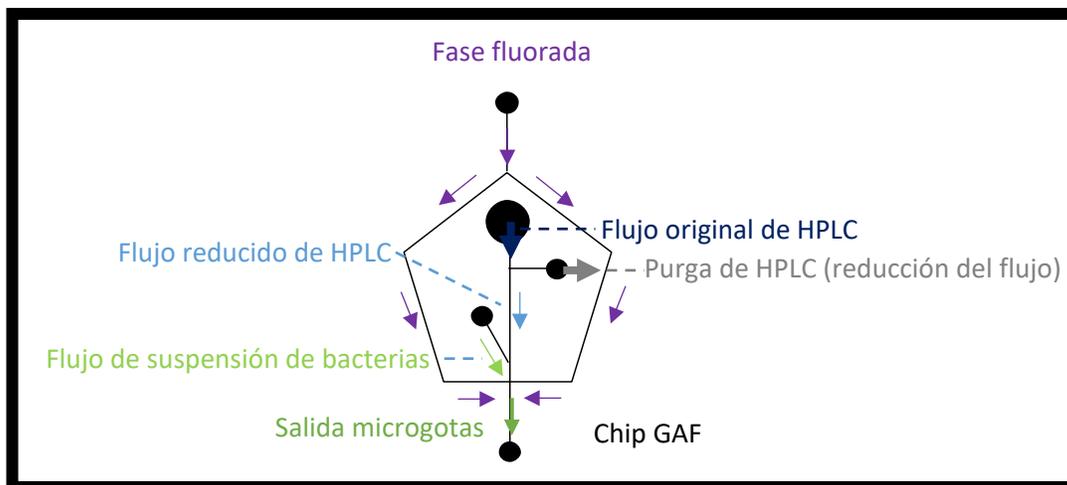


Figura 3- 12 La mezcla entre el flujo proveniente del HPLC y la suspensión de bacterias ocurre antes de que se generen las microgotas en la intersección que se encuentra a la mitad de la base del pentágono en el chip GAF.

3.8 Ensayos biológicos empleando la cepa BL21 de *E. coli*.

Para los ensayos biológicos realizados en las microgotas se empleó la cepa BL21 de la *Escherichia coli*. Para evaluar la viabilidad celular se utilizó la tinta fluorescente de bromuro de etidio y como agente antibiótico se seleccionó el compuesto fosfomicina.

3.8.1 Cultivo de *E. coli*.

Para el cultivo de colonias de *E. coli* se empleó tanto medio LB líquido como sólido.

- Para la preparación de 1 L de medio LB líquido se siguió el procedimiento descrito a continuación:

Se pesaron 10 g de peptona de la leche (P6838, Sigma Aldrich, E.U.A), 5 g de extracto de levadura (70161, Sigma Aldrich, E.U.A.) y 5 g de NaCl (L-B0809, Distribuidora Química AIVI, México). Dichas cantidades se disuelven en 1 L de agua destilada. El medio se esteriliza en una autoclave (SK100C, Yamato Scientific America, EE. UU.) por 20 minutos a una temperatura de 120 °C. Se etiqueta el contenedor y se almacena en refrigeración (5 °C) para sus usos posteriores.

- Para la preparación de 1 L de medio LB sólido se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero se adicionaron 15 g de agar (A1296, Sigma Aldrich, E. U. A) por litro de cultivo. Después de esterilizar, se

vierten aproximadamente 20 mL de la solución en placas Petri de 9 cm de diámetro y 1.5 cm de profundidad en un ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar (Purair flow-24, AirScience, EUA) Finalmente la solución se deja solidificar dentro de las placas, se etiquetan y se guardan bajo refrigeración (5 °C).

Se preparó y esterilizó una solución salina al 0.85% m/v y una disolución amortiguadora de fosfatos (50 mM; pH igual a 7) como medio para resuspender las colonias de *E. coli* para su empleo en el dispositivo de microfluídica.

- La solución salina al 0.85% se preparó pesando 85 g de NaCl y disolviéndolos en 1 L de agua destilada. Después se fraccionó la solución en tubos Falcon de 50 mL. La solución se esterilizó en una autoclave.
- El buffer de fosfatos 50 mM que se prepara pesando 0.2898 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y disolviéndolo en 100 mL de agua destilada, después de ajusta el pH=7 de la disolución amortiguadora con HCl 2 M.

3.8.2 Preparación de disolución del antibiótico fosfomicina.

Se preparó una disolución de fosfomicina (125M4168V, Sigma Aldrich, E.U.A) pesando 1 mg y disolviéndola en 1 mL de agua destilada. Se preparó una disolución de fosfomicina para cada ensayo llevado a cabo. La concentración final que se ajustó para cada cultivo fue de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.8.3 Preparación de tinta fluorescente.

Se preparó una disolución stock de la tinta bromuro de etidio (BrEt). La disolución stock del BrEt (lote: MKBD5725V, Sigma Aldrich) se preparó para tener una concentración de 2.4 mM en agua. La disolución de trabajo se diluyó con agua a una concentración de 400 μM .

3.8.4 Tinción de células de *E. coli*.

Las células se analizaron una vez que se tiñeron con la tinta bromuro de etidio de acuerdo al procedimiento descrito a continuación:

Se toman colonias de *E. coli* de una placa de agar, sembrada 16 horas antes a 37 °C, se resuspenden en 7 mL de solución de salina. Se mide la densidad óptica (OD)

del cultivo a una longitud de onda de 600 nm y se diluye a una $OD_{600\text{ nm}}$ de trabajo de 1.0.

En dos microtubos estériles se colocaron 0.75 mL de suspensión de células, en cada microtubo se añadieron 77 μL de la solución de trabajo de la tinta bromuro de etidio que tenía una concentración de 400 μM . La concentración final de bromuro de etidio fue de 30.8 μM .

Posteriormente, ambos microtubos se etiquetan, uno como “viables” y otro como “no viables”. Al microtubo con la etiqueta de “no viables” se le añaden 0.25 mL del antibiótico. Al microtubo etiquetado como “viables” se le agregan 0.25 mL de agua destilada. La densidad óptica se diluyó a 0.8, después de añadir ya sea la solución de antibiótico o agua destilada. El avance de la actividad bactericida fue seguido con el set de filtros DAPI-50LP-A/ FITC-5050-A y FITC-5050-A/LF561/LP-C para observar las células teñidas con bromuro de etidio, es importante mencionar que el set de filtros DAPI-50LP-A/ FITC-5050-A no es exclusivamente selectivo a la fluorescencia producida por el BrEt.

3.8.5 Análisis de microgotas con el programa ImageJ.

El análisis de las fotos obtenidas de las microgotas que se observan en la cámara del chip $R_{\mu}G$ fueron analizadas con el programa ImageJ. Este software permite realizar el conteo de las bacterias teñidas con las distintas tintas encapsuladas en las microgotas. A continuación, se describe el método de procesamiento de cada imagen para obtener el conteo de células en cada fotografía:

Se inició la aplicación del programa ImageJ. Se selecciona en la barra de herramientas la pestaña de archivo (File) y después se selecciona la opción de abrir (Open; figura 3-13).

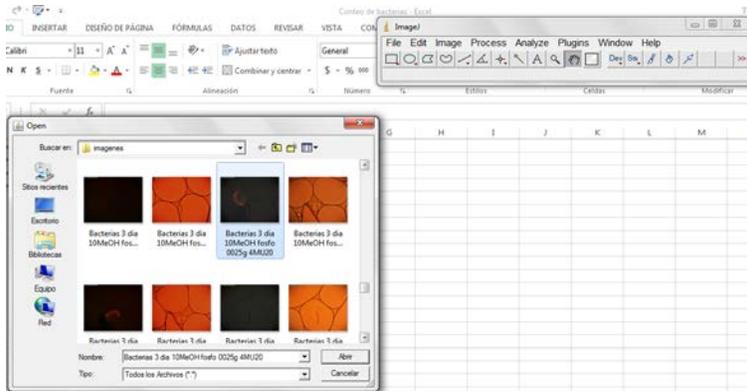


Figura 3- 13 La opción de abrir archivo permite seleccionar la foto que se desea procesar.

Una vez que se ha seleccionado la foto a procesar se abre la pestaña de Proceso (Process) y se selecciona la opción de Substraer Fondo (Substract Background...; figura 3-14)

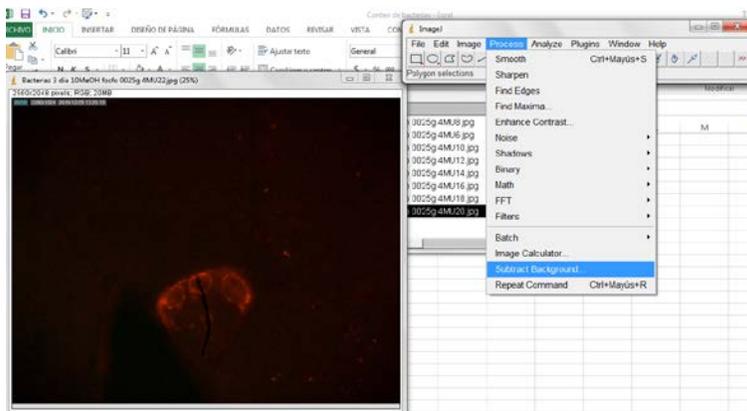


Figura 3- 14 La opción de substraer fondo permite eliminar la luz de fondo de la imagen, reemplazándola por un fondo oscuro.

Una vez que se ha seleccionado está opción se abre un pequeño menú, entre las opciones que pueden seleccionarse se encuentra una que permite seleccionar la longitud del radio en pixeles (Rolling ball radius) que quiere removerse de fondo (figura 3-15).

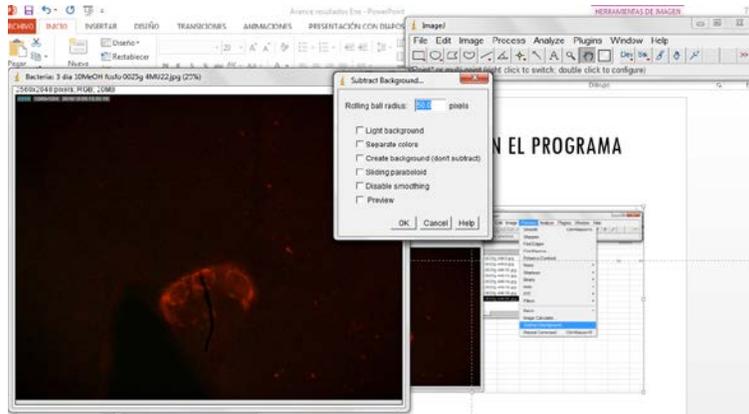


Figura 3- 15 Se selecciona una longitud de radio de 50 píxeles para procesar todas las imágenes analizadas con este software.

Después se selecciona en la pestaña de Ajuste (Adjust) la opción de Umbral de Color (Color Threshold; figura 3-16).

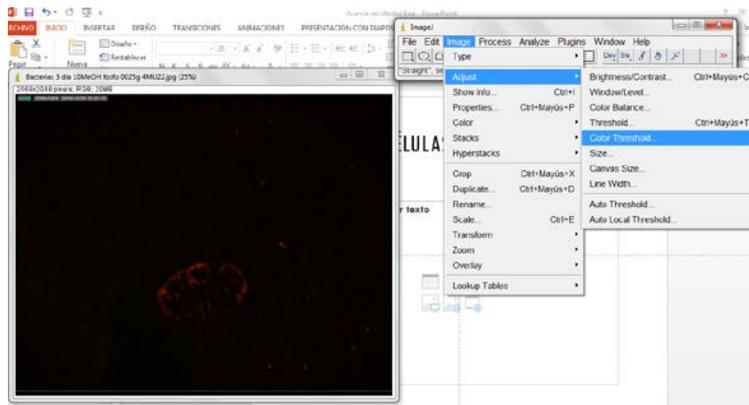


Figura 3- 16 La opción de umbral de color permite modificar los colores que componen la imagen.

Se abre un menú que permite la edición de los colores de la imagen, esto permite que los diferentes colores de la imagen se cambien (figura 3-17).

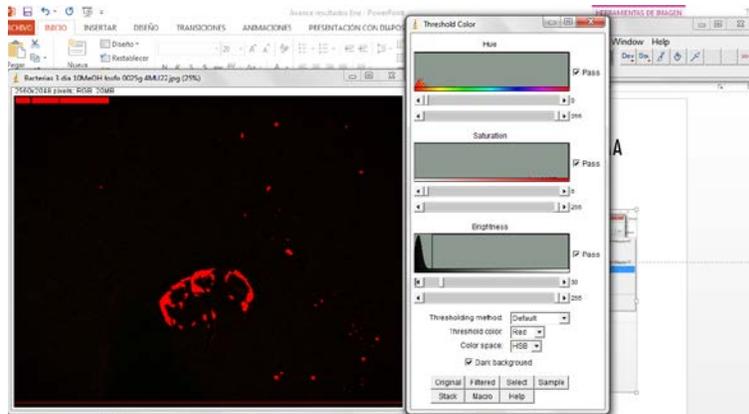


Figura 3- 17 Para el análisis de todas las fotos se seleccionó un brillo de 30/255, un umbral de color rojo y un fondo oscuro. Así se transforma la imagen para que todos los colores de la imagen se reemplacen por diferentes tonalidades de rojo dependiendo de su brillo.

Posteriormente se procesa la imagen seleccionando de la pestaña Proceso la opción Binario (Binary) y después la opción de Convertir en Binario (Make Binary; figura 3-18).

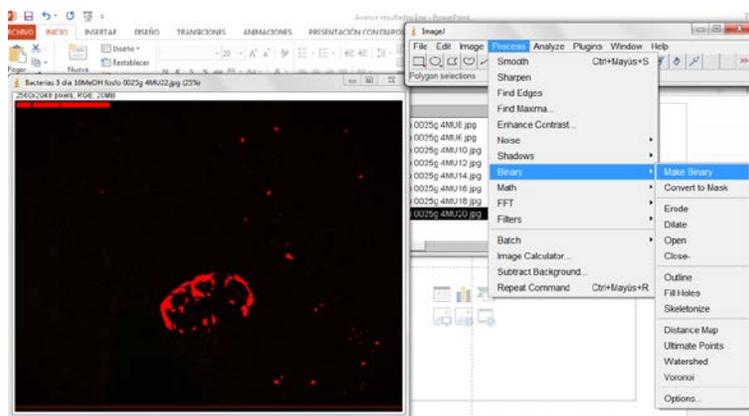


Figura 3- 18 La opción de convertir a binario permite transformar la imagen a blanco y negro, el fondo negro se convierte a blanco y los colores de la imagen (en este caso rojos) se vuelven blancos.

Al convertir la imagen a binario se facilita el proceso de conteo de células, esto gracias a que convierte la imagen a puntos blancos de diferente diámetro sobre un fondo negro. Para definir las células que se encuentran muy juntas se selecciona en la pestaña de Proceso la opción de Binario y después la opción de Línea divisora (Watershed). Esta opción agrega una línea de un pixel de espesor entre paquetes de pixeles que se cree pertenecen a objetos independientes en la imagen (figura 3-19).

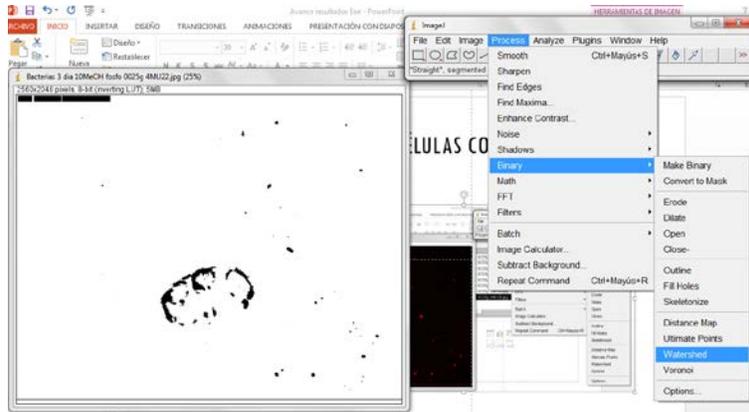


Figura 3- 19 La opción de línea divisora permite definir mejor la imagen que se ha procesado en binario, esto lo hace agregando una línea divisora de un pixel de grosor entre un cumulo de pixeles que el software interpreta como un objeto junto a otro en la imagen.

Para realizar el conteo de células en cada imagen se selecciona la pestaña de Analizar (Analyze) y la opción de Analizar Partículas (Analyze Particles; figura 3-20).

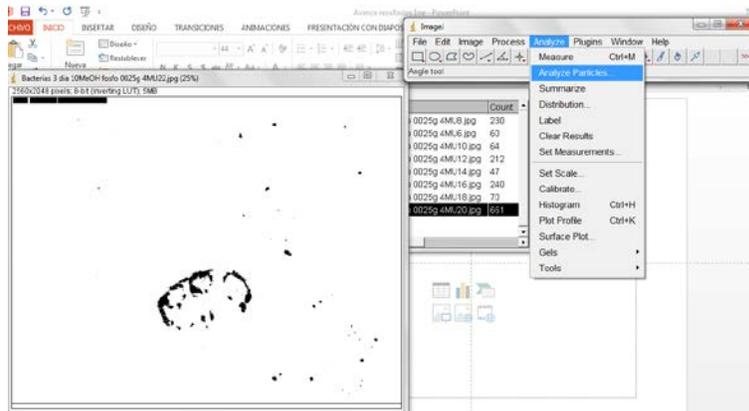


Figura 3- 20 La opción de analizar partículas permite realizar el conteo de células en cada microgota una vez que se ha procesado hasta binario.

Se abre un menú en dónde se pueden seleccionar diferentes opciones así como ajustar algunos parámetros. La opción de Tamaño (Size) permite seleccionar el tamaño de las partículas a que se van a analizar, para todas las fotos analizadas se escoge el rango de 2-200 pixeles cuadrados.

Una vez que se ha procesado la imagen aparece una ventana con el título de Resumen (Summary) en donde se despliegan los resultados obtenidos por el software. Estos resultados se copian y pegan en una hoja de cálculo del software Excel para su posterior procesamiento (figura 3-21).

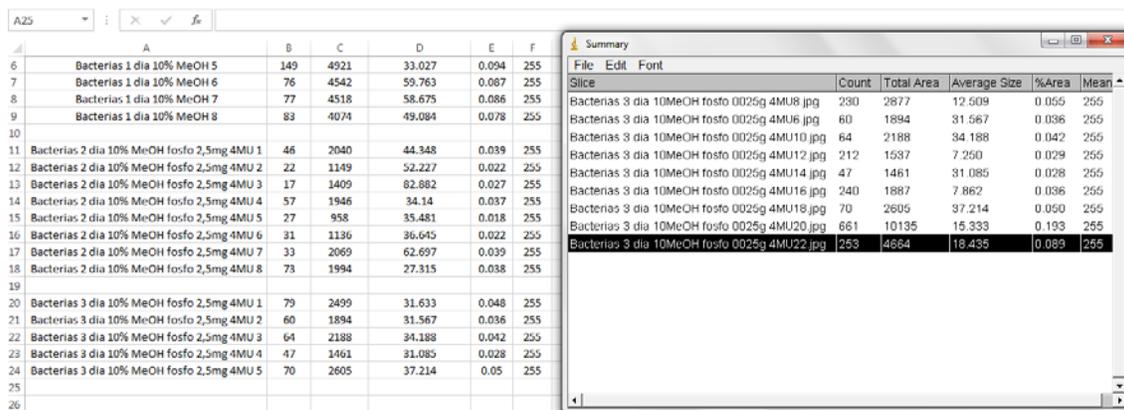


Figura 3- 21 Una vez que el software analiza las imágenes, los resultados obtenidos los despliegan en una tabla. Éstos a su vez se copian en una hoja de cálculo de Excel para su procesamiento.

3.9 Caracterización del sistema de microfluídica.

3.9.1 Preparación de estándares de fosfomicina.

Se preparan tres disoluciones estándar de fosfomicina en metanol (2.5, 5 y 10 mg/mL) para determinar el tiempo de retención de la fosfomicina en la columna de HPLC de acuerdo con el programa de elución A5.

3.9.2 Preparación de estándares de 4MU.

Se prepara una disolución stock de 4-metilumbeliferona (4MU) cuya concentración fue de 2.5 mM. La disolución se prepara empleando como disolvente una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7 y MeOH que a partir de este momento se denomina como solvente. La proporción de MeOH en el solvente es 10 % v/v. Se preparan dos disoluciones de trabajo, la primera tuvo una concentración de 4MU igual a 1.6 mM y la segunda una concentración de 0.8 mM.

3.9.3 Preparación de la mezcla de caracterización.

Para preparar la mezcla de caracterización se pesaron 2.5 mg de fosfomicina en un microtubo y se agregó un mililitro de la disolución de trabajo de 4MU de concentración 1.6 mM. Se homogeniza con ayuda de un agitador vórtex.

4 Resultados y Análisis

4.1 Tensoactivo fluorado PFPE-PEG-PFPE.

En la figura 4-1 se describen las reacciones llevadas a cabo para realizar la síntesis del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE.

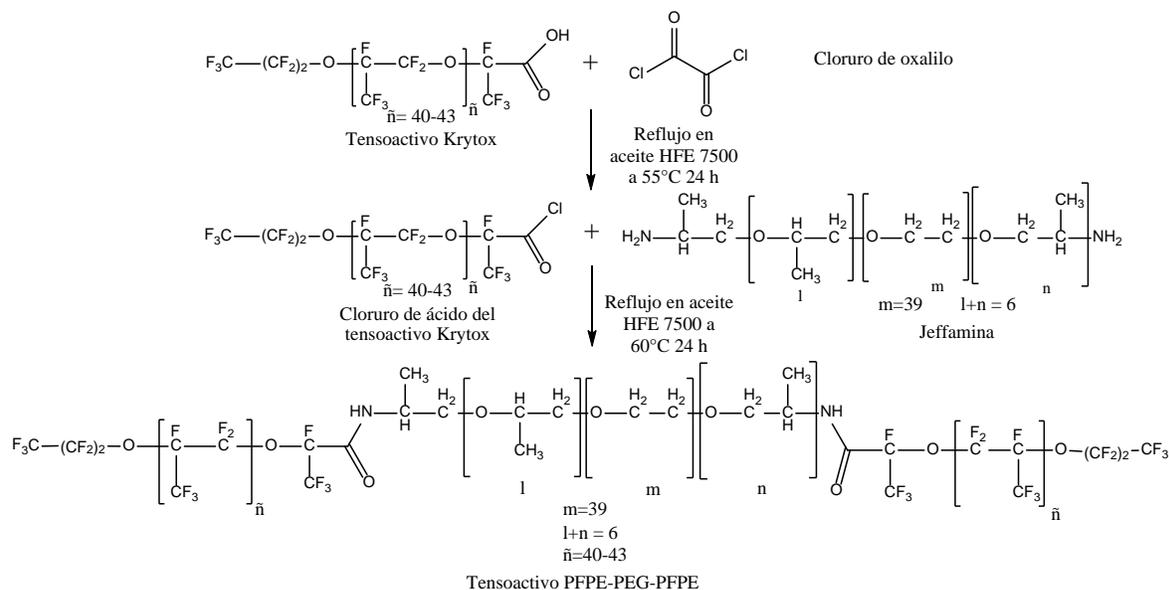


Figura 4- 1 Esquema de la reacción de síntesis del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE.

Para obtener el tensoactivo fluorado PFPE-PEG-PFPE es necesario llevar a cabo primero la conversión del ácido carboxílico del poli(perfluoropropilen glicol) (PFPE) en su cloruro de ácido, esto se hace haciéndolo reaccionar con un agente oxidante tal como lo es el cloruro de oxalilo, bajo atmosfera de nitrógeno y bajo agitación constante por 24 h a reflujo de 50 °C empleando como medio de reacción el aceite fluorado HFE 7500. Esta conversión también puede llevarse a cabo con otros agentes oxidantes tales como el cloruro de tionilo, sin embargo, para este trabajo se optó por el cloruro de oxalilo ya que su manipulación era más sencilla y segura.

La segunda reacción que se lleva a cabo es entre la diamina del poli(propil-etilenglicol) (PEG), conocida comercialmente como Jeffamina, y el cloruro de ácido sintetizado en el paso anterior disuelto en aceite HFE 7500 libre de trazas de cloruro de oxalilo. Al no ser soluble la Jeffamina en el aceite HFE 7500 la segunda reacción se lleva a cabo en fase heterogénea, a agitación constante y a reflujo de 60 °C por 24 horas. La reacción que se lleva a cabo es el acoplamiento de la cadena PFPE presente en el cloruro de ácido y la cadena PEG presente en la Jeffamina por medio

de la formación de dos enlaces amida para así formar el tensoactivo co-polimérico PFPE-PEG-PFPE.

4.1.1 Características físicas y propiedades del tensoactivo fluorado PFPE-PEG-PFPE

El tensoactivo sintetizado se trata de un líquido viscoso de color blanco. Es insoluble en agua y forma una disolución translúcida en aceite fluorado HFE 7500.

Al generarse una emulsión entre agua y una disolución de aceite fluorado con el tensoactivo sintetizado (1.8% m/m), se formó una espuma blanca. La emulsión generada es bastante estable y tiene una apariencia gelatinosa.

4.1.2 Caracterización por espectroscopia infrarroja de los reactivos y productos.

Cómo método de caracterización espectroscópico se eligió la espectroscopia infrarroja. Se obtuvo el espectro infrarrojo de las materias primas, así como del producto de la reacción. Al comparar los espectros de las tres sustancias se determinó que se sintetizó un compuesto nuevo que presenta bandas que no se observan en los espectros de ninguna de las dos materias primas.

4.1.2.1 Caracterización por espectroscopia infrarroja del reactivo Krytox

El Krytox 157 FSH es un poli(perfluoropropilen glicol) cuya cabeza polar está formada por un ácido carboxílico (Figura 4.2). Este compuesto comúnmente denominado Krytox, es soluble en aceites fluorados y tiene propiedades de tensoactivo. El espectro infrarrojo que se obtuvo de este compuesto se muestra en la Figura 4-3.

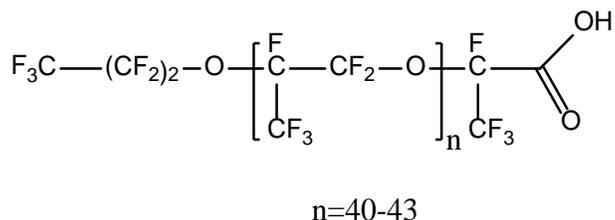


Figura 4- 2 Estructura química del tensoactivo fluorado Krytox 157 FHS.

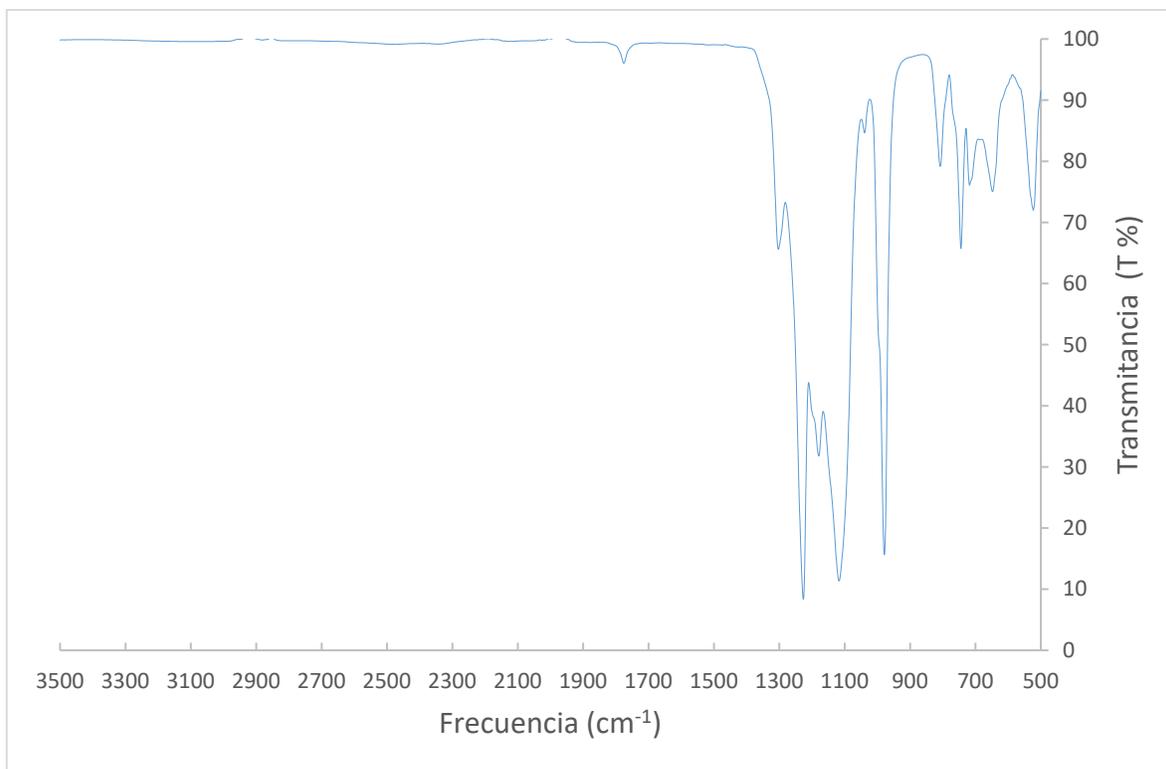


Figura 4- 3 Espectro FT-IT del tensoactivo Krytox 157 FHS.

Se realizó la interpretación del espectro infrarrojo del tensoactivo en dónde se observa que la banda característica del grupo carbonilo correspondiente a los ácidos carboxílicos no se aprecia con la intensidad que es de esperarse para un ácido de cadena corta. A diferencia de estos, la cadena de este tensoactivo cuenta con varios perfluoroésteres que generan que la banda del grupo carbonilo sea pequeña, esta se ubica a una frecuencia de 1780 cm^{-1} (Figuras 4-3 y 4-4).²⁶ Al igual que con la banda del grupo carbonilo, la banda ancha y de gran intensidad propia de los ácidos carboxílicos de cadena corta (que normalmente se encuentra entre 3200 cm^{-1} hasta 3500 cm^{-1}) y que se debe al puente de hidrógeno generada por el ácido no se observa debido a la ausencia de esta interacción en este compuesto.²⁶

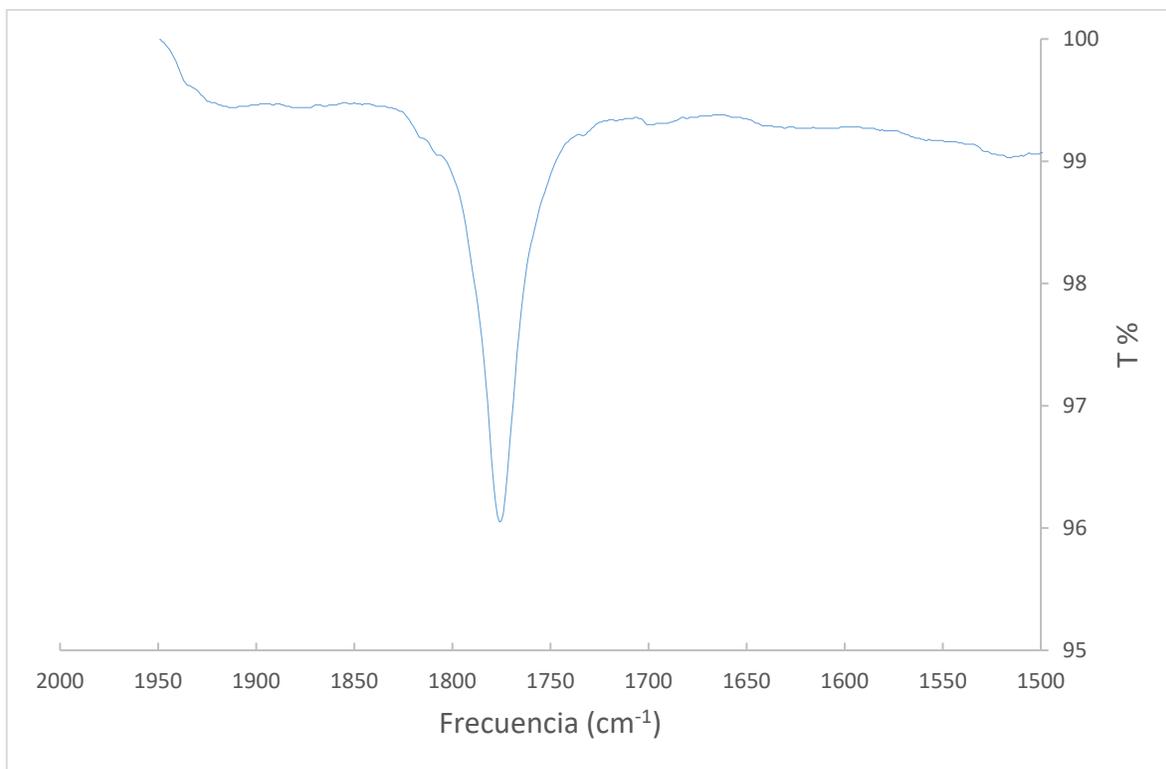


Figura 4- 4 Acercamiento a la banda correspondiente al estiramiento del enlace C=O indicativo de la presencia del grupo carbonilo.

Las bandas ubicadas entre 1000 y 500 cm^{-1} (Figura 4-3) son indicativas de la presencia de especies fluoradas, mientras que las bandas que se observan entre 1300 a 1100 cm^{-1} indican la presencia del grupo éter.²⁶ La diferencia entre la intensidad de las bandas corresponde a la que se esperaría tener en un polímero con la presencia de grupos éter y varias especies fluoradas, éstas en una presencia mayor a la del ácido carboxílico. En la tabla 4-1 se reportan la frecuencia de las diferentes bandas presentes en el espectro del compuesto, la intensidad del máximo de éstas, así como el grupo funcional al cual se le asocia.

Tabla 4-1 Frecuencia de las bandas IR, intensidad y grupo funcional asociados determinados para el tensoactivo Krytox 157 FSH

| Frecuencia (cm ⁻¹) | Transmitancia (T%) | Grupo funcional ²⁶ |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 1780 | 96.56 | R-COOH |
| 1303 | 65.6 | R-COOH |
| 1227 | 8.4 | R-O-R |
| 1179 | 31.8 | R-O-R |
| 1118 | 11.37 | R-O-R |
| 979 | 15.69 | C-F |
| 808 | 79.15 | C-F |
| 744 | 65.74 | C-F |
| 719 | 76.22 | C-F |
| 647 | 75.05 | C-F |
| 524 | 72.06 | C-F |

4.1.2.2 Caracterización por espectroscopia infrarroja de Jeffamina.

El compuesto Jeffamina es una diamina del poli(propil-etilenglicol) (PEG). En ambos extremos de la cadena PEG se encuentra un grupo amino.

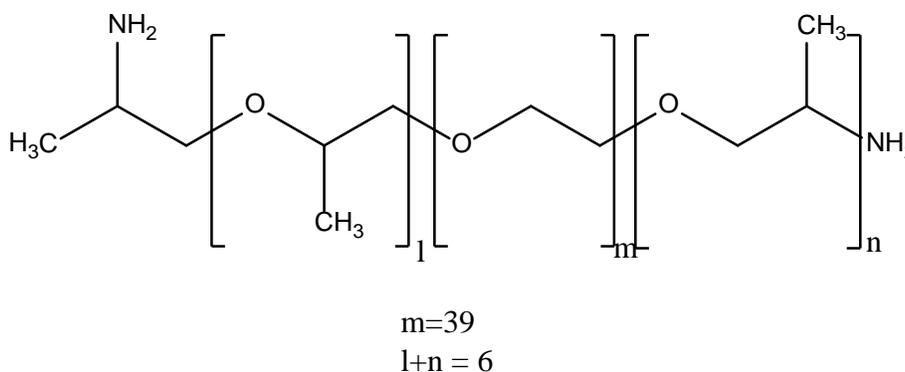


Figura 4- 5 Estructura de la poliamina Jeffamina.

Al igual que sucede con el tensoactivo Krytox, las señales características que se esperan de una amina secundaria en el espectro de infrarrojo presentan una intensidad baja (Figura 4-6). Este efecto está asociado a la presencia de la cadena PEG. La banda que se encuentra entre 3000-2800 cm⁻¹ indica la presencia de grupos metilo y metileno (-CH₃ y -CH₂-). A 1097 cm⁻¹ se observa una banda intensa, ésta se asocia a los grupos éter del PEG. Un acercamiento a las bandas características de las aminas se muestra en la figura 4-7.²⁶

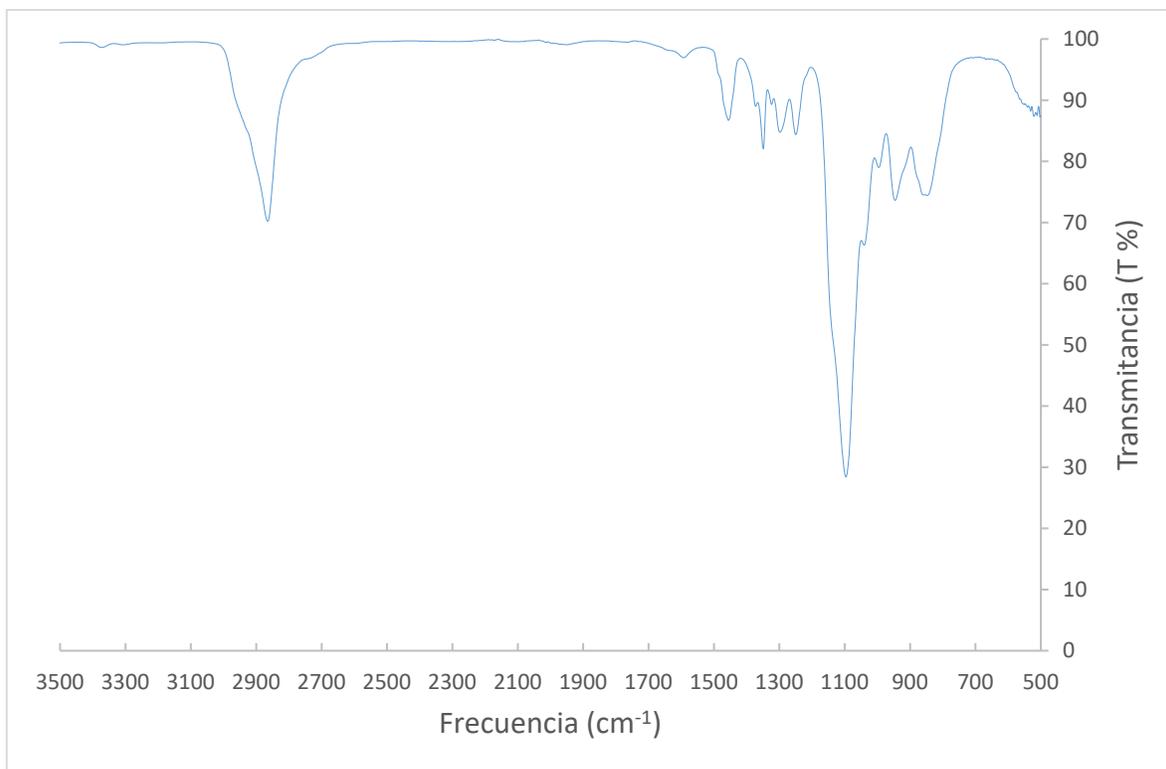


Figura 4- 6 Espectro FT-IR de la poliamina Jeffamina.

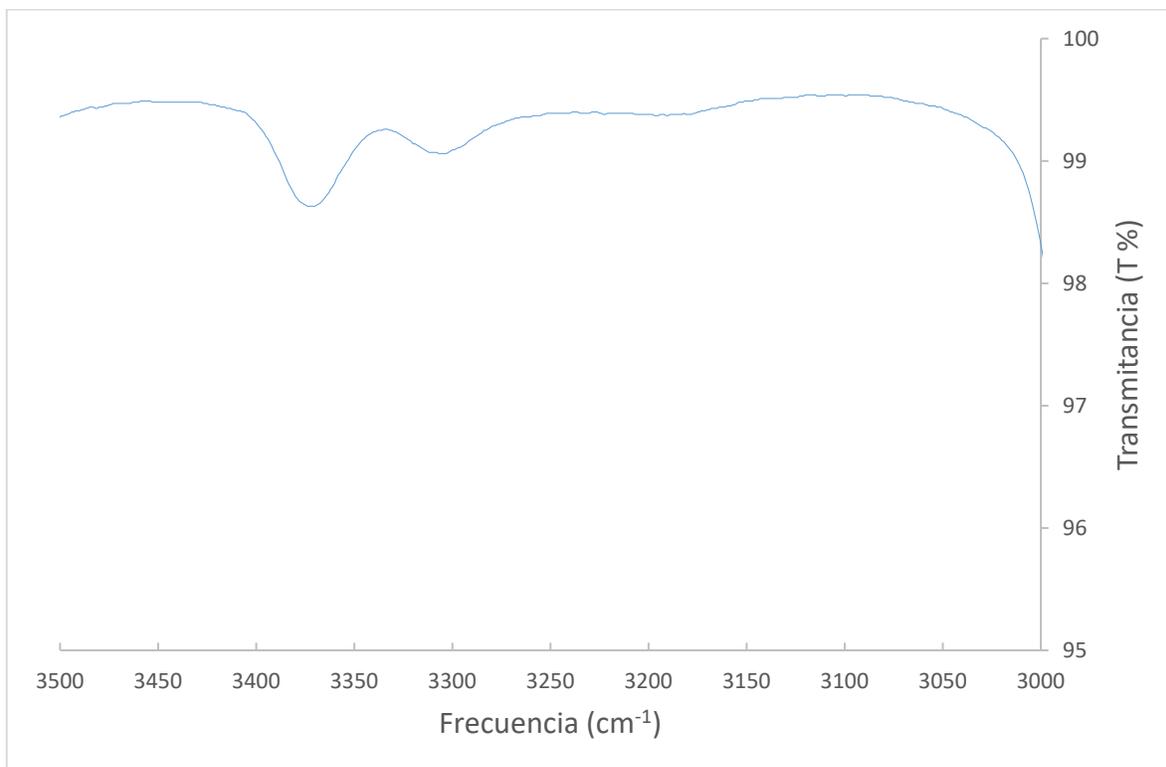


Figura 4- 7 Acercamiento a las bandas correspondientes al puente de hidrógeno característico en las aminas secundarias.

En la tabla 4-2 se muestran la frecuencia de las diferentes bandas presentes en el espectro del compuesto, la intensidad del máximo de éstas, así como los grupos funcionales a los cuales se les asocia.

Tabla 4-2 Frecuencia de las bandas IR, intensidad y grupo funcional asociados determinados para el compuesto Jeffamina

| Frecuencia (cm-1) | Transmitancia (T) | Grupo funcional ²⁶ |
|-------------------|-------------------|-------------------------------|
| 3373 | 98.63 | NH2 |
| 3306 | 99.06 | NH2 |
| 2866 | 70.23 | -CH3 y -CH2- |
| 1592 | 96.97 | NH2 |
| 1456 | 86.69 | -CH3 y -CH2- |
| 1348 | 82.29 | -CH3 |
| 1097 | 28.44 | R-O-R |
| 946 | 73.62 | N/A |
| 849 | 74.42 | N/A |

4.1.2.3 Caracterización por espectroscopia infrarroja del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE.

El producto de la reacción se trata de un copolímero formado por dos bloques PFPE y un bloque PEG. Su estructura se muestra en la figura 4-8.

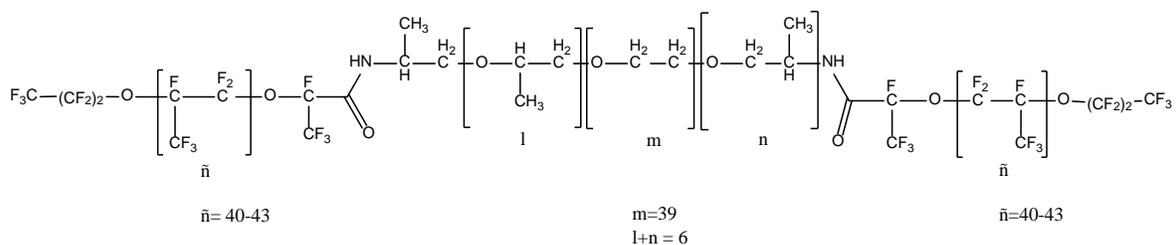


Figura 4- 8 Estructura planteada para el tensoactivo PFPE-PEG-PEPF.

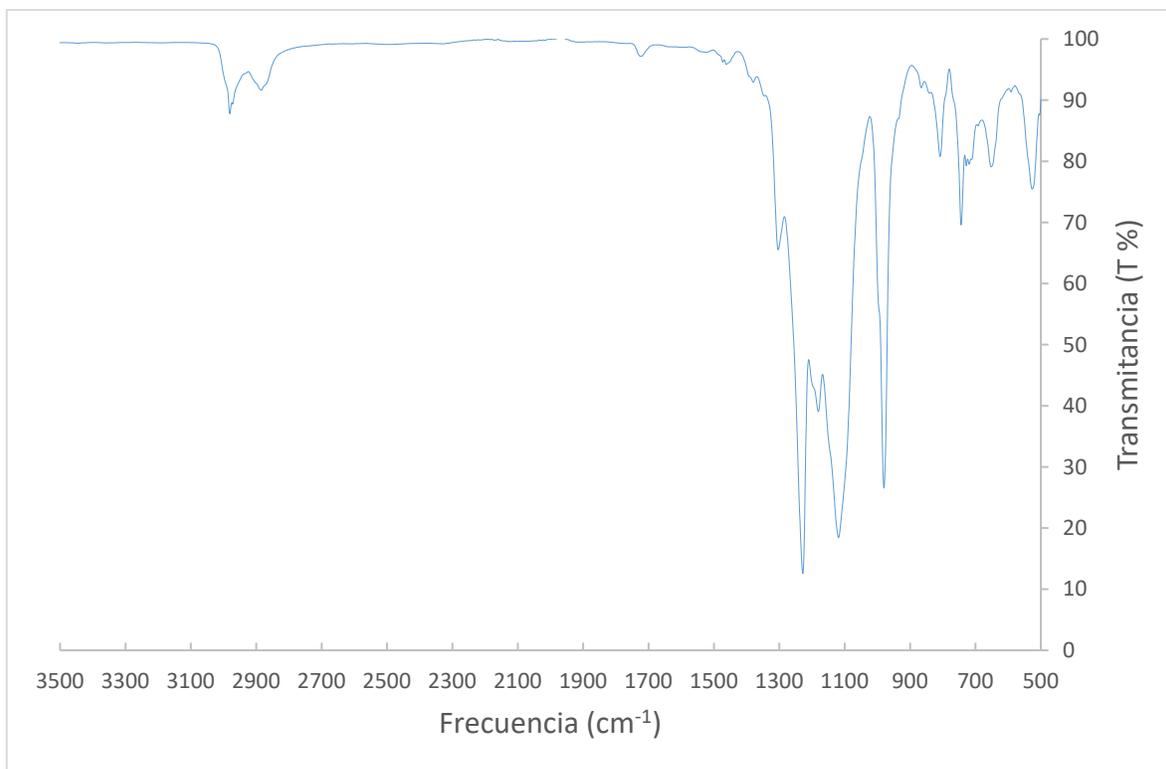


Figura 4- 9 Espectro FT-IR del tensoactivo PFPE-PEG-PFPE.

Al observar el espectro infrarrojo del producto no se aprecian las bandas correspondientes a las aminas secundarias de la Jeffamina y la banda correspondiente al carbonilo del ácido carboxílico del tensoactivo Krytox sufre de un desplazamiento de 1780 a 1710 cm^{-1} , éste comportamiento se asocia con la presencia del grupo amida en el compuesto (Figura 4-9).²⁶

En la figura 4-10 se hace una comparación entre los espectros obtenidos para las materias primas y para el producto obtenido. Al hacer esta comparación saltan a la vista una serie de desplazamientos que indican que el producto obtenido se trata de un compuesto diferente a las materias primas y que presenta bandas indicativas de la conversión al producto deseado.

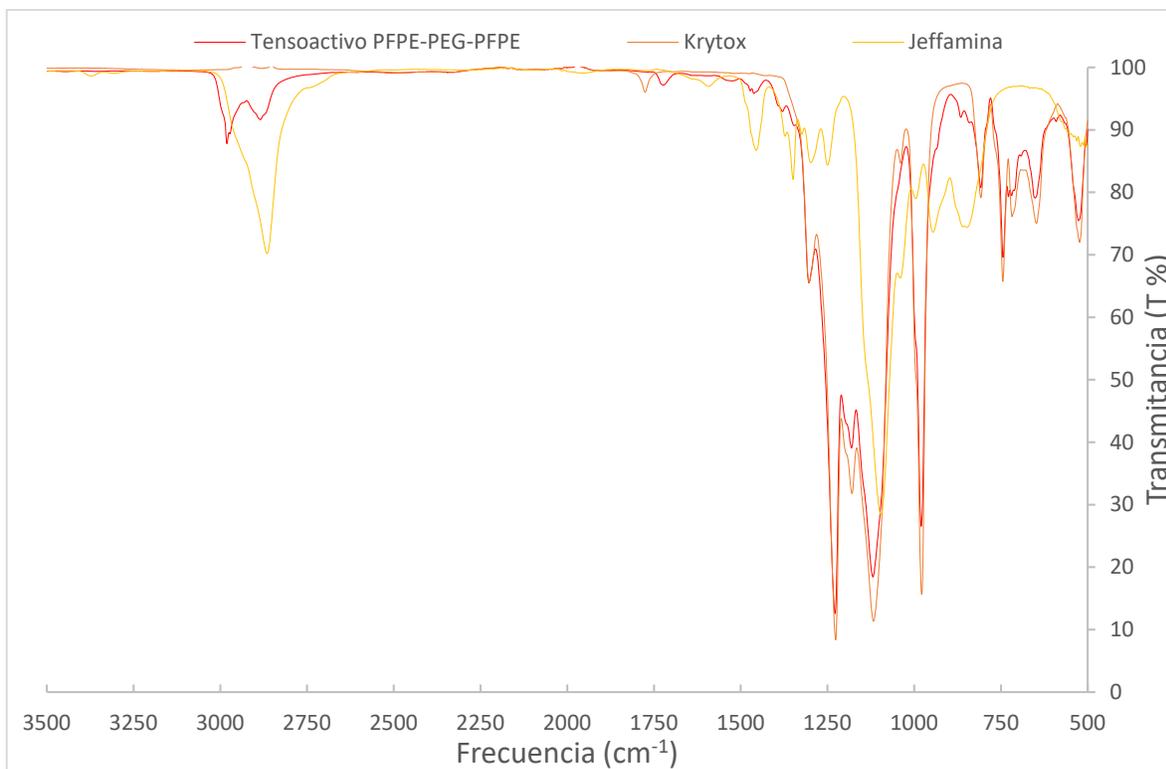


Figura 4- 10 Comparación entre los espectros FT-IR de ambas materias primas y el producto obtenido.

Se observa una banda de base ancha y que presenta dos picos en la región entre 3000 a 2800 cm^{-1} , esta banda cambia de forma respecto a la observada en el espectro de la Jeffamina a 2866 cm^{-1} debido al cambio que sufren los metilos y metilenos presentes en el bloque PEG al momento de adicionarse los dos bloques PFPE a éste (Figura 4-11).²⁶

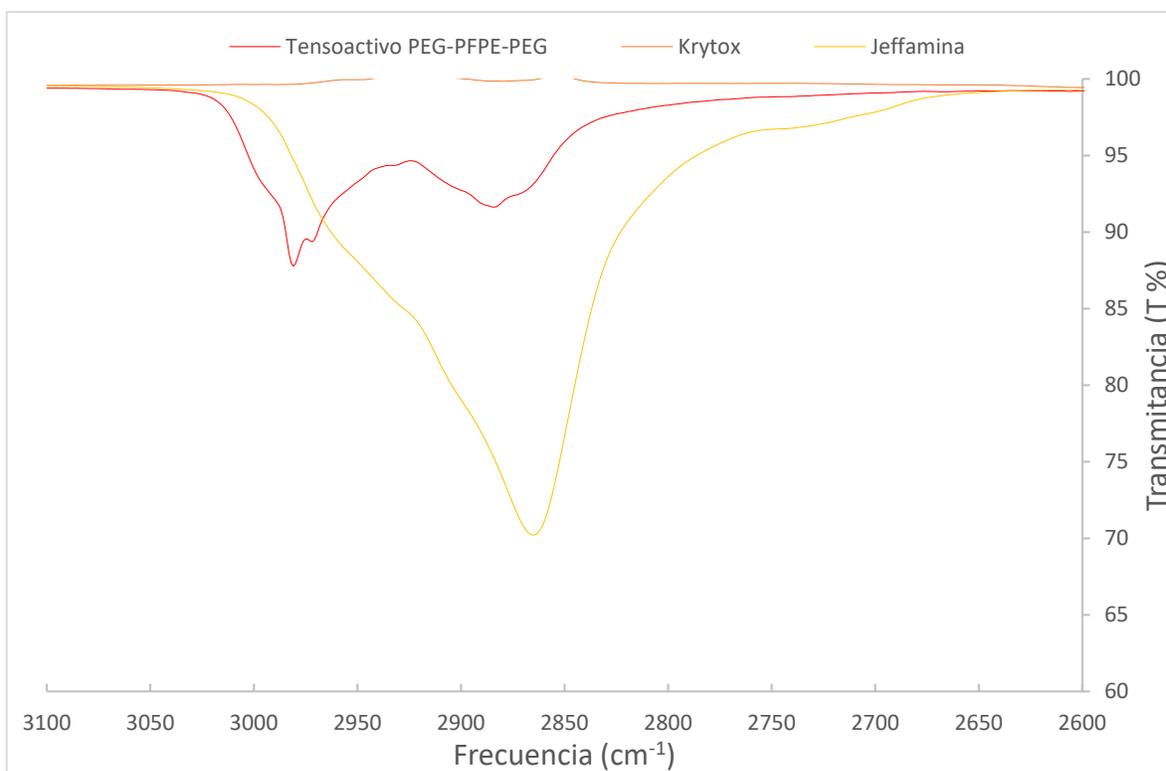


Figura 4- 11 Comparación de las bandas ubicadas en la región 3000-2700 cm^{-1} en los espectros FT-IR de las materias primas y el producto obtenido.

La banda correspondiente al grupo ácido carboxílico del tensoactivo Krytox se desplaza de 1780 a 1710 cm^{-1} . Esto se asocia al cambio de ácido carboxílico a amida del grupo carbonilo presente en tensoactivo PFPE-PEG-PFPE. Este cambio puede observarse en la figura 4-12.²⁶

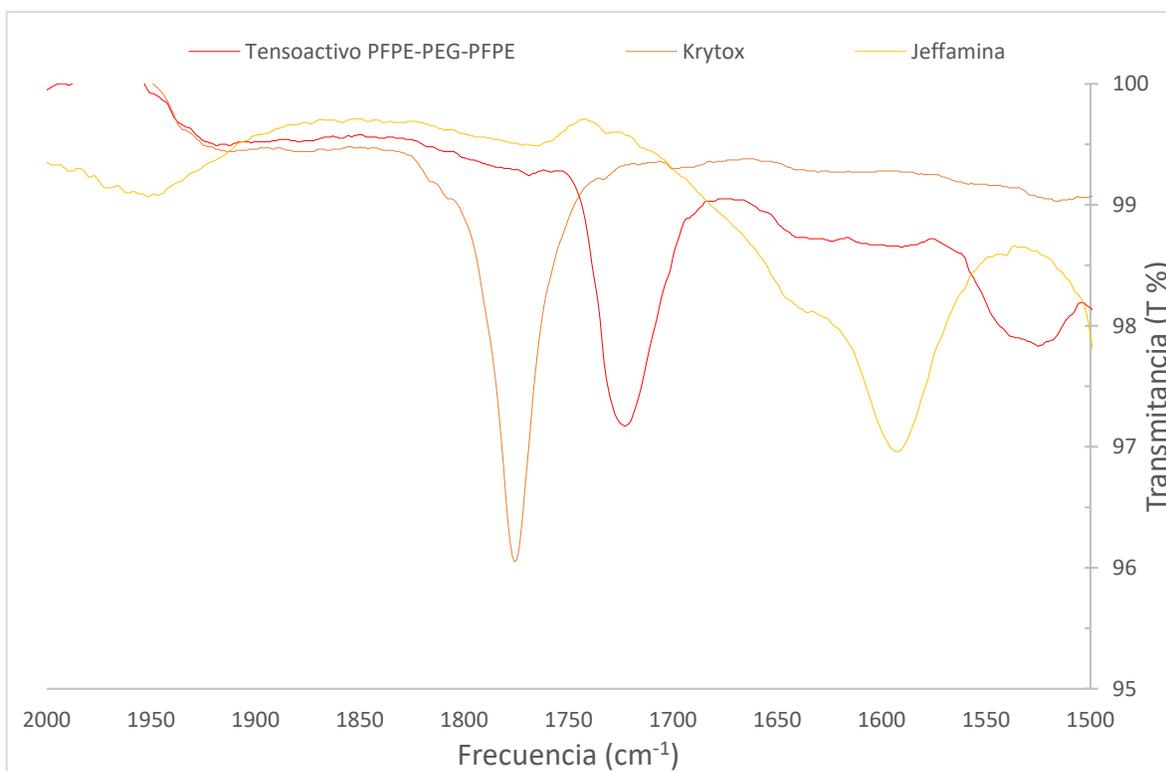


Figura 4- 12 Comparación de las bandas ubicadas en la región de 1800-1700 cm^{-1} en los espectros FT-IR de las materias primas y el producto obtenido.

El comportamiento observado en las bandas de la región 3000-2800 cm^{-1} también se observa con las que se ubican en la región entre 1250 a 1000 cm^{-1} y que se asocian a los grupos éter presentes en el bloque PEG, sin embargo, al contar el tensoactivo Krytox también con dichos grupos éter se observa que éstas bandas se deforman en tres picos. Esto indica la presencia de los bloques PFPE y PEG en la molécula (Figura 4-13).²⁶

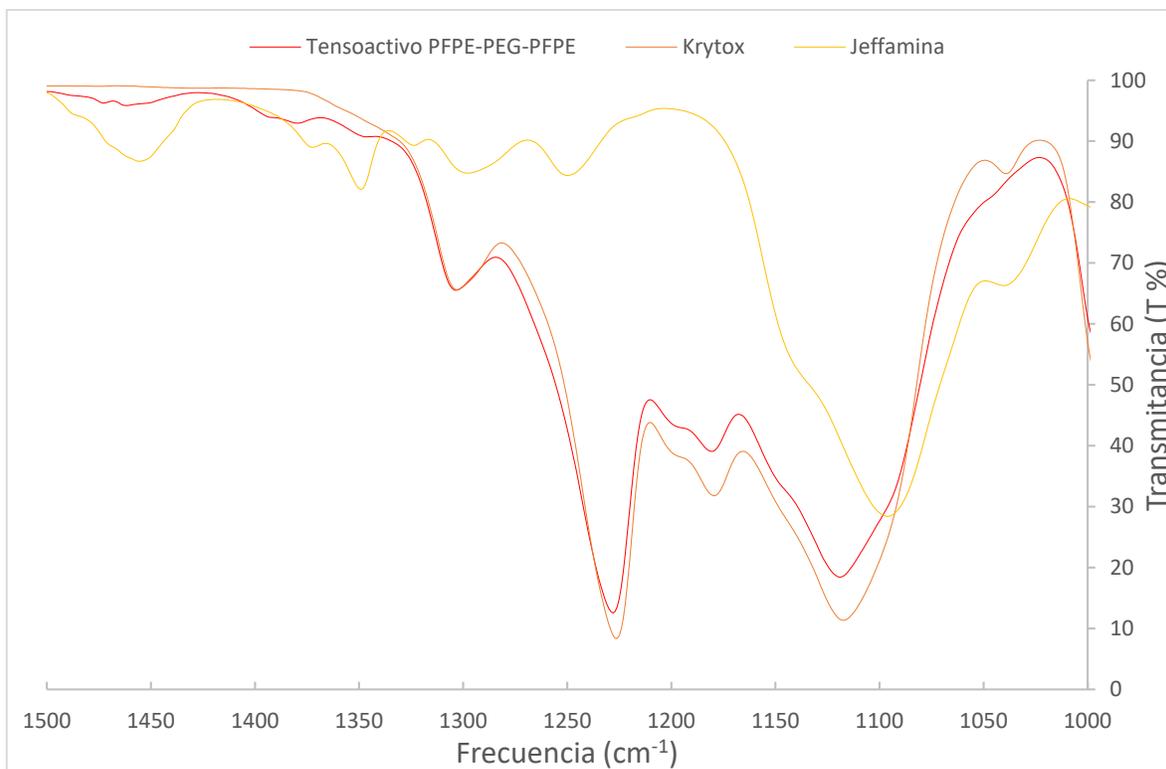


Figura 4- 13 Comparación de las bandas ubicadas en la región de 1300- 1100 cm^{-1} en los espectros FT-IR de las materias primas y el producto obtenido.

Finalmente, las bandas asociadas a diferentes especies fluoradas presentes en el tensoactivo Krytox aparecen sin mayor cambio en el espectro del tensoactivo sintetizado, incluso la intensidad de estas bandas aumenta. Lo anterior es de esperarse ya que el compuesto sintetizado cuenta con dos bloques PFPE (Figura 4-14).

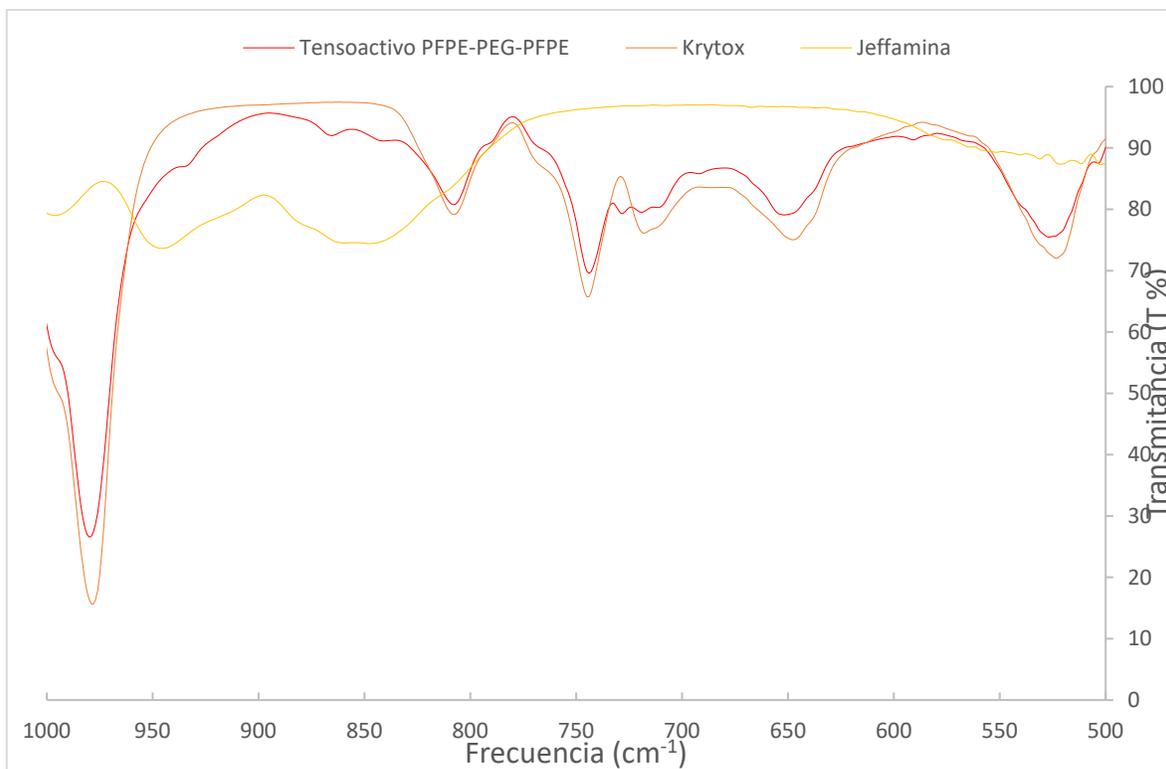


Figura 4- 14 Comparación entre las bandas ubicadas en la región de 1000-500 cm^{-1} en los espectros FT-IR de las materias primas y el producto obtenido.

En la tabla 4-3 se muestran la frecuencia de las diferentes bandas presentes en el espectro del compuesto, la intensidad del máximo de éstas, así como los grupos funcionales a los cuales se les asocia.

Tabla 4-3 Frecuencia de las bandas IR, intensidad y grupo funcional asociados determinados para el tensoactivo PEG-PFPE-PEG

| Frecuencia (cm-1) | Transmitancia (T) | Grupo funcional ²⁶ |
|-------------------|-------------------|-------------------------------|
| 2980 | 87.78 | -CH ₃ |
| 2880 | 91.65 | -CH ₂ - |
| 1710 | 97.19 | OC-N |
| 1480 | 96.72 | -CH ₃ |
| 1460 | 95.99 | -CH ₂ - |
| 1304 | 65.53 | R-O-R |
| 1228 | 12.56 | R-O-R |
| 1181 | 39.08 | CF ₃ |
| 1119 | 18.42 | CF ₃ |
| 979 | 26.69 | C-F |
| 809 | 80.9 | C-F |
| 744 | 69.57 | C-F |
| 652 | 79.09 | C-F |
| 527 | 75.45 | C-F |

Se puede determinar debido al cambio en el espectro infrarrojo y propiedades físicas del producto de la reacción que éste se trata de un compuesto diferente a cualquiera de las materias primas.

Los cambios que se realizaron en esta nueva ruta de síntesis respecto a lo reportado en la literatura son el uso de una mezcla del ácido carboxílico del poli(perfluoropropileno glicol) cuya masa va de los 7000 a los 7500 Da, comercialmente conocido por el nombre de Krytox FH 7500 (originalmente se encontró reportado el uso de un ácido purificado de 6000 Da), el empleo del cloruro de oxalilo como agente oxidante en lugar del cloruro de tionilo, así como la reacción en fase heterogénea en lugar de fase homogénea entre el cloruro de ácido generado a partir de la reacción entre el ácido carboxílico y el cloruro de oxalilo con la diamina del poli(propil-etilenglicol), conocida comercialmente como Jeffamina. El tensoactivo fluorado sintetizado permite la generación de microgotas con estabilidad superior a la de otros tensoactivos fluorados comerciales como se detalla más adelante.

4.2 Estabilidad de emulsión: Krytox / FH7500.

La primera fase fluorada que fue empleada para la formación de microgotas en el chip GAF, incubación y posterior reintroducción al chip R μ G (figura 3-6) fue la disolución al 2 % m/m del tensoactivo Krytox en aceite fluorado FH7500.

Para determinar su funcionalidad se realizaron diferentes pruebas entre las que se encuentran su capacidad para generar microgotas a diferentes concentraciones de metanol y agua, la capacidad de la emulsión generada de ser transferida de un dispositivo a otro viajando a través de un segmento de tubería PTFE, la estabilidad de la emulsión al ser almacenada en el segmento de tubería y la resistencia a coalescer al ser reintroducida después de un tiempo de incubación al chip R μ G.

4.2.1 Generación de microgotas con un gradiente de MeOH.

Una característica que es importante determinar en el tensoactivo es su capacidad para formar microgotas cuando la composición de la fase acuosa va cambiando gradualmente y el agua es reemplazada por otro solvente orgánico (MeOH) como componente mayoritario al interior de las gotas. Esto es necesario si se quiere analizar en las microgotas los compuestos separados en un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAR o HPLC), ya que es muy probable que se requiera de un gradiente de elución para separar compuestos presentes en mezclas complejas, como lo son los extractos naturales.²⁷

Entonces, para determinar si el tensoactivo fluorado es capaz de formar microgotas al realizar un cambio gradual en su proporción de agua y metanol se empleó un programa de elución reportado en la literatura para la separación del extracto natural de la planta manzanilla ó *Chamaemelum nobile* (programa de elución A5 (Figura 3-9)).²⁸ Se realizaron una serie de experimentos en dónde se analizó cual era la concentración de MeOH presente en la fase acuosa que limitaba la generación de las microgotas. Es importante mencionar que el fluido que sale del HPLC se mezcla con una proporción igual en volumen de agua por medio de un microcanal llamado “bacterias” antes de la formación de microgotas (Figura 4-15). Los resultados obtenidos para el Krytox se muestran en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4 Condiciones de los experimentos de formación de microgotas con el tensoactivo Krytox

| % MeOH en HPLC (v/v) | % MeOH en μ gotas (v/v) | Φ Purga (μ L/h) | Φ HPLC (μ L/h) | Φ Bacterias (μ L/h) | Φ Fase fluorada (μ L/h) | Generación de μ gotas |
|----------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 10 | 5 | 5940 | 60 | 60 | 150 | Sí |
| 20 | 10 | | | | | Sí |
| 30 | 15 | | | | | Sí |
| 40 | 20 | | | | | Sí |
| 50 | 25 | | | | | Sí |
| 60 | 30 | | | | | No |
| 70 | 35 | | | | | No |
| 80 | 40 | | | | | No |
| 90 | 45 | | | | | No |
| 100 | 50 | | | | | No |

Durante los experimentos realizados se determinó que a concentraciones por debajo del 60 % de MeOH en el gradiente del HPLC (o del 30 % de MeOH disuelto en cada microgota) no hay ninguna dificultad al formar microgotas en aceite fluorado con Krytox al 1.8% m/m. A concentraciones mayores de metanol se asume que probablemente se produzca un cambio en la viscosidad, tensión superficial o bien en ambas que impide la generación de microgotas, sin embargo, hace falta un estudio profundo que realice la determinación de dichas propiedades, esto no se determinó experimentalmente dado que salía del alcance original de este proyecto. En la figura 4-15 se describe la falla que se presenta dentro del microchip que ya no permite la generación de microgotas.

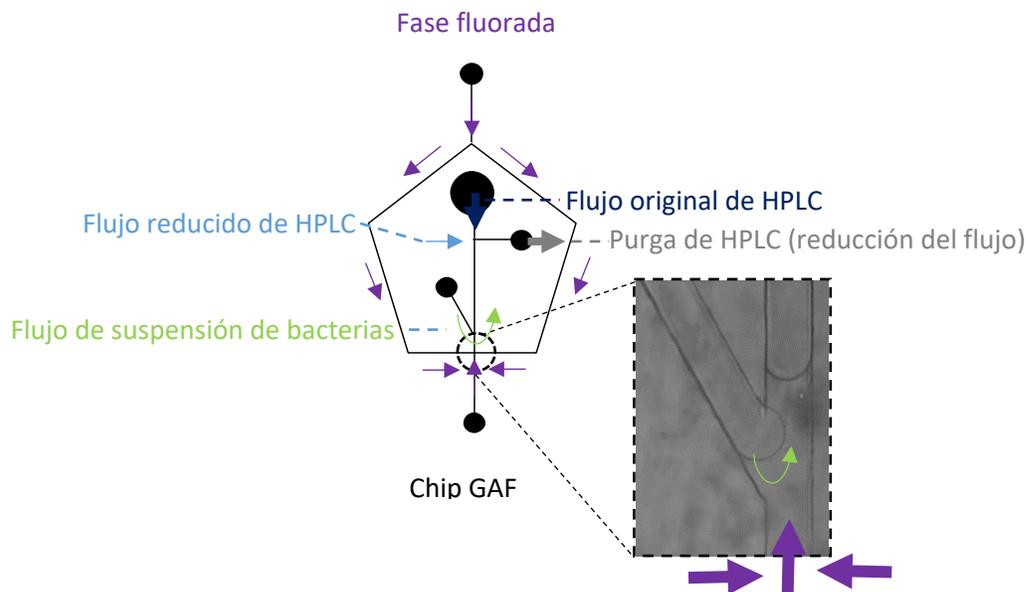


Figura 4- 15 El funcionamiento del chip GAF se ve interrumpido a concentraciones mayores del 60% en el flujo que sale del HPLC (30% de metanol al interior de las microgotas). El problema consiste en que el flujo de la fase fluorada direcciona el flujo tanto de HPLC como de la suspensión de bacterias hacía la purga del chip y no hacía la salida del microchip. Por lo tanto, la generación de microgotas compuestas por la mezcla de la suspensión de bacterias y el flujo reducido del HPLC no se logra. Esto se asume que probablemente ocurra debido a un cambio en la viscosidad y/o tensión superficial del fluido sin embargo, el cambio en dichas propiedades no se determino experimentalmente.

Para mitigar este problema se optó por disminuir la succión generada por la purga del HPLC en el chip GAF. La succión original es de 5940 $\mu\text{L}/\text{h}$ que reduce el alto flujo de salida del HPLC de 6000 $\mu\text{L}/\text{h}$ a solo 60 $\mu\text{L}/\text{h}$. Sin embargo, conforme se modifica la composición de la fase móvil que sale del HPLC disminuyendo la proporción de agua presente en ésta se optó por disminuir la succión generada por la purga a 5640 $\mu\text{L}/\text{L}$, este valor se eligió ya que representaba la disminución mínima que permitía que las microgotas volvieran a generarse. En la figura 4-16 se muestran la comparación de las gráficas pertenecientes al programa de elución A5 y al programa de purga diseñado para este experimento.

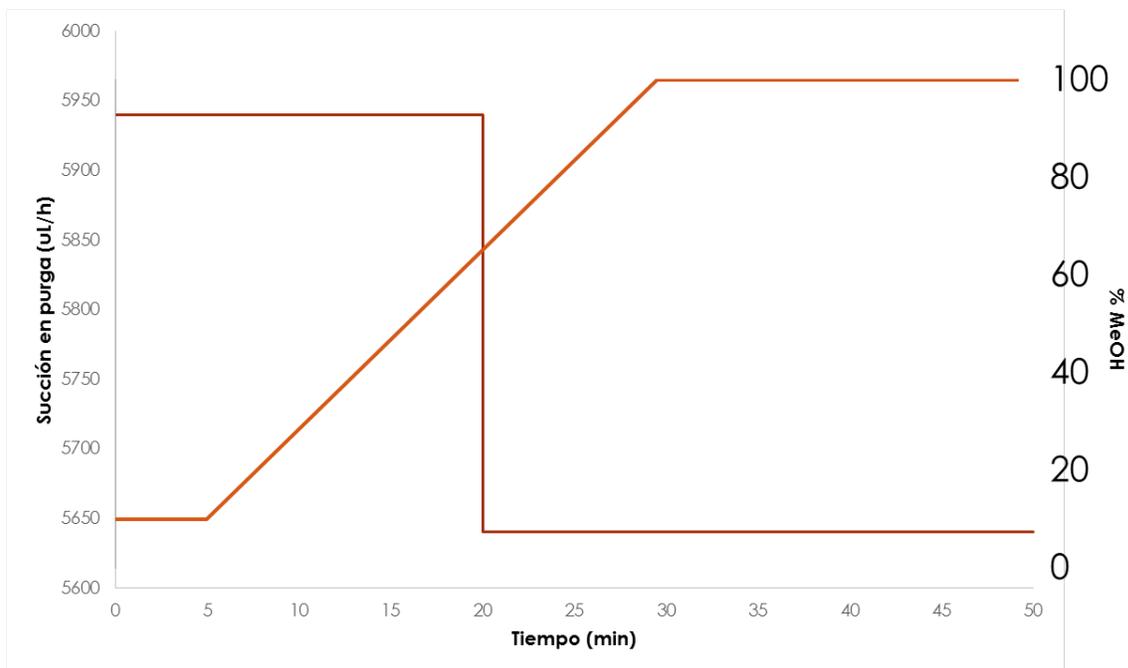


Figura 4- 16 Comparación entre el programa de elución A5 y el programa de purga. Al momento de llegar a una concentración del 60% de metanol en la fase móvil que está saliendo del HPLC se procede a disminuir la succión genera por la purga del chip GAF para compensar los cambios en las propiedades reológicas de las microgotas y así no detener la generación de microgotas durante todo el programa de elución A5.

La importancia de poder generar microgotas a diferentes concentraciones de metanol viene de la necesidad de no dejar de generar microgotas en ningún punto del programa de elución A5. Si se dejara de generar microgotas a concentraciones por encima del 60 % de metanol y existiera algún compuesto de interés que eluye a tales condiciones no podría ser almacenado en las microgotas. Por otra parte, se determinó que aún empleando este flujo menor en la fase fluorada, la generación de microgotas a concentraciones cercanas al 100% (composición real de la microgotas cercana al 50 % de MeOH) no es posible (figura 4-17).

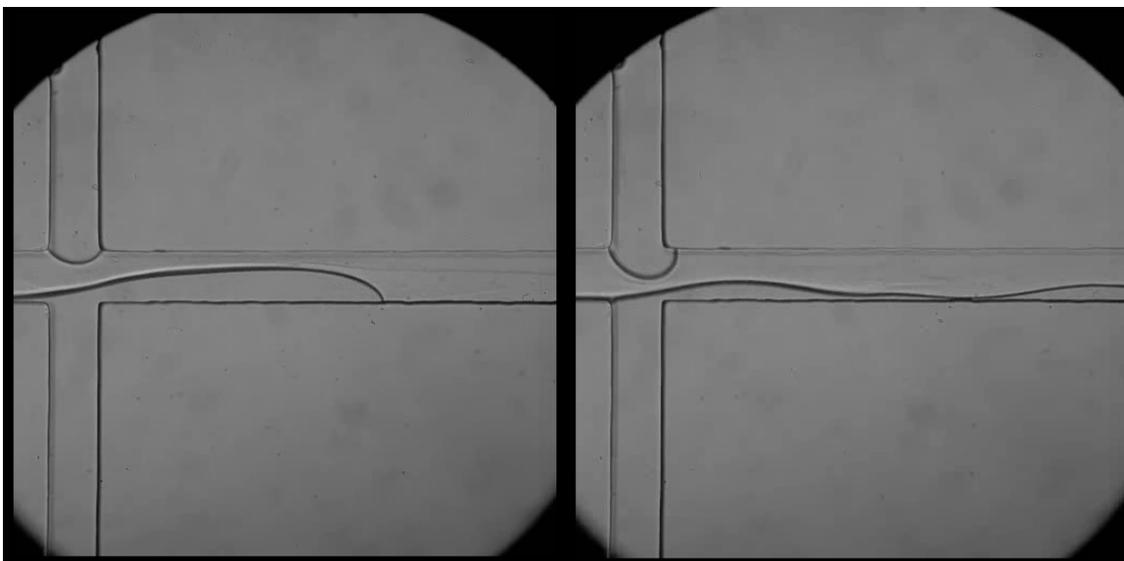


Figura 4- 17 Fotografías de la “T” de formación de microgotas del chip GAF cuando se tienen concentraciones próximas al 50% de MeOH en la fase proveniente del HPLC. Aun cuando se modifica el flujo de la fase continua y la succión generada por la purga se incrementa, no es posible reestablecer la formación de microgotas. Se identifica como responsable de esta falla en el funcionamiento del microchip a la composición de la fase proveniente del HPLC.

4.2.2 Transferencia de microgotas.

La transferencia de microgotas de un microdispositivo a otro es un requisito imprescindible cuando se desean realizar ensayos biológicos. Esto debido a que no siempre es posible generar y almacenar dentro del mismo microchip la totalidad de las gotas generadas. Al ser así, es necesario transferir las microgotas a un recipiente que permita su almacenamiento y luego a otro microchip que permita su análisis. Un tensoactivo que permita la generación de emulsiones que puedan ser transferidas de un dispositivo a otro en varias ocasiones es de gran interés.

La transferencia de las microgotas formadas en el aceite FH7500 con Krytox al 1.8% m/m no fue posible debido a que una vez que las microgotas salían del chip generador estas se fusionan o coalescen dentro de la tubería de PTFE. (Figura 4-18 y 4-19).

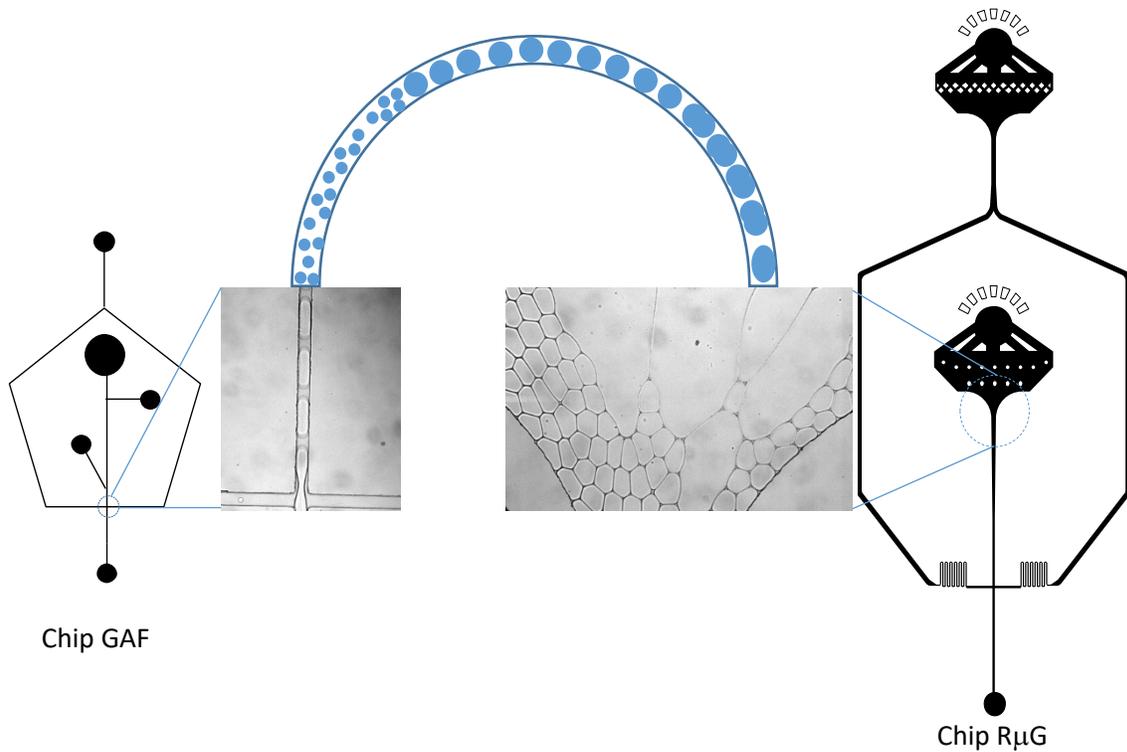


Figura 4- 18 Experimentos de transferencia de microgotas realizados empleando como fase continua una disolución de tensoactivo Krytox al 1.8 % m/m en aceite FH7500. La formación de las gotas se lleva a cabo en el chip GAF (izquierda), mientras nuevas gotas se generan estas son forzadas a desplazarse por un segmento de tubería PTFE de 15 cm. Al observar la cámara del chip R μ G se observa que las microgotas han coalescido en su gran mayoría (derecha).

Las microgotas generadas no soportaban el esfuerzo mecánico al que se encontraban sometidas y al observar en la cámara principal del chip R μ G era apreciable la desaparición (coalescencia) de la emulsión.

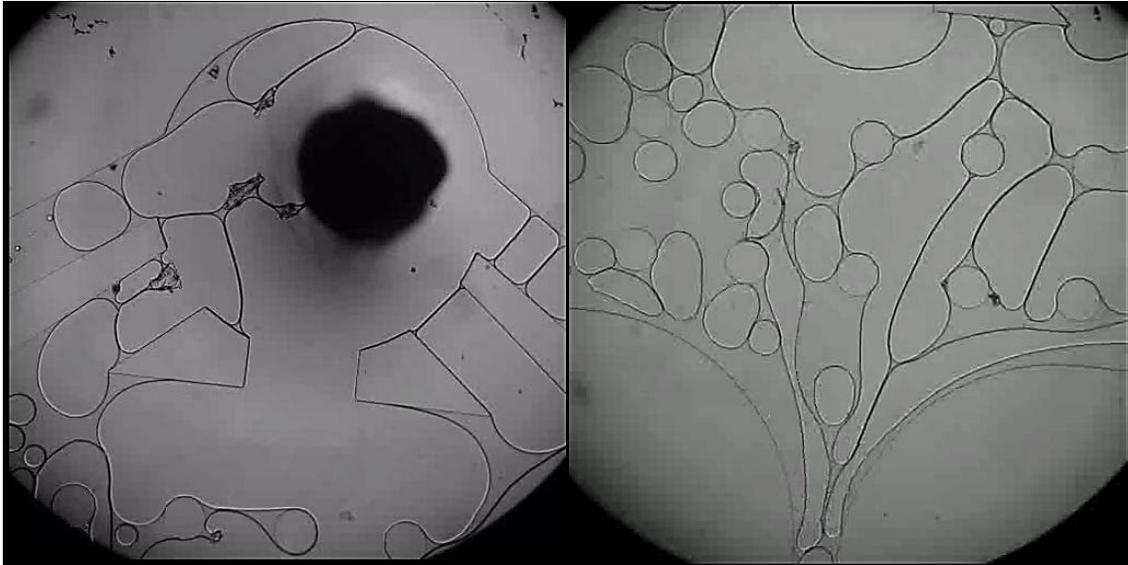


Figura 4- 19 Fotografías tomadas de la cámara principal del chip $R_{\mu}G$ en dos diferentes experimentos de reintroducción de la emulsión generada empleando como fase continua una disolución de tensoactivo Krytox al 1.8 % m/m.

A partir de este resultado se optó por abandonar el uso de solamente Krytox en el aceite fluorado en futuras pruebas, principalmente debido a la necesidad de la preservación de la emulsión una vez que ha viajado a través del segmento de la tubería PTFE para ser almacenado.

De igual manera la generación de microgotas que contuvieran microorganismos se abandona ya que para poder llevar a cabo ensayos de viabilidad celular es imprescindible que la emulsión presente la capacidad de ser almacenada, transportada e incubada.

4.3 Estabilidad de emulsión: Krytox+Jeffamina / FH7500.

Se ha reportado en la literatura que una manera sencilla de aumentar la estabilidad de las emulsiones de agua en aceite fluorado empleando el tensoactivo Krytox es a partir de la adición de una cantidad equimolar de una PEG-amina como lo es la poliéterdiamina Jeffamina.²⁹ La estabilidad de la emulsión se da a partir de las interacciones electrostáticas que se presentan en la interfase de las microgotas entre la cabeza cargada negativamente del tensoactivo Krytox ($R-COO^-$) con una de las dos cabezas cargadas positivamente de la Jeffamina ($R'-NH_4^+$). Al ocurrir dicha interacción en la interfase de la microgota se obtiene un aumento en la

estabilidad de la emulsión tanto en el cambio de composición que soporta esta nueva emulsión, como en la estabilidad ante esfuerzos mecánicos. En la figura 4-20 se presenta una figura que explica como ocurre la estabilización de la emulsión gracias a las interacciones electrostáticas.¹⁷

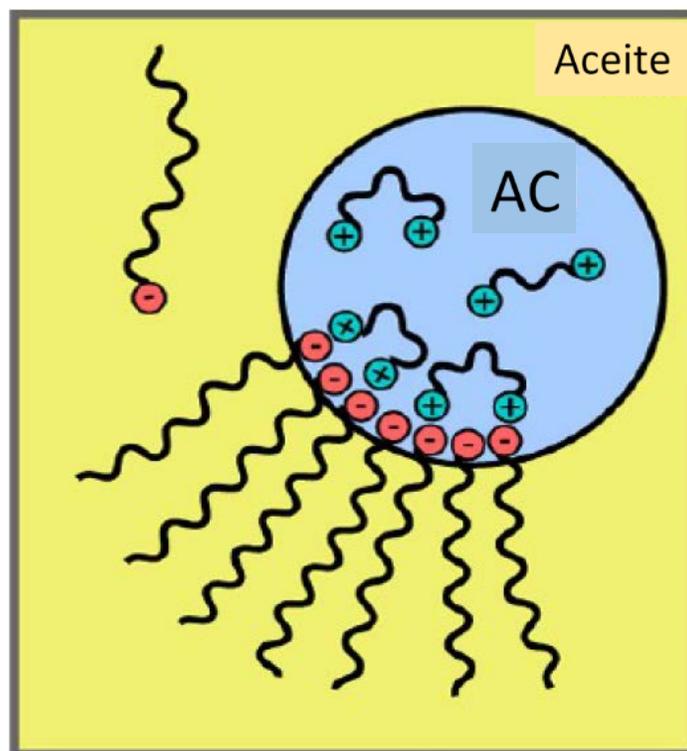


Figura 4- 20 Las interacciones electrostáticas que se presentan en la interfase de las microgotas entre la cabeza polar del tensoactivo Krytox (cargada negativamente) y las cabezas polares de la Jeffamina (cargadas positivamente) aumentan la estabilidad de la emulsión significativamente. Tomado y modificado de referencia 17.

4.3.1 Generación de microgotas con un gradiente de MeOH.

Se evaluó la capacidad de esta mezcla de Krytox+Jeffamina para generar una emulsión que fuera estable cuando la composición de su interior cambiaba gradualmente de 100% agua a 100% metanol de acuerdo con el gradiente establecido por el programa de elución A5.

Los resultados obtenidos empleando esta mezcla de compuestos revelaron que la formación de microgotas ya no se veía limitada por el cambio en la composición de la fase móvil proveniente del HPLC, ni siquiera a concentraciones del 50% en el interior de las gotas (100% en el HPLC).

Sin embargo, para que la formación de microgotas no se viera interrumpida se determinó que debía reducirse la succión realizada por la purga al llegar a un 60 % de MeOH en la composición de la fase móvil, tal como se había observado en los experimentos con solo Krytox (Fig. 4-16. Secc.4.2.1).

Estos resultados suponen un avance considerable en comparación con los obtenidos empleando el tensoactivo Krytox. La capacidad de mejorar el desempeño de la emulsión generada a partir de la adición de la Jeffamina es realmente positiva debido a la facilidad con la que la emulsión se forma.

4.3.2 Transferencia de microgotas.

La capacidad de esta emulsión para ser transportada por un segmento de tubería PTFE de 15 cm de longitud también fue retada. A diferencia de la emulsión generada empleando únicamente el tensoactivo Krytox se encontró que la mezcla Krytox-Jeffamina permitía la transferencia de la emulsión de un chip a otro (Figura 4-21).

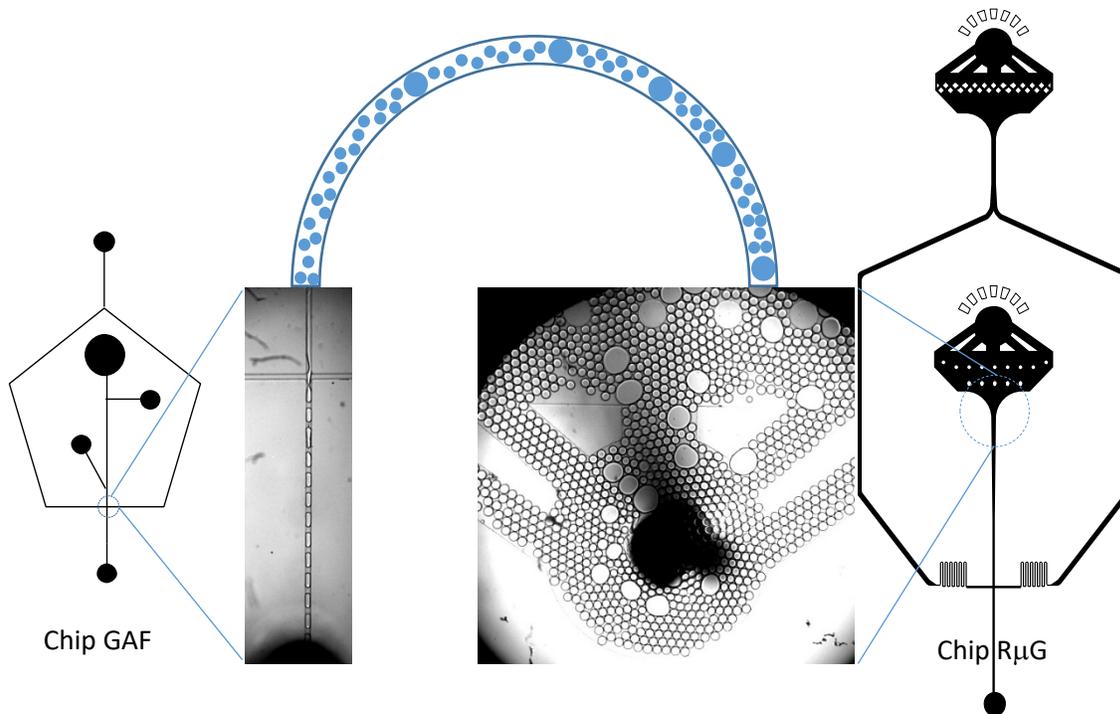


Figura 4- 21 Experimentos de transferencia de microgotas empleando como fase continua una disolución de tensoactivo Krytox (3.6 % m/m) en aceite FH7500 y como fase discontinua una solución agua-metanol con Jeffamina (1.8%). La formación de las gotas se lleva a cabo en el chip GAF (izquierda) en un intervalo de composición al interior de las microgotas del 5-50% de metanol. Al ser un sistema en flujo continuo, las gotas son forzadas por las nuevas a desplazarse por un segmento de tubería PTFE de 15 cm. Al observar la cámara principal de los dispositivos R μ G (derecha) se observó que algunas de las microgotas han coalescido, sin embargo, una gran mayoría permaneció inalteradas (derecha).

Se observó también que existía un fenómeno de coalescencia que no era posible de controlar. A este fenómeno se le denominó frente coalescente y consiste en la generación de una gota de gran tamaño que se genera a partir de algunas microgotas que no soportan el esfuerzo mecánico al momento de ser transferido y se fusionan. Este frente coalescente es responsable de la polidispersidad en el tamaño de las microgotas reintroducidas. Se encontró una relación entre la aparición del frente coalescente con el de la longitud de la tubería PTFE ya que a menor longitud este fenómeno tiende a presentarse con menor impacto y a longitudes mayores tiende a incrementarse.

El frente coalescente se puede explicar como un fenómeno que solo le ocurre a aquellas poblaciones de microgotas que se ven sometidas a un esfuerzo mecánico mayor durante su trayecto entre un microdispositivo a otro. El esfuerzo produce que las gotas se vean forzadas a coalescer y generar una microgota de mayor tamaño respecto a la mayoría de las microgotas que están viajando, la fuerza a la que se ven sometidas las de menor tamaño se ve amortiguada por la generación de gotas grandes, permitiendo así que no todas las microgotas se fusionen (figura 4-22). La aparición del frente coalescente en los experimentos de transferencia no supone un problema para la realización de los experimentos posteriores que sea considerable cualitativamente (figura 4-23).

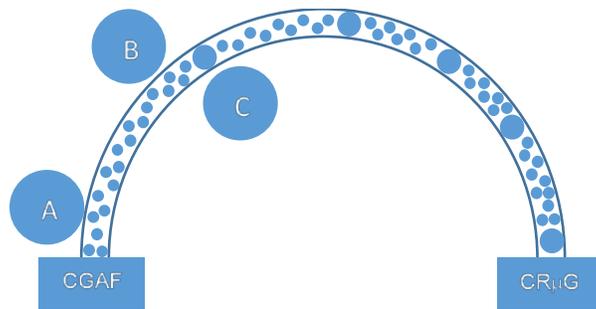


Figura 4- 22 Diagrama de la trasferencia de microgotas del chip GAF al chip R μ G por medio de un segmento de tubería PTFE empleando la fase continua Krytox/Jeffamina. A) Microgotas siendo transferidas sin presencia de coalescencia. B) Microgotas aglomerándose (izquierda) que darán lugar a gotas de mayor tamaño (coalescen). C) Frente coalescente.

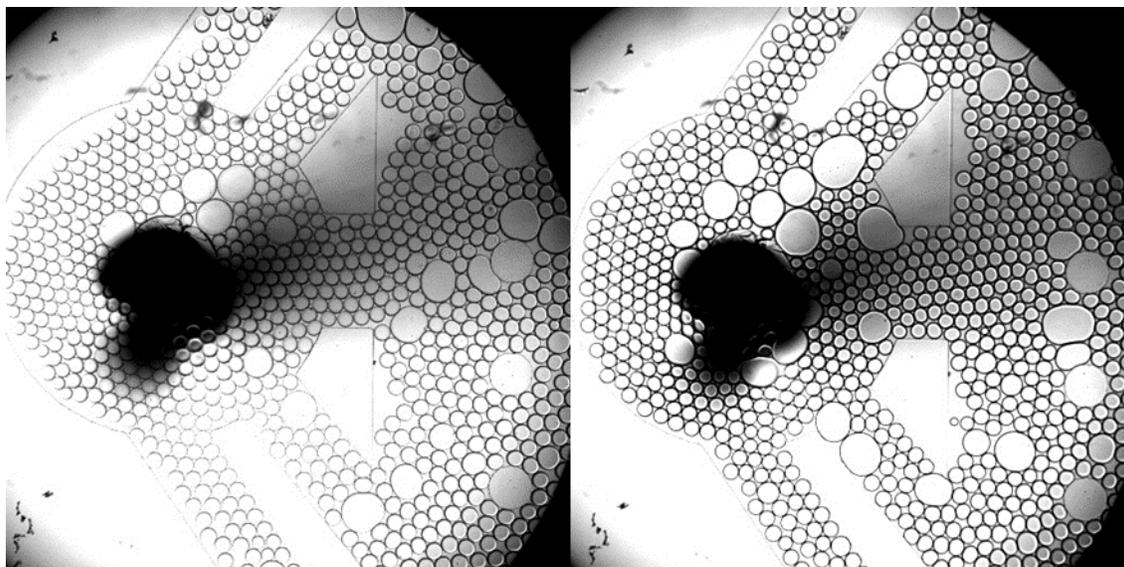


Figura 4- 23 Comparación de la reintroducción de microgotas que presentan una concentración de MeOH diferente. Las microgotas que presentan solo un 5% de MeOH en su interior (Izquierda) presentan el mismo problema de frente coalescente que las microgotas que presentan el 50% de MeOH. Por lo que se determinó que el frente coalescente no depende del cambio en la composición al interior de la microgotas.

4.3.3 Almacenamiento de microgotas.

La capacidad de la emulsión generada con Krytox y Jeffamina de ser transferida de un chip a otro permitió llevar a cabo la evaluación de su estabilidad a ser almacenada por un periodo aproximado de una hora fuera del chip. Se removió el segmento de tubería PTFE que conecta a ambos chips y se sellaron los extremos abiertos con parafilm para resguardar la emulsión. Una vez que concluyó el tiempo de incubación de una hora, se reintrodujo la emulsión al chip R μ G y se observó en la cámara principal del chip R μ G la integridad de la emulsión (figura 4-24).

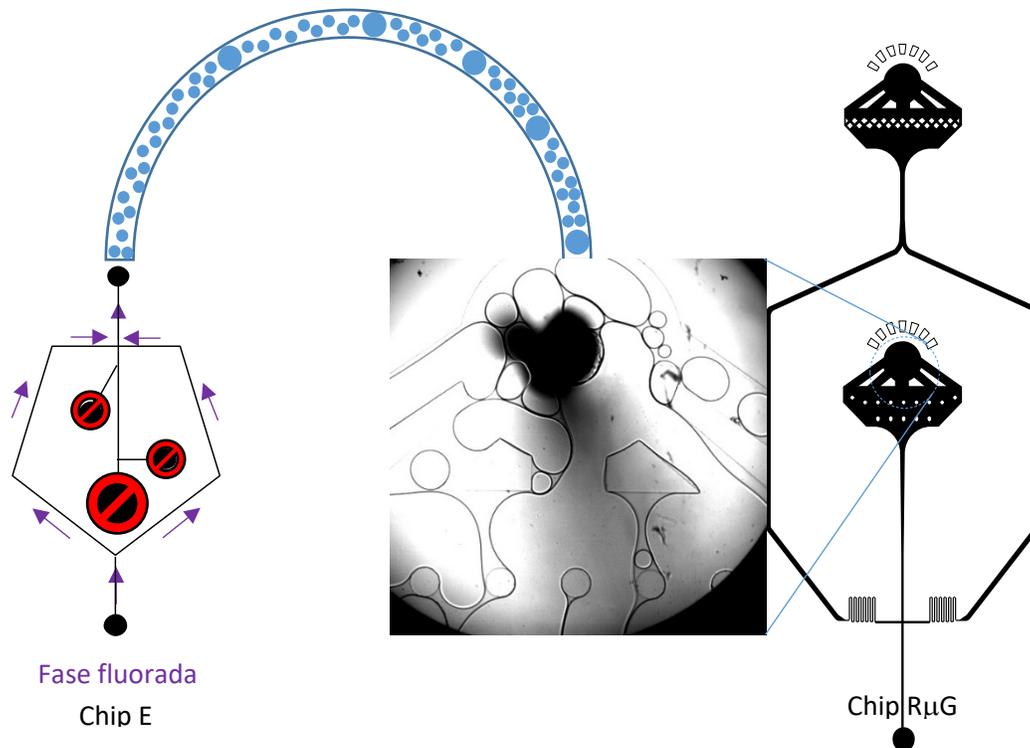


Figura 4- 24 Diagrama de la reintroducción de microgotas que se incubaron fuera del chip (off-chip) empleando una versión modificada del chip GAF denominada chip E que permite la reintroducción de la emulsión al chip R μ G mediante el flujo de fase fluorada en la tubería PTFE que empuja la emulsión sin alterarla.

A partir de estos experimentos se determinó que la fase continua formada por el tensoactivo Krytox/Jeffamina no permitió almacenar la emulsión de forma estable por periodos de una hora, ya que al ser reintroducida se observó la coalescencia casi completa de las microgotas.

La coalescencia de la emulsión se asocia al esfuerzo mecánico que se ejerce para remover el segmento de tubería PTFE de los microchips. Es a partir de este momento que se observa un aumento en la coalescencia de las gotas y que se magnifica con el tiempo de almacenamiento. Lo poco favorable de los resultados obtenidos en estos experimentos evidencian la poca utilidad de la mezcla para futuros experimentos en dónde se busca que no exista coalescencia por lo que se descarta su uso en experimentos posteriores.

4.4 Estabilidad de la emulsión: PFPE-PEG-PFPE / FH7500.

La necesidad de encontrar un tensoactivo que permitiera la generación de microgotas que pudieran ser almacenadas en segmentos de tubería PTFE por un intervalo de tiempo mínimo de una hora sin que se presentara coalescencia llevó a la síntesis de un tensoactivo fluorado tipo PFPE-PEG-PFPE referido en una publicación de Holtze, C. et al, *Lab Chip* **2008**, 8 (10), 1632. Las propiedades observadas en las microgotas generadas empleando este tensoactivo que se sintetizó superan a las que presentan las microgotas generadas cuando se emplea únicamente el tensoactivo Krytox y la mezcla de este con Jeffamina.^{7,29}

4.4.1 Generación de microgotas con un gradiente de MeOH utilizando el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE.

Al igual que con las otras fases continuas, la primera serie de experimentos a los que se sometió el tensoactivo sintetizado (2 % m/m en FH7500) fue probar su capacidad para generar microgotas con diferentes concentraciones de MeOH. Como se muestra en la tabla 4-5 la fase continua empleada no presentó ninguna dificultad para generar microgotas a diferentes concentraciones de metanol.

Tabla 4-5 Condiciones de los experimentos de formación de microgotas con el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE

| % MeOH en HPLC (v/v) | % MeOH en μgotas (v/v) | ΦPurga (μL/h) | ΦHPLC (μL/h) | ΦBacterias (μL/h) | ΦFase fluorada (μL/h) | Generación de μgotas |
|----------------------|------------------------|---------------|--------------|-------------------|-----------------------|----------------------|
| 10 | 5 | 5940 | 60 | 60 | 150 | Sí |
| 20 | 10 | | | | | |
| 30 | 15 | | | | | |
| 40 | 20 | | | | | |
| 50 | 25 | | | | | |
| 60 | 30 | 5640 | 360 | | | |
| 70 | 35 | | | | | |
| 80 | 40 | | | | | |
| 90 | 45 | | | | | |
| 100 | 50 | | | | | |

Los experimentos realizados con el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE arrojaron información que ayuda a corroborar la hipótesis del cambio en la composición que sufren las microgotas cuando se llega a una concentración de MeOH del 60%

en el HPLC (30 % en las gotas). Se asume como causa más probable que el aumento de MeOH al interior de las microgotas produce un cambio en la tensión superficial y/o viscosidad de éstas, volviendo necesario disminuir la succión que se ejerce en la purga del microchip y así lograr que no se interrumpa la generación de las microgotas en el chip GAF.

Se observó en algunos experimentos que la generación de microgotas se podía llevar a cabo sin la necesidad de disminuir la succión generada por la purga sin embargo estos resultados no eran reproducibles en todos los ensayos realizados por lo que se optó por la disminución de la succión generada en la purga del microchip en los experimentos posteriores. Estos resultados son comparables con los obtenidos empleando como fase continua la combinación del tensoactivo Krytox con Jeffamina.

4.4.2 Transferencia de microgotas utilizando el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE.

Una vez que se comprobó que la generación de la microgotas era posible a diferentes concentraciones de MeOH, se llevaron a cabo los experimentos de transferencia de la emulsión a través de un segmento de tubería PTFE de 15 cm de longitud como se ilustra en la figura 4-25.

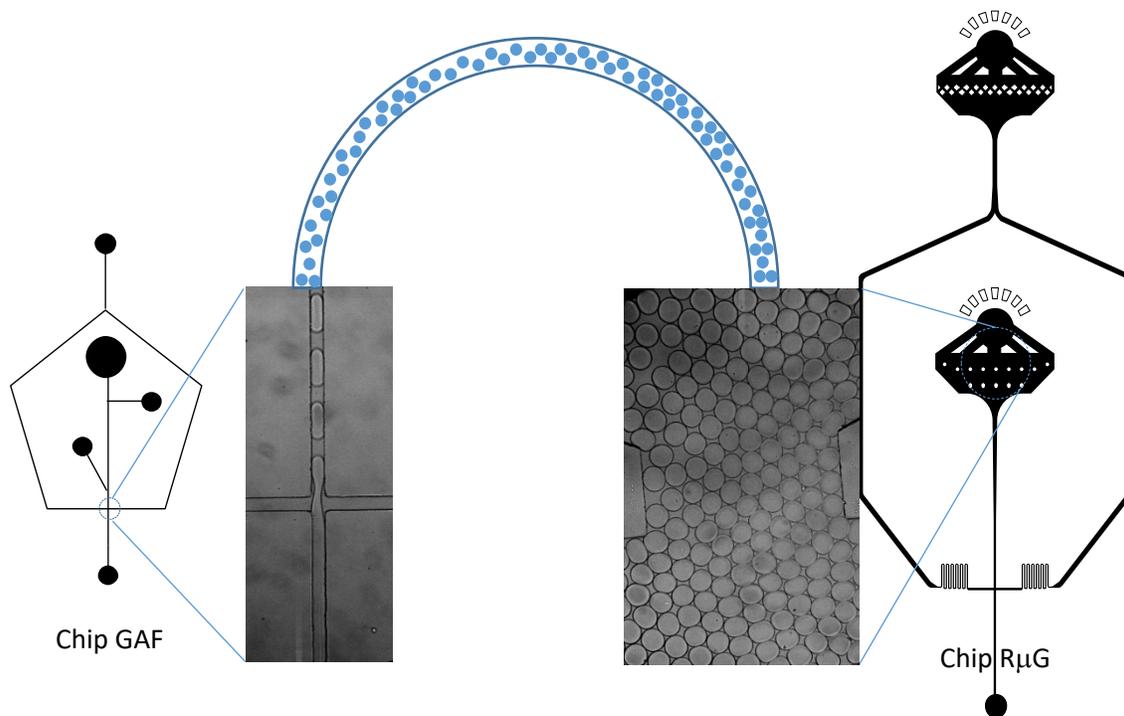


Figura 4- 25 Esquema de los experimentos de transferencia de microgotas realizados empleando como fase continua una disolución de tensoactivo PFPE-PEG-PFPE (2 % m/m). La formación de las gotas se lleva a cabo en el chip GAF (izquierda) en un intervalo de composición al interior de las microgotas del 5-50% de metanol. Las gotas generadas fueron forzadas a desplazarse por un segmento de tubería PTFE de 15 cm por las gotas que se iban formando. Al observar la cámara del chip R μ G se observa que no hay microgotas que hayan coalescido (derecha).

Además de la capacidad de las microgotas de ser transferidas de un chip a otro no se observa la aparición de un frente coalescente, lo que indica un aumento en la estabilidad de la emulsión en comparación con las dos anteriores. Además, como se muestra en la figura 4-26, se aprecia que este aumento en la estabilidad de la emulsión es consistente debido a que incluso soportan la compresión que se genera de las microgotas a medida que viajan a través del chip R μ G.

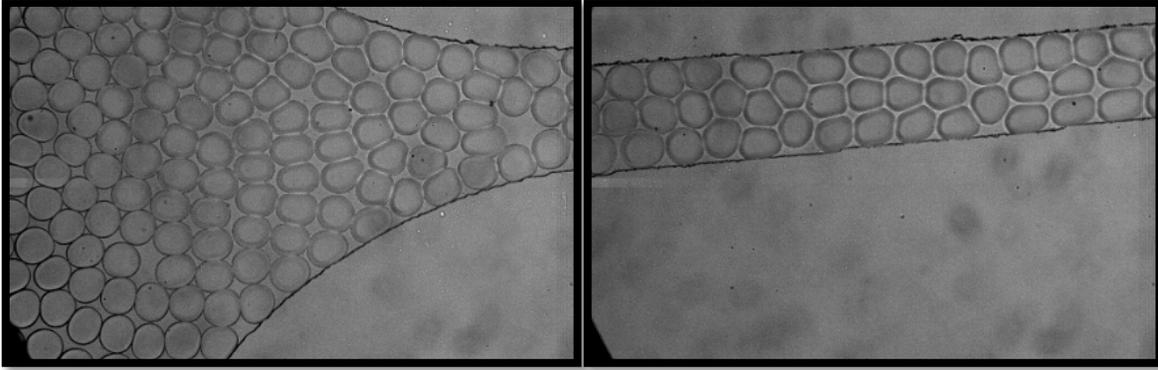


Figura 4- 26 Comparación de la reintroducción de microgotas que viajan a diferentes longitudes de los canales del chip $R_{\mu}G$. En la primera imagen (izquierda) se observa cómo se empaquetan las microgotas saliendo de la cámara principal del chip $R_{\mu}G$ y como éstas se compactan a medida que la longitud del canal va disminuyendo (derecha). Esto demuestra un aumento en la estabilidad de la emulsión en comparación con la generada con el tensoactivo Krytox y Krytox/Jeffamina ya que esto no se había observado en dichos experimentos.

A partir de los resultados obtenidos en dónde se observa que la emulsión generada empleando el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE es capaz de transferirse de un microdispositivo a otro sin la presencia de coalescencia, se procedió a evaluar la estabilidad de las microgotas al ser almacenadas e incubadas fuera de los chips.

4.4.3 Almacenamiento de microgotas.

La estabilidad de las microgotas se evaluó al reintroducirlas en el chip $R_{\mu}G$ después de haber sido almacenadas por una hora en segmentos de tubería PTFE de 15 cm de largo. Como se ve en la figura 4-25 y 4-26, las microgotas se conservaron íntegras. Entonces, se probaron tiempos de incubación más largos: 12 h, 24 h, 72 h y 168 h (7 días). La emulsión reintroducida a las 12 horas no presentó coalescencia importante (aproximadamente del 1%) ya que se observan pocas gotas de mayor tamaño respecto a la mayoría. Los resultados obtenidos a las 24 horas son parecidos (aproximadamente 2%). Para los experimentos en donde se dejó incubando la emulsión por 72 horas se observó hasta de un 10% de coalescencia y en los experimentos de 168 horas se observó un aumento en la coalescencia de hasta un 20% aproximadamente. El porcentaje de coalescencia se calculó a partir del número de gotas de mayor tamaño observadas por cada 5 microgotas de tamaño normal.

4.5 Caracterización de un sistema de dispositivos de microfluídica acoplados a un equipo de HPLC empleando un compuesto fluorescente como marcador.

Al comprobarse que las microgotas formadas con el tensoactivo PFPE-PEG-PFPE tenían la estabilidad adecuada para contener porcentajes altos de metanol y ser transferidas entre dispositivos y no coalescer en más de un 10% después de ser almacenadas en tuberías hasta por un plazo de 72 horas, se diseñó un sistema de microfluídica que pudiera encapsular en microgotas los compuestos separados en la columna del HPLC y después transferir, almacenar y analizar por fluorescencia estas gotas cargadas (Figura 4-27).

Una parte importante a caracterizar en el sistema es el tiempo de residencia que presentan las gotas con cierto compuesto químico en cada sección. Se denomina tiempo de residencia al tiempo que comprende desde la introducción de cierto analito a uno de los dispositivos y/o sección de estos hasta que el analito ya no se encuentra presente en dicho dispositivo y/o sección. La relevancia de la determinación del tiempo de residencia que presenta un analito durante su trayecto en el sistema viene dada por la capacidad de predecir el momento en el cual una población de microgotas que tiene en su interior un analito de interés, se encuentra viajando en determinada sección y así poder estudiar esas gotas y saber de qué compuesto se trata.

Como se muestra en la figura 4-27 se determinaron cinco tiempos de residencia para el sistema de microfluídica. Para hacer esto se inyectó el compuesto fluorescente 4-metilumbeliferona (4MU) al equipo de HPLC y se monitoreó el tiempo que tardaba en recorrer cada uno de los dispositivos y tuberías que integran todo el sistema de microfluídica. Para ello se empleó un microscopio de fluorescencia.

El sistema inicia en un equipo de HPLC que separa los compuestos químicos. El tiempo de elución de la 4MU corresponde al tiempo en el cual eluye el compuesto de acuerdo al programa de elución A5 en el sistema cromatográfico. La detección en este punto se realiza por medio del detector UV/Vis del equipo HPLC. Posteriormente a la elución del compuesto y aprovechando la propiedad fluorescente que presenta,

se monitoreó el recorrido de la 4MU empleando un microscopio de fluorescencia (figura 4-27-**A**). Se registró el tiempo que tarda el compuesto en salir del HPLC y ser introducido en el chip GAF (figura 4-27-**B**). La detección en este punto se realizó por medio de la fluorescencia observada para el compuesto por medio del microscopio. Después, se registró el tiempo en el cual se deja de observar fluorescencia en el chip GAF y que se denomina como el tiempo que tarda en salir un compuesto del primer dispositivo de microfluídica ya encapsulado en microgotas (figura 4-27-**C**) denominado como: lapso fluorescencia GAF. Posteriormente, se midió el tiempo que tardaban en recorrer las microgotas un segmento de tubería PTFE de las siguientes longitudes: 15, 25, 35 y 50 cm. Este tiempo es importante ya que permite identificar la longitud de tubería óptima para almacenar en su totalidad aquella población de microgotas que contiene el analito de interés (figura 4-27-**D**). Finalmente se determinó el tiempo que tardaba el compuesto en llegar a la cámara principal del chip $R_{\mu}G$, este tiempo solo es relevante si se desea analizar las microgotas sin que se detenga el flujo en ningún punto del experimento, es decir, si no se retira el segmento de tubería PTFE para incubar las microgotas (figura 4-27-**E**).

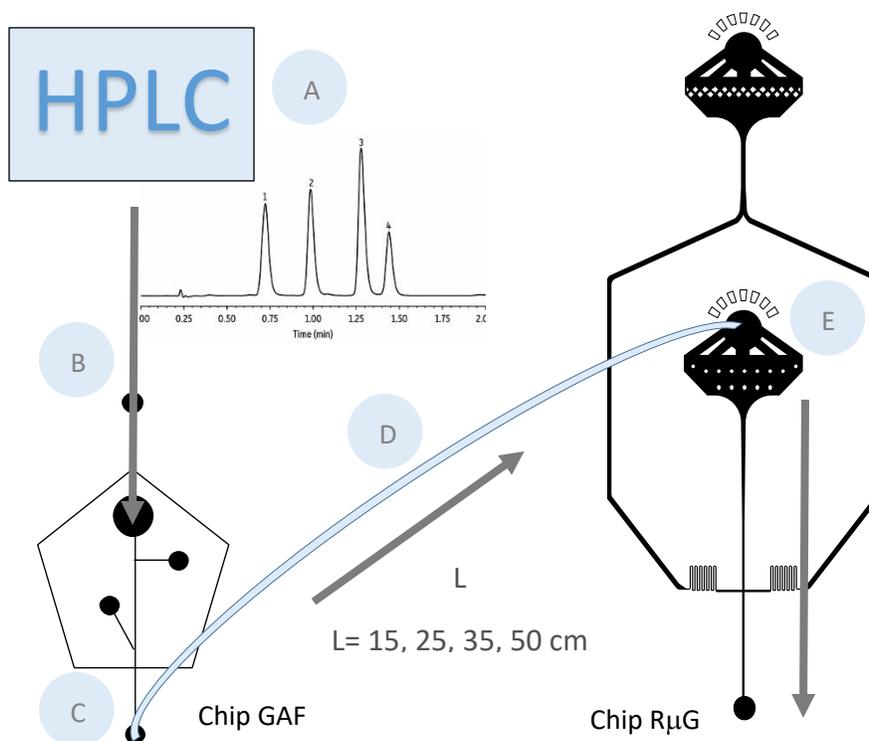


Figura 4- 27 A) Determinación del tiempo de retención del compuesto fluorescente en una columna de HPLC de acuerdo con el programa de elución A5. B) Tiempo que tarda un compuesto separado en el equipo de HPLC en ser introducido al chip GAF. C) Tiempo que tarda un compuesto que está siendo introducido en el chip GAF en ser completamente encapsulado en microgotas. D) Tiempo que tarda un compuesto encapsulado en microgotas en viajar a través de un segmento de tubería PTFE de 15, 25, 30 y 50 cm hasta llegar a ser detectado en el chip R μ G (tiempo de recorrido de tubería PTFE). E) Tiempo que transcurre desde la entrada de las microgotas con el compuesto fluorescente al chip R μ G y su detección en el canal de salida (tiempo de residencia de la emulsión en el chip R μ G).

4.5.1 Determinación del tiempo de elución de la 4MU en el HPLC.

La 4-metilumbeliferona (4MU) es un compuesto fluorescente cuando se encuentra en una disolución neutra o básica y se utilizó para caracterizar el sistema de microfluídica (figura 4-28).³⁰ Se inyectaron 20 μ L de una solución estándar de 4MU a 1600 μ M disuelta en una mezcla de disolución amortiguadora de fosfato a pH 7 y 10% de MeOH. Se estimó que la concentración media de 4MU en el flujo proveniente del equipo HPLC fue aproximadamente de 55 μ M a partir de la siguiente formula:

$$[4MU] = \frac{V_{inj} [Std_{4MU}]}{t_{4MU} \Phi_{HPLC} 1000 \frac{\mu L}{mL}}$$

En donde t_{4MU} es el tiempo de retención del compuesto (Figura 4-28) y “fi” HPLC es el flujo del HPLC (0.1 mL/min). Esta fórmula se generó a partir de la fórmula clásica de cálculo de la concentración de una dilución:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Después de despejar la concentración de la dilución generada por el HPLC (C_2) llegando al siguiente despeje:

$$C_2 = \frac{C_1 V_1}{V_2}$$

En donde C_1 es la concentración inicial de la disolución estándar de la 4MU (160 μM); V_1 es el volumen que se inyecta al equipo de HPLC de la disolución estándar de 4MU y finalmente V_2 se calcula a partir del flujo que se tiene en el equipo HPLC, así como por el tiempo de retención que presenta la 4MU.

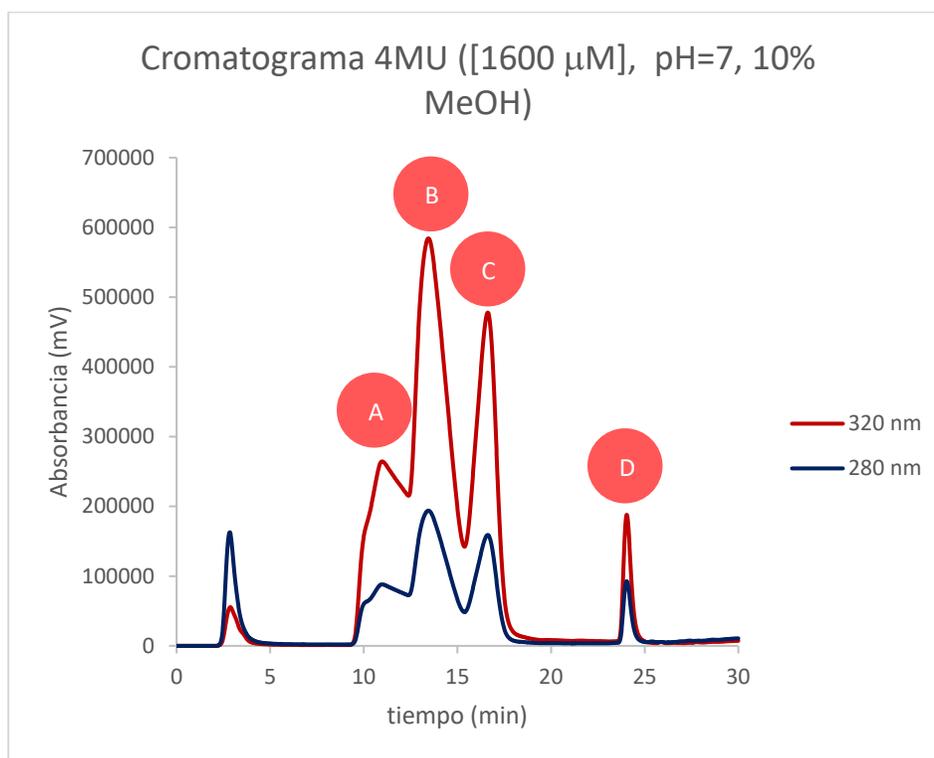


Figura 4- 28 Cromatograma obtenido para la 4MU disuelta en disolución amortiguadora de fosfatos pH= 7.0 con 10% de metanol. En este se observan cuatro picos correspondientes a diferentes especies protonadas de la 4MU³⁰. Los picos A-C son las especies predominantes en la disolución y presentan fluorescencia. A $t_r= 10.86$ min, B $t_r=13.37$ min, C $t_r= 16.71$ min. El pico D se trata de una impureza cuya identidad se desconoce.

4.5.2 Determinación del tiempo de traslado de la 4MU desde el HPLC hasta el chip GAF.

Se llevaron a cabo una serie de experimentos cuyo objetivo era determinar el tiempo que transcurría para que la 4MU detectada en el equipo de HPLC viajara por una tubería externa y fuera introducida en el primer microchip denominado GAF (Figura 4-29).

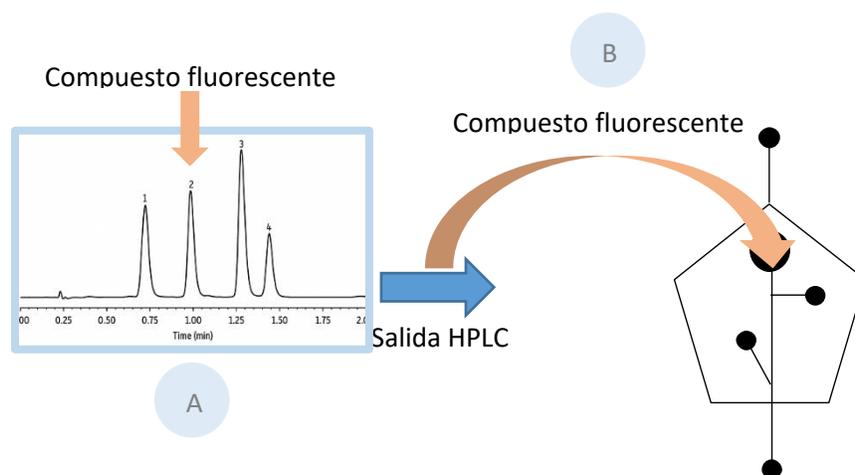


Figura 4- 29 Una vez que se determina el tiempo de retención de un compuesto fluorescente (A) se determinó el tiempo que tarda éste compuesto en salir del sistema HPLC viajar por una tubería y ser introducido en el chip GAF (B). Este tiempo se obtiene cuando se observa la presencia de fluorescencia en una de las entradas del chip GAF.

Se realizaron tres inyecciones de 4MU a las mismas condiciones y los resultados se presentan en la tabla 4-6.

Tabla 4-6 Resultados de los experimentos realizados para determinar el tiempo de introducción de un analito al chip GAF

| Tiempo de inicio de la detección de 4MU en HPLC (t_{dHPLC} ; min) | Tiempo de inicio de la detección de 4MU en chip GAF (t_{icGAF} ; min) | Tiempo de introducción de analitos al chip GAF ($t_{dHPLC}-t_{icGAF}$; min) |
|--|--|---|
| 9:30 | 10:52 | 1:22 |
| 9:23 | 10:51 | 1:28 |
| 9:12 | 10:32 | 1:20 |

El tiempo promedio que tardó la 4MU en viajar desde el equipo de HPLC hasta el chip GAF es de 1:23 minutos. Este tiempo se puede considerar constante para todos los analitos separados en el HPLC con una masa molar en el orden cercano a la de 4MU debido a que tendrían coeficientes de difusión parecidos.

4.5.3 Determinación de la difusión del pico de 4MU durante su trayecto: HPLC a la encapsulación en microgotas en chip GAF.

Además del tiempo de traslado del HPLC al chip GAF, se determinó el intervalo de tiempo que tarda un compuesto en eluir del equipo HPLC (ancho del pico cromatográfico) y el tiempo que tarda en ser segmentado en microgotas el fluido en el que viene el compuesto. Con esto es posible saber si se presenta una difusión significativa del analito a lo largo del recorrido (difusión de Taylor = dispersión de cualquier compuesto que se mueva en flujo continuo por una tubería). Lo anterior se puede determinar al comparar ambos tiempos. Si ambos tiempos son iguales se puede considerar que no existe difusión del analito. Por otra parte, si estos son diferentes se considera que existe difusión. Determinar si existe o no difusión del analito permite conocer si existe el riesgo de que los compuestos separados en el HPLC se puedan mezclar parcialmente al recorrer la tubería antes de ser encapsulados en las microgotas. La mezcla de analitos sería en detrimento del sistema ya que se desea medir la actividad de cada compuesto individualmente en el interior de las microgotas.

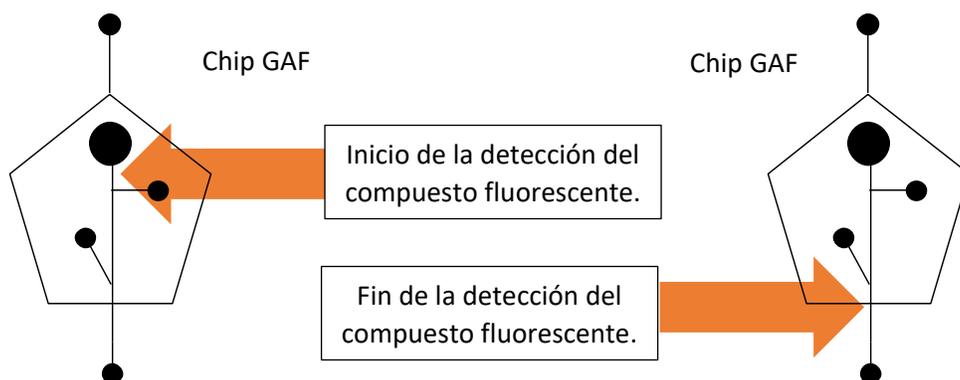


Figura 4- 30 La detección de la fluorescencia se realiza en la parte superior del chip GAF en el canal dónde se conecta la tubería de salida del equipo HPLC. Se toma el tiempo con cronómetro a partir de que se detecta la presencia de la fluorescencia en la parte superior del chip hasta que se deja de observar la última microgota formada con fluorescencia. Esta se observa en la base del pentágono del chip GAF en donde se intersecta el flujo de aceite fluorado y el flujo proveniente del HPLC, es en este momento cuando se detiene el cronómetro.

Como se muestra en la figura 4-30 se realizó una serie de experimentos en donde se determinó el tiempo total de residencia del compuesto fluorescente en el chip GAF y se determinó el ensanchamiento del pico cromatográfico. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4-7.

Tabla 4-7 Resultados de los experimentos de determinación del tiempo de residencia de un compuesto fluorescente

| Experimento | Tiempo de inicio de la detección UV (min) | Tiempo de final de la detección UV (min) | Tiempo de inicio de la detección de Fluorescencia (min) | Tiempo del final de la detección de Fluorescencia (min) | Diferencia entre los tiempos de detección UV-Fluorescencia (min) |
|-----------------|---|--|---|---|--|
| 1 | 09:12 | 20:31 | 10:35 | 22:34 | 00:40 |
| 2 | 09:18 | 19:18 | 10:41 | 21:14 | 00:33 |
| 3 | 09:15 | 19:48 | 10:38 | 21:47 | 00:36 |
| Promedio | 09:15 | 19:52 | 10:38 | 21:51 | 00:36 |

De acuerdo con los resultados de la tabla 4-7 un compuesto que es separado en el equipo de HPLC y es introducido al chip GAF se difunde durante su trayecto por la tubería de salida del equipo HPLC. El tiempo total de detección, que se considera como el tiempo que transcurre para la elución completa del compuesto en la columna cromatográfica y que corresponde a la base del pico cromatográfico, es menor al tiempo durante el cual se detecta la presencia de fluorescencia en el chip GAF. La fluorescencia solo puede provenir del compuesto que está siendo separado (4MU) por lo que se considera que el aumento en el tiempo durante el cual se detecta la presencia del compuesto fluorescente es de 36 segundos en promedio (Figura 4-31).

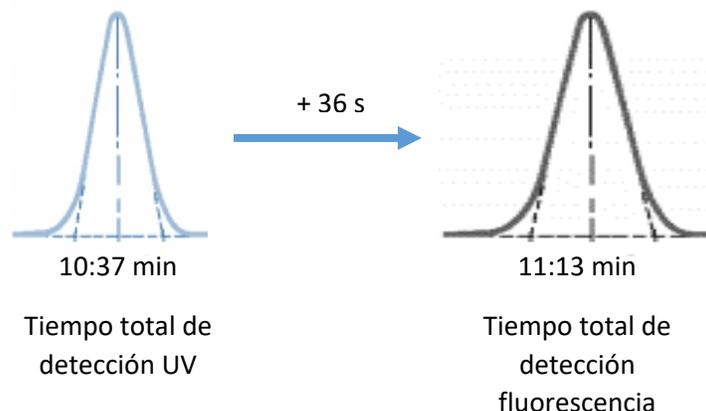


Figura 4- 31 Un compuesto que es separado en un equipo de HPLC presenta difusión en su camino hacia al chip GAF, esto se presume a partir del aumento en el tiempo total de detección de la señal de fluorescencia en comparación con el mismo tiempo observado en la señal UV.

El ensanchamiento del pico fue solo de un 6%. Este porcentaje se cálculo considernado el tiempo de elución en el HPLC 10:37 min (637 s) y el tiempo de detección de la fluorescencia en el chip GAF 11.13 min (673 s). Se considera que la difusión observada podría no afecta cuando se trabajan con mezclas sencillas en donde los componentes individuales tuvieran una separación mayor al aumento de 36 segundos.

4.5.4 Determinación de la longitud óptima de tubería PTFE para contener una población particular de microgotas.

Una vez que se determinó el tiempo que tarda un compuesto que es separado en el equipo de HPLC en ser introducido al chip GAF y salir de este encapsulado en microgotas, se procedió entonces con la determinación de cuál debería ser la longitud apropiada de un segmento de tubería PTFE para almacenar toda la población de microgotas en dónde quedó encapsulado el compuesto fluorescente. Para esto se probaron cuatro longitudes diferentes de tubería PTFE: 15, 25, 35 y 50 cm y se midió el tiempo que tardaban en recorrer las microgotas los segmentos de tubería PTFE. El tiempo se comenzaba a medir cuando las últimas gotas fluorescentes se introducían a la tubería PTFE (a la salida del chip GAF) y se dejaba de medir cuando se observaba en la cámara principal del chip R_μG la presencia de las primeras gotas fluorescentes.

Para poder determinar la longitud mínima para almacenar todas las microgotas fluorescentes, se pensó que sería aquella en dónde se observara un tiempo de recorrido al menos igual o de preferencia mayor al tiempo de encapsulación del compuesto fluorescente en el primer microchip (Chip R μ G). Los tiempos de recorridos del tren de gotas por las diferentes tuberías se resumen en la tabla 4-8.

Tabla 4-8 Resultados de los experimentos de tiempo de recorrido de la emulsión

| Longitud (cm) | Tiempo de salida del chip GAF (min) | Tiempo de reintroducción de las microgotas con 4MU en el chip R μ G(min) | Tiempo de recorrido (min) |
|---------------|-------------------------------------|--|---------------------------|
| 15 | 21:51 | 28:01 | 6:10 |
| 25 | 21:51 | 28:51 | 7:00 |
| 35 | 21:51 | 36:03 | 14:12 |
| 50 | 21:51 | 49:11 | 27:20 |

Con los resultados obtenidos se pudo determinar que de acuerdo con el tiempo de recorrido que presentaba la 4MU, la mínima longitud de tubería PTFE apropiada para utilizar en los experimentos posteriores de almacenamiento de las microgotas era la de 35 cm. Esto dado que el tiempo total en el cual se logran encapsular la 4MU en microgotas es de 11:13 minutos (Figura 4-32) y que el tiempo de recorrido para estas gotas en la tubería de 35 cm es de 14:12 minutos. Por esta razón se optó por emplear esta longitud en los experimentos posteriores.

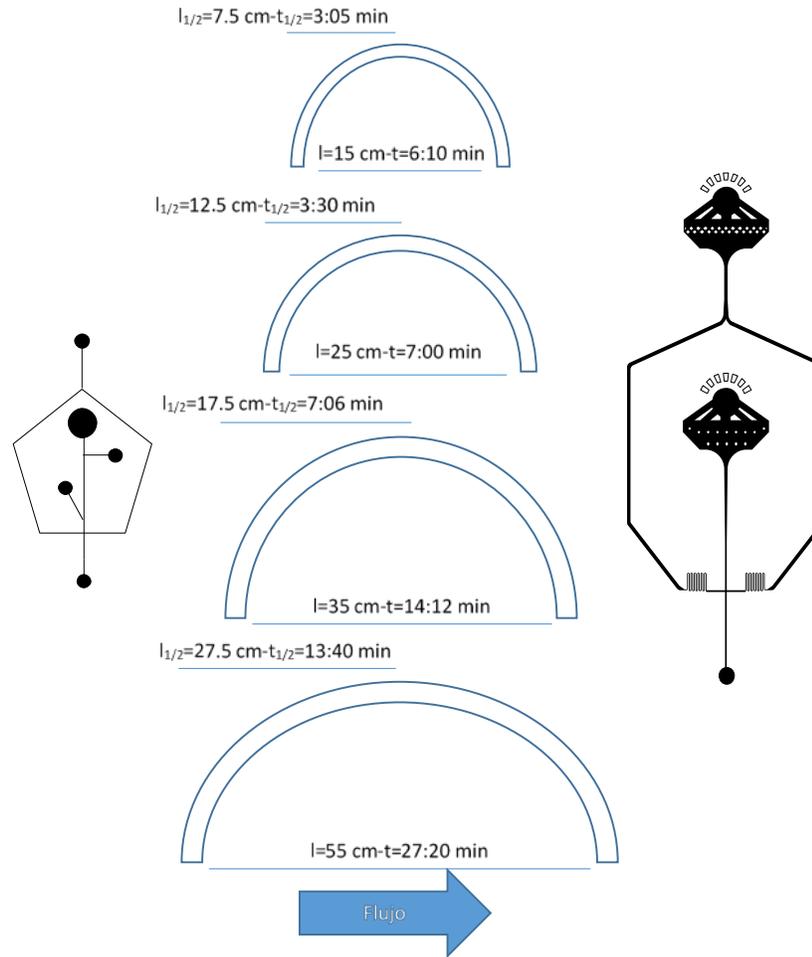


Figura 4- 32 Se experimentó con longitudes de tubería PTFE para encontrar aquella que pudiera almacenar a las microgotas donde se observa fluorescencia para ser analizadas posterior a su incubación.

4.5.5 Determinación del tiempo de residencia de la 4MU en el chip R μ G.

Posterior a los experimentos en donde se determinó el tiempo que tardaba en recorrer la emulsión fluorescente un segmento de tubería PTFE, se continuó con la determinación del tiempo de residencia de las gotas en el chip R μ G. La importancia de la determinación de este tiempo es el conocer cuál es la ventana que se tiene para tomar fotografías a las microgotas mientras están siendo introducidas al chip R μ G para así poder ser analizadas.

El tiempo de residencia se determina de manera similar a como se realizó la determinación del tiempo de residencia de la 4MU en el chip GAF. Se monitoreó la entrada del chip R μ G empleando el microscopio de fluorescencia y se cronometró el tiempo a partir de que se detecta la introducción de las primeras microgotas

fluorescentes hasta el momento en el que ya no se observa ninguna de estas en la cámara principal del chip como se muestra en la figura 4-33. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4-9.

Tabla 4-9 Resultados de los experimentos de determinación del tiempo de residencia de la emulsión en el chip R μ G

| Tiempo de inicio de detección de fluorescencia. (s) | Tiempo de final de detección de fluorescencia. (s) | Tiempo de residencia. (s) |
|---|--|---------------------------|
| 1055.50 | 1533.75 | 478.25 |

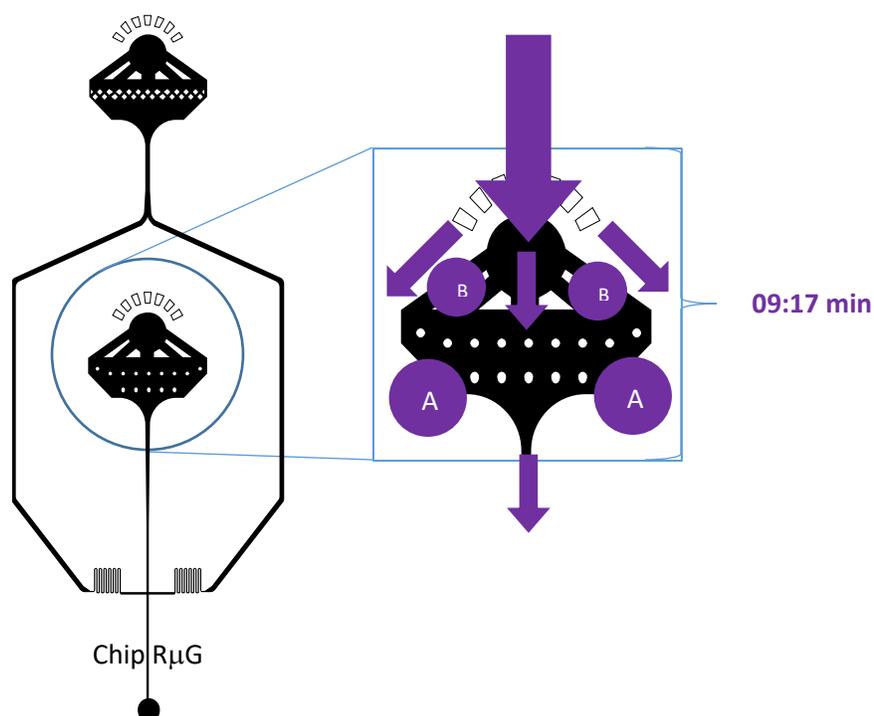


Figura 4- 33 La obtención del tiempo de residencia de las microgotas fluorescentes en el chip R μ G se realiza introduciendo la emulsión que se genera en el chip GAF y se almacenó en el tubo de PTFE de 35 cm. Se observa que la emulsión fluye en tres direcciones diferentes ilustradas por las flechas moradas en la imagen. Sin embargo, en las secciones A y B suelen depositarse las microgotas facilitando su análisis. Manteniendo el flujo generado por el chip GAF (270-570 μ L/h; flujos correspondientes a la fase acuosa) no queda ninguna microgota fluorescente después de 9:17 minutos en promedio.

4.5.9 Difusión de analitos encapsulados en microgotas.

Adicionalmente a los experimentos de caracterización del sistema de microfluídica se encontró que la estabilidad de la emulsión permitía que no existiera intercambio aparente entre los analitos contenidos en las microgotas. Esto se determinó al

observar bajo la luz de la lámpara de fluorescencia la emulsión contenida e incubada en diferentes segmentos de tubería PTFE. Al iluminar diversas secciones de tubería se observó que solo las secciones en dónde se encontraba la población de microgotas que contenía 4MU tenían fluorescencia, mientras que las secciones en donde había microgotas que no contenían la 4MU, no presentaban fluorescencia (figura 4-34 y 4-35). También, al incubar y observar gotas con y sin 4MU en la cámara principal del chip R μ G, no se observó incremento de la fluorescencia en las segundas.

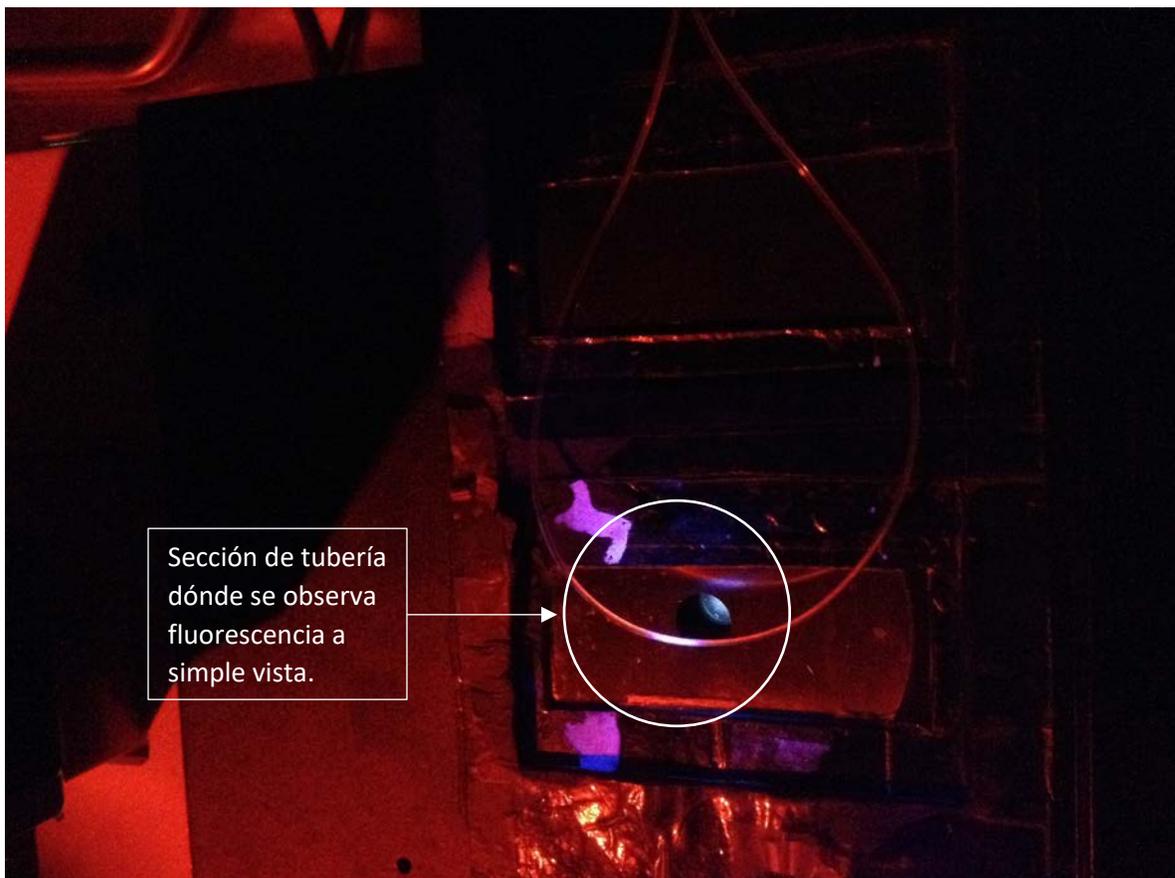


Figura 4- 34 Fotografía tomada a un segmento de tubería PTFE en dónde se había almacenado las microgotas que contenían el compuesto fluorescente. Al iluminar con la luz fluorescente la tubería se puede apreciar a simple vista que estás fluorescen.

Lo anterior es importante debido a que la difusión de los analitos no es deseable en la mayoría de las ocasiones. Para los ensayos biológicos es de vital importancia que no exista difusión del contenido de las microgotas ya que se desea identificar las propiedades del analito independientemente en cada gota.

Sin embargo, es importante puntualizar que no se hicieron pruebas más robustas, como determinar si existe un intercambio de analitos entre microgotas durante periodos de tiempo mayores a 24 horas. Los resultados obtenidos son cualitativos y se determinaron para un periodo de tiempo de 24 horas posteriores a la encapsulación del compuesto fluorescente en microgotas.

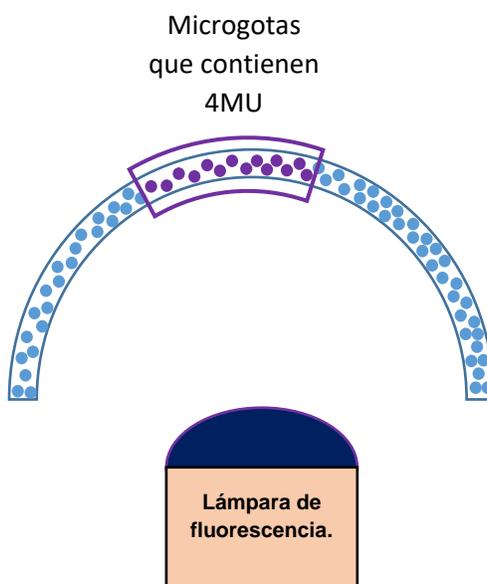


Figura 4- 35 Esquema en dónde se ejemplifica como es que se observan las microgotas que presentan fluorescencia desde el exterior de la tubería PTFE cuando se iluminan con una lámpara fluorescente. Esto da pista de que no existe una contaminación entre microgotas ya que aún en experimentos donde se dejó encubar la emulsión no se observó un aumento en la zona delimitada por la presencia de la fluorescencia al inicio.

4.6 Encapsulamiento de células en microgotas.

Una vez que se logró caracterizar el sistema de microfluídica se procedió a realizar una serie de experimentos con la intención de demostrar la capacidad del tensoactivo para generar microgotas estables que contuvieran en su interior una pequeña población de células de *E. coli* BL21.

Estas células se tiñeron con la tinta fluorescente bromuro de etidio (BrEt), un compuesto que solo tiñe a las células no viables, con el objetivo de poder realizar un monitoreo del número de células que van muriendo al interior de las microgotas. Se planteó que, si en el interior de las microgotas existe algún tipo de agente bactericida como la fosfomicina o la misma composición de la fase móvil proveniente

del equipo HPLC, debería de ser posible notar un aumento en el número de célula no viables después de los diferentes tiempos de incubación que se monitorearon: 0 h, 24 h, 48 h y 72 h.

4.6.1 Encapsulamiento de células de *E. coli* en microgotas empleando un sistema de microfluídica.

La suspensión de bacterias fue introducida en el chip GAF por medio de una jeringa de plástico de 1 mL y se combinó con el flujo proveniente del HPLC. En el equipo se corrió el programa de elución A5' y se realizó una inyección de una disolución estándar de fosfomicina a una concentración de 2.5 mg/mL. Ambos flujos se mezclan antes de llegar a la base del pentágono por donde se hace fluir la fase fluorada y que al intersectarse dan pie a la generación de microgotas (figura 4-36).

Durante los primeros cinco minutos, la composición en el programa de elución A5' tiene una proporción de 90% de fase móvil A (H₂O:ACN, 95:5) y 10% de fase móvil B (MeOH). Al formar las microgotas el porcentaje de disolventes orgánicos se reduce a la mitad ya que la suspensión de células de *E. coli* aporta la mitad del volumen de las gotas. Para poder realizar el conteo de células no viables presentes en cada microgota se montó el sistema de microfluídica como se describe en la figura 4-36.

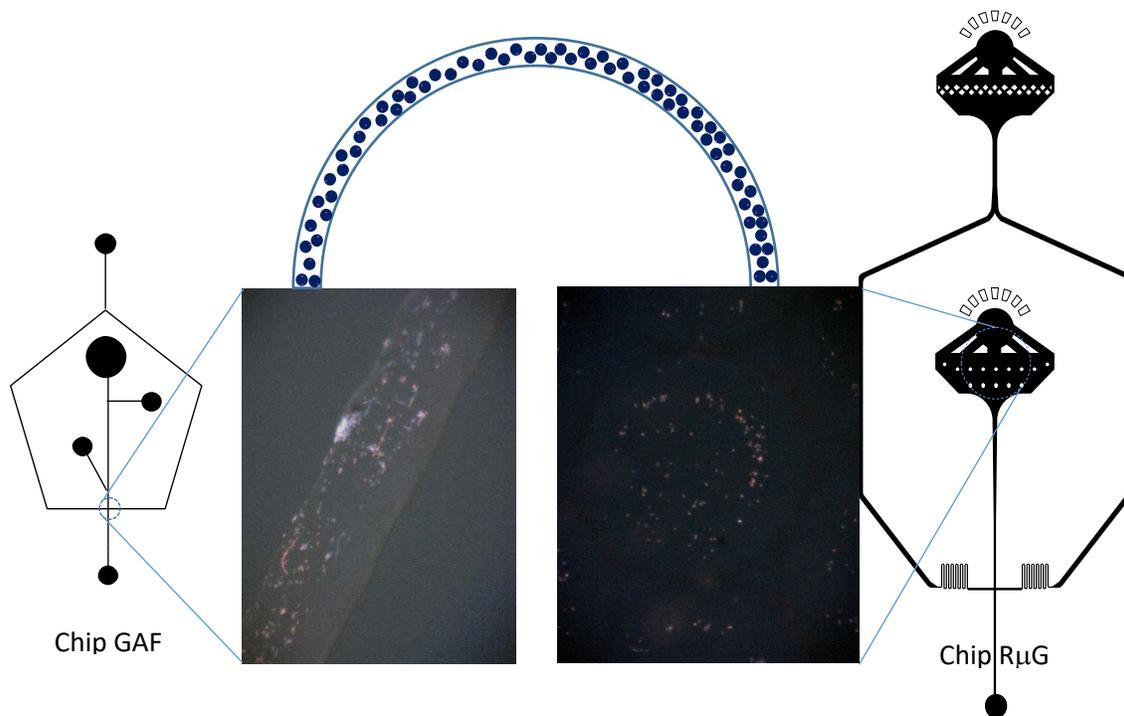


Figura 4- 36 En el chip GAF antes de que se generen las microgotas, se puede observar una interfase entre el flujo proveniente del HPLC y la introducción de las células teñidas (izquierda). Una vez formadas las microgotas, viajan por la tubería de PTFE y son introducidas en la cámara principal del chip R μ G en dónde pueden ser estudiadas (derecha).

Las microgotas con células teñidas en su interior se incubaron en una tubería de PTFE y en diferentes tiempos se reintrodujeron al chip R μ G donde se observaron bajo el microscopio de fluorescencia como se muestra en la figura 4-37. Los filtros DAPI-50L-A y LF 561/LP-C permiten ver la fluorescencia generada por la tinta BrEt. Sin embargo, el segundo filtro es selectivo únicamente a la fluorescencia generada por esta tinta por lo que se considera que el conteo obtenido para las fotografías tomadas bajo este filtro son los datos más confiables debido a que presenta menor contaminación lúminica.

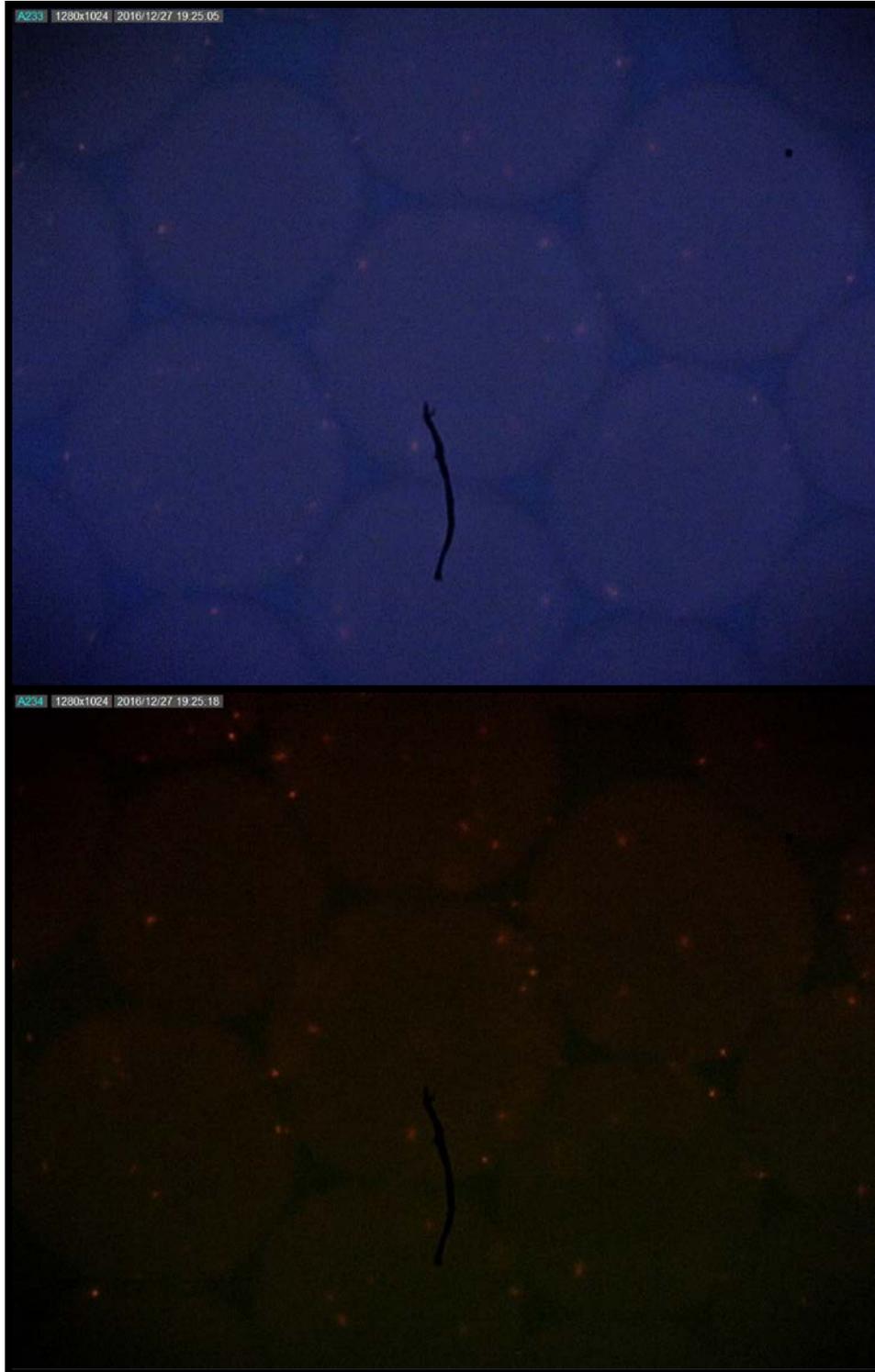


Figura 4- 37 Fotografías tomadas a las microgotas con células de *E. coli*. En la primera imagen (arriba) se observan las microgotas con células teñidas en su interior bajo el filtro DAPI-50L-A. En la segunda imagen (abajo) se observan las mismas microgotas bajo el filtro LF 561/LP-C.

El conteo de las células no viables contenidas al interior de una población de once microgotas se realizó con imágenes tomadas a diferentes tiempos de incubación y empleando el software ImageJ para el análisis de imágenes. Los promedios de las células teñidas con BrEt en 66 microgotas (seis fotografías) a diferentes tiempos de incubación se muestran en la figura 4-38.

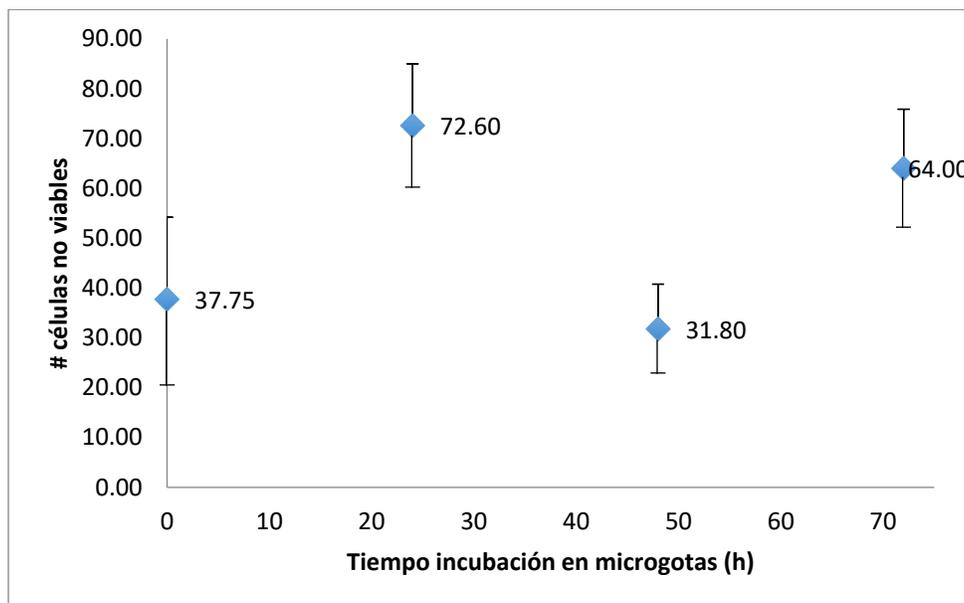


Figura 4- 38 Número de células no viables teñidas con bromuro de etidio dentro de microgotas después de diferentes tiempos de incubación.

Al revisar los resultados se encontró que el número de células no viables detectado en cada ensayo no presentó un aumento al paso del tiempo, como sería de esperarse al estar en contacto con el antibiótico fosfomicina. Por el contrario, osciló entre 30 y 70 células. Por cuestión de tiempo no se realizaron más experimentos para encontrar el origen de estos resultados, pero una hipótesis es que la gran mayoría de las células sufrieran daños y se tiñeran con bromuro de etidio desde los primeros instantes al haber sido expuestas a una concentración de 5% de metanol en las microgotas. Sin embargo, se demostró que la emulsión formulada con el nuevo tensoactivo fluorado PEG-PFPE-PEG es capaz de incubar células en microgotas hasta 72 horas y transferirlas de un dispositivo a otro después de este tiempo de manera confiable.

5 Conclusiones

Se logró sintetizar el tensoactivo fluorado PFPE-PEG-PFPE que permite la generación de una emulsión de gotas estables en un aceite fluorado con una composición variable de agua:metanol desde 0 hasta 50% de metanol. La estabilidad de las microgotas con este tensoactivo es mucho mayor frente a las otras gotas generadas a partir de un tensoactivo fluorado disponible comercialmente (Krytox); o bien de la mezcla del tensoactivo Krytox con el agente estabilizador Jeffamina.

Además de formar microgotas adecuadamente, el tensoactivo fluorado PFPE-PEG-PFPE permitió transferir íntegramente las microgotas de un dispositivo de microfluídica a otro; incubarlas fuera del microchip en una tubería de PTFE; retener adecuadamente el compuesto 4MU en el interior de las microgotas y finalmente incubar células de *E. coli* BL21 en las microgotas por periodos de hasta 72 horas.

Se diseñó un sistema de microfluídica que combina dos dispositivos de microfluídica, uno encargado de la generación de microgotas y otro que permite el análisis de las microgotas. Este sistema se empleó para comparar la capacidad de los tensoactivos de generar microgotas con concentraciones de hasta un 50 % de metanol, la estabilidad de las gotas y la resistencia de las gotas a ser transportadas a través de un segmento de tubería de PTFE.

Este sistema de microfluídica se logró acoplar con un equipo de HPLC, permitiendo fraccionar en miles de microgotas el compuesto 4MU que se inyectó en el equipo. Las microgotas se almacenaron en un segmento de tubería PTFE manteniendo el orden en que fueron formadas y manteniendo encapsulado el compuesto 4MU.

El trabajo realizado en este proyecto sienta las bases para el desarrollo de un sistema de Detección Sistemática de Alta Eficiencia que potencialmente podría realizar la separación de una mezcla compleja como lo es un extracto natural y realizar posteriormente ensayos de viabilidad celular con cada una de las fracciones separadas para así identificar compuestos con actividad bactericida.

La síntesis del tensoactivo fluorado que se desarrolló durante este trabajo posee gran relevancia, ya que al compararse con otros tensoactivos fluorados, el tensoactivo PEG-PFPE-PEG permite manipular las microgotas que se generan dentro del chip GAF. Los sistemas de escrutinio de alta eficiencia basados en microgotas dependen de que las microgotas generadas puedan ser manipuladas, almacenadas, incubadas e incluso transportadas sin que el registro se pierda ni que exista contaminación cruzada entre las microgotas. Estas propiedades se observaron en las microgotas generadas a partir del tensoactivo PEG-PFPE-PEG.

6 Perspectivas a futuro

Durante la elaboración de este proyecto se identificaron diferentes oportunidades asociadas a distintos procesos experimentales, a continuación, se enlistan la serie de mejoras detectadas para robustecer el dispositivo de escrutinio de alta eficiencia desarrollado:

- Establecer el proceso de tinción celular idóneo para los ensayos biológicos basados en microgotas. Se busca una combinación de tinciones que permita distinguir correctamente entre microorganismos viables y no viables bajo cierto filtro y/o longitud de onda.
- Identificar el microorganismo diana apropiado para la evaluación de viabilidad celular en ensayos biológicos basados en microgotas.
- Robustecer el método de procesamiento de imágenes empleando el software ImageJ (o equivalente) que facilite el conteo de microorganismos al interior de microgotas por el método de fluorescencia.
- Encontrar el medio de cultivo adecuado para los ensayos de viabilidad celular basados en fluorescencia.

7 REFERENCIAS

- (1) Broach, J. R.; Thorner, J. *Nature* **1996**, *384* (6604 SUPPL.), 14–16.
- (2) Bleicher, K. H.; Böhm, H. J.; Müller, K.; Alanine, A. I. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (5), 369–378.
- (3) Witters, D.; Sun, B.; Begolo, S.; Rodriguez-Manzano, J.; Robles, W.; Ismagilov, R. F. *Lab Chip* **2014**, *14* (17), 3225.
- (4) Griffiths, A. D.; Tawfik, D. S. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24* (9), 395–402.
- (5) Casadevall i Solvas, X.; deMello, A. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (7), 1936–1942.
- (6) Theberge, A. B.; Whyte, G.; Huck, W. T. S. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (9), 3449–3453.
- (7) Holtze, C.; Rowat, A. C.; Agresti, J. J.; Hutchison, J. B.; Angilè, F. E.; Schmitz, C. H. J.; Köster, S.; Duan, H.; Humphry, K. J.; Scanga, R. A.; Johnson, J. S.; Pisignano, D.; Weitz, D. A. *Lab Chip* **2008**, *8* (10), 1632.
- (8) Kelly, B. T.; Baret, J.-C.; Taly, V.; Griffiths, A. D. *Chem. Commun.* **2007**, No. 18, 1773.
- (9) Kaminski, T. S.; Scheler, O.; Garstecki, P. *Lab Chip* **2016**, *16* (12), 2168–2187.
- (10) Dressler, O. J.; Maceiczky, R. M.; Chang, S. I.; Demello, A. J. *J. Biomol. Screen.* **2014**, *19* (4), 483–496.
- (11) Damean, N.; Olguin, L. F.; Hollfelder, F.; Abell, C.; Huck, W. T. S. *Lab Chip* **2009**, *9* (12), 1707.
- (12) Zheng, B. B.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. **2004**, No. 15, 1365–1368.
- (13) McDonald, J. C.; Duffy, D. C.; Anderson, J. R.; Chiu, D. T.; Wu, H.; Schueller, O. J.; Whitesides, G. M. *Electrophoresis* **2000**, *21* (1), 27–40.

- (14) Martinez-Duarte, R.; Madou, M. *Microfluid. Nanofluidics Handb.* **2011**, No. 2006, 231–268.
- (15) Ismagilov, R. F.; Ng, J. M. K.; Kenis, P. J. A.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **2001**, 73 (21), 5207–5213.
- (16) Natarajan, S.; Katsamba, P. S.; Miles, A.; Eckman, J.; Papalia, G. A.; Rich, R. L.; Gale, B. K.; Myszka, D. G. *Anal. Biochem.* **2008**, 373 (1), 141–146.
- (17) Song, H.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, 42 (7), 768–772.
- (18) Garstecki, P.; Fuerstman, M. J.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. *Lab Chip* **2006**, 6 (3), 437.
- (19) Kim, J.-Y.; Cho, S.-W.; Kang, D.-K.; Edel, J. B.; Chang, S.-I.; deMello, A. J.; O'Hare, D. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (73), 9144.
- (20) Niu, X. Z.; Zhang, B.; Marszalek, R. T.; Ces, O.; Edel, J. B.; Klug, D. R.; deMello, A. J. *Chem. Commun.* **2009**, No. 41, 6159.
- (21) Banks, M. N.; Cacace, A. M.; O'Connell, J.; Houston, J. G. *Drug Discov. Handb.* **2005**, 559–602.
- (22) Gárfias G., K. I. Monitoreo de la Actividad Bactericida de Tres Antibióticos Usando Tintas Fluorescentes en Microchips de Microfluídica. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **2017**.
- (23) Baret, J.-C. *Lab Chip* **2012**, 12 (3), 422–433.
- (24) Pabon, M.; Corpart, J. M. **2002**, 114 (January), 149–156.
- (25) Mazutis, L.; Gilbert, J.; Ung, W. L.; Weitz, D. A.; Griffiths, A. D.; Heyman, J. A. *Nat. Protoc.* **2013**, 8 (5), 870–891.
- (26) Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, D. J. K. *Journal of Molecular Structure.* 2005, p 512.
- (27) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental.*

2001, pp 607–843.

- (28) Ma, C. M.; Winsor, L.; Daneshtalab, M. *Phytochem. Anal.* **2007**, *18* (1), 42–49.
- (29) Dejournette, C. J.; Kim, J.; Medlen, H.; Li, X.; Vincent, L. J.; Easley, C. J. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (21), 10556–10564.
- (30) Jones, I.; Hamilton, J.; Srivastava, R.; Galloway, P. *Mol. Genet. Metab.* **2013**, *108* (2), S51.