

Desarrollo de instrumentación y métodos electroforéticos para el análisis de proteínas en microchips

Tesis Doctoral

María del Mar Barrios Romero

Universidad Autónoma
de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Analítica
y Análisis Instrumental

Instituto de Química
Orgánica General
Departamento de Análisis
Instrumental y Química
Ambiental



2015

Desarrollo de instrumentación y métodos electroforéticos para el análisis de proteínas en microchips

Tesis Doctoral

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental

Instituto de Química Orgánica General
Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias presenta:

María del Mar Barrios Romero

Trabajo dirigido por:
Dr. José Carlos Díez-Masa
Dr. Agustín González Crevillén

Tutelado por:
Dr. Jesús Rodríguez Procopio

Madrid, 2015

**D. JOSÉ CARLOS DÍEZ-MASA, DOCTOR EN CIENCIAS (SECCIÓN QUÍMICAS),
PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO
SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,**

Y

D. AGUSTÍN GONZÁLEZ CREVILLÉN, DOCTOR EN QUÍMICA ANALÍTICA,

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente Memoria, titulado **“Desarrollo de instrumentación y métodos electroforéticos para el análisis de proteínas en microchips”** ha sido realizado bajo su dirección por **María del Mar Barrios Romero** en el Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Así mismo, manifiestan que el trabajo descrito en la presente Memoria reúne, en su opinión, todos los requisitos para su defensa, por lo que autorizan su presentación para que sea defendido como **Tesis Doctoral**.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente documento a treinta de noviembre de dos mil quince.



Fdo. D. José Carlos Díez-Masa



Fdo. D. Agustín González Crevillén

Agradecimientos

*A TODOS los que me han ayudado
a hacerlo posible
¡Gracias!*

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de Tesis el Dr. José Carlos Díez-Masa y el Dr. Agustín González Crevillén la oportunidad de realizar este trabajo de Tesis Doctoral, así como el apoyo y conocimiento aportado a lo largo de estos años.

Quisiera agradecer también al Dr. Jesús Rodríguez Procopio, de la Universidad Autónoma de Madrid por la tutoría de este trabajo.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por la concesión de una beca predoctoral JAE-Pre y a los directores del Instituto de Química Orgánica General por haber autorizado mi estancia. A su vez, también me gustaría agradecer a todo el personal del Instituto de Química Orgánica General, por su ayuda al desarrollo de muchas partes de este trabajo. En especial a los miembros del Taller, Jose María y Pepe con los que tan estrechamente he trabajado.

Agradecer a la Dra. Mercedes de Frutos por su apoyo continuo a lo largo de la Tesis.

Gracias también al Dr. Agustín Costa García y a la Dra. M^a Teresa Fernández Abedul de la Universidad de Oviedo por abrir las puertas de su laboratorio y permitirme llevar a cabo una estancia en su grupo de investigación y disfrutar del mundo de los microchips. Así como a Mario y Ana de Micrux por su entusiasmo contagioso.

Me gustaría darle las gracias más sinceras a mis compañeros de laboratorio en especial a aquellos con los que compartí tantos buenos momentos, momentos de risas, de curiosidad científica, viajes, jornadas gastronómicas... en definitiva momentos de apoyo mutuo que nos ayudaron

a afrontar las dificultades que nos íbamos encontrando y que hicieron que al final nos convirtiéramos en amigos.

También a los chicos de gases y de química ambiental agradeceros el apoyo prestado.

Por último, agradecerle especialmente a mi familia el apoyo ofrecido y también la inmensa paciencia tenida para ayudarme a conseguir este proyecto.

Y como no a Ismael, naaano, sin tu ayuda y apoyo incondicional esto no hubiera sido posible... no hay palabras para expresar mi gratitud hacia ti, por haberme ayudado a tener claridad en tantos momentos oscuros, muchas gracias.

*Desarrollo de métodos electroforéticos e
instrumentación para el análisis de proteínas
en microchips de electroforesis capilar*

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	5
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Breve introducción a los microchips. Ventajas de la miniaturización	23
1.2. Microchips de electroforesis capilar	27
1.1.1. <i>Microchips poliméricos de electroforesis capilar</i>	
1.1.2. <i>Métodos de fabricación de microchips poliméricos</i>	
1.2.2.1. <u>Métodos sin replicación</u>	
1.2.2.2. <u>Métodos de replicación</u>	
1.2.2.3. <u>Sellado de los canales del microchip</u>	
1.1.3. <i>Principales modos de electroforesis capilar en microchips</i>	
1.1.4. <i>Modos de inyección en microchips</i>	
1.1.5. <i>Detección en microchips</i>	
1.1.6. <i>Aplicación de los microchips a la separación de proteínas</i>	
1.3. Interés de las de proteínas lácteas	82
1.4. Proteínas de interés farmacéutico	86
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	89
3. MATERIAL Y MÉTODOS	95
3.1. Reactivos	97
3.2. Instrumentación	98
3.2.1. <i>Descripción de los microchips</i>	
3.2.2. <i>Desarrollo del portachip</i>	
3.2.3. <i>Fuentes de alimentación y control</i>	

- 3.2.4. *Manipulación de fluidos*
- 3.2.5. *Detección fluorimétrica*
- 3.2.6. *Desarrollo instrumental para el acoplamiento del láser al microscopio*

3.3. Procedimientos _____ 108

- 3.3.1. *Acondicionamiento de los microchips*
- 3.3.2. *Protocolos electroforéticos*
- 3.3.3. *Medida del flujo electroosmótico (EOF) en microchips de SU-8*
- 3.3.4. *Medida de la capacidad del EOTrol LN[®] para impedir la adsorción de proteínas*
- 3.3.5. *Derivatización de las proteínas*
- 3.3.6. *Tratamiento de las muestras de leche*
- 3.3.7. *Caracterización espectroscópica del SU-8*
- 3.3.8. *Desglicosilación de la α -1-glicoproteína ácida (AGP)*
- 3.3.9. *Análisis de la AGP por espectrometría de masas*
- 3.3.10. *Procesamiento de imágenes y representación de los datos*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____ 123

4.1. Evaluación de los microchips de poli(metil metacrilato) (PMMA) para el análisis de proteínas lácteas _____ 125

- 4.1.1. *Estudio de la hidroxipropil metil celulosa (HPMC) como polímero de cribado y agente de recubrimiento para separaciones por tamaño*
- 4.1.2. *Estudio de la HPMC como polímero de cribado y EOTrol como agente de recubrimiento para separaciones por tamaño*
- 4.1.3. *Evaluación del poli(etilenglicol) como polímero de cribado y EOTrol como agente de recubrimiento para separaciones por tamaño*

4.2. Estudio de los microchips poliméricos de SU-8 para la separación de proteínas _____ 143

4.2.1. Efecto del EOTrol sobre el flujo electroosmótico de los microchips de SU-8	
4.2.2. Estudio del poli(etilenglicol) como polímero de cribado	
4.2.3. Estudio del dextrano como polímero de cribado	
4.2.4. Aplicación de la metodología al análisis de muestras naturales	
4.3. Incremento de la sensibilidad de detección del método	173
4.3.1. Análisis espectroscópico del SU-8	
4.3.2. Influencia del cambio de sonda fluorescente en el límite de detección	
4.3.3. Evaluación del efecto del láser sobre el SU-8	
4.3.4. Medida de la sensibilidad de detección utilizando el láser como fuente de luz	
4.3.5. Influencia del stacking en la repetibilidad	
4.3.6. Aplicación del método de análisis con detección por fluorescencia inducida por del láser al análisis de muestras naturales	
4.4. Aplicación de los microchips de SU-8 al análisis de formas glicosiladas y desglicosiladas de AGP	195
4.4.1. Estudio de la desglicosilación de la proteína AGP	
4.4.2. Separación en microchips de SU-8 de las fracciones glicosilada y desglicosilada de la proteína AGP	
5. CONCLUSIONES	203
6. BIBLIOGRAFÍA	209
ANEXO (Publicación en J.S.S.)	231

**ABREVIATURAS Y
ACRÓNIMOS**

Abreviaturas y acrónimos

α -LA	α -Lactoalbúmina
β -LG	β -Lactoglobulina
η	Viscosidad intrínseca
μ CE	Microchips de electroforesis capilar
μ CSE	Microchips de electroforesis capilar con polímero de cribado
μ -TAS	<i>MicroTotal analysis system</i>
DARPA	Defense advanced research projects agency
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGP	α -1-Glicoproteína ácida
ALS	<i>Acid-labile surfactant</i>
ARN	Ácido ribonucleico
BAS	1-Butil-3-metilimidazol dodecanosulfonato
BR	Reservorio de tampón de separación
BSA	Seroalbúmina bobina
c^*	<i>Entanglement concentration</i>
C^4D	<i>Capacitive coupling contactless conductivity detection</i>
CCD	<i>Charge coupled device</i>
CEC	Electrocromatografía
CGE	Electroforesis capilar en gel
CMOS	<i>Complementary metal-oxide semiconductor</i>
CNT	Nanotubos de carbono
COC	Copolímero de olefina
CSIC	Consejo superior de investigaciones científicas
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CZE	Electroforesis capilar en zona libre
DAPS	N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato
DPA	α,α -Dimetoxi- α -fenilacetofenona
E. Coli	<i>Escherichia coli</i>
EDMA	Etilenglicol dimetil acrilato
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción con enzimas
EOF	Flujo electroosmótico

Abreviaturas y acrónimos

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FQ	3-(2-Furoil)quinolin-2-carboxialdehído
H ₂ O	Agua milli-Q
Hb	Hemoglobina humana
HCl	Ácido clorhídrico
HPMC	Hidroxipropil metil celulosa
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
IEF	Isoelectroenfoque
ITP	Isotacoforesis
KCN	Cianuro potásico
LIF	Fluorescencia inducida por láser
LED	<i>Light-emitting diode</i>
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
M-6	Métrica 6
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted Laser desorption/ionization - time-of-flight</i>
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
micro-CGE	Electroforesis microcapilar en gel
micro-MEKC	Microcromatografía electrocinética micelar
mu-MEEKC	Cromatografía electrocinética de microemulsión
Mw	Peso molecular
N	Número de platos teóricos
NaOH	Hidróxido sódico
OD	Densidad óptica
Parylene®	Poli(p-xililano)
PC	Poli(carbonato)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDMS	Poli(dimetil siloxano)
PEG	Poli(etilenglicol)
PEO	Óxido de poli(etileno)
PET	Tereftalato de poli(etileno)
pI	Punto isoeléctrico

Abreviaturas y acrónimos

PMMA	Poli(metil metacrilato)
PNGasaF	Péptido-N-glicosidasa F
PS	Poli(estireno)
PTFE	Poli(tetrafluoroetileno)
PUMA	Poli(uretano de metacrilato)
PVA	Poli(vinil alcohol)
PVC	Poli(cloruro de vinilo)
PVP	Poli(vinil pirrolidona)
R_s	Resolución entre picos electroforéticos
RSD	Desviación estándar relativa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida mediada por SDS
SR	Reservorio de muestra
SW	Reservorio de desecho de muestra
TFA	Ácido trifluoroacético
T_g	Temperatura de transición vítrea
t_m	Tiempo de migración de cada proteína
TPS	Poli(éster) termoendurecible
U.A.	Unidades arbitrarias
UHT	Esterilización a muy alta temperatura
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
W	Reservorio de desecho

Resumen y estructura de la Memoria

El trabajo presentado en esta Memoria de Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de la instrumentación y de la metodología necesaria para la separación de proteínas mediante el uso de microchips poliméricos de electroforesis capilar.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica con una gran capacidad para separar mezclas complejas, que sin embargo, presenta como inconveniente un tiempo de análisis elevado (decenas de minutos). La electroforesis capilar en microchips ha mejorado este último aspecto, ya que posee el mismo o incluso mayor poder de separación que los equipos convencionales, pero reduciendo el tiempo de análisis a decenas de segundos. Desde la primera publicación sobre la tecnología lab-on-a-chip, los microchips de electroforesis se han aplicado a separaciones de ADN, proteínas y una gran variedad de analitos pequeños con resultados satisfactorios usando para ello diferentes modos electroforéticos. En este sentido, las ventajas que ofrecen los microchips de electroforesis capilar para las separaciones de proteínas como son menor tiempo de análisis, menor consumo de muestra y reactivos, alta eficacia y capacidad, además de las posibilidades de integración en la misma plataforma de las diferentes etapas del proceso analítico han sido ya demostradas.

Hasta la fecha, el material que más se ha usado para fabricar los microchips de electroforesis ha sido el vidrio, debido a las características ópticas y propiedades físico-químicas de su superficie similares a las de los capilares de sílice fundida. Sin embargo, debido al tedioso y costoso proceso de fabricación están emergiendo como alternativa una gran variedad de microchips poliméricos, que ofrecen

Resumen y estructura de la Memoria

características diferentes que los hace apropiados para distintos tipos de aplicaciones. Los sustratos poliméricos permiten que los microchips puedan ser fabricados en masa mediante diferentes técnicas y que de esta forma se posibilite en un futuro el abaratar los costes de su fabricación consiguiendo que sean desechables después de un sólo uso e impidiendo así problemas de contaminación cruzada.

A tenor de lo anterior, resulta fundamental el desarrollo de métodos analíticos en microchips poliméricos de electroforesis capilar para el análisis de proteínas de interés en el campo alimentario y farmacéutico.

Con tal propósito, el trabajo presentado en esta Memoria de Tesis Doctoral aborda el desarrollo de la instrumentación, métodos de separación y detección apropiados para la separación de mezclas de proteínas empleando microchips poliméricos de electroforesis capilar.

La presente Memoria se encuentra organizada en las partes que se describen a continuación.

En primer lugar, se presenta la Introducción General donde se describen a grandes rasgos los aspectos fundamentales de los temas que son objeto de estudio en la presente Tesis: la separación de proteínas en microchips de electroforesis capilar, describiendo antecedentes históricos, métodos de fabricación de los microchips, modos de electroforesis capilar más usados así como modos de inyección y detección en microchips. A su vez, se ha realizado un profundo estudio bibliográfico de los trabajos en los que se aplicaron los microchips de electroforesis capilar a las separaciones de mezclas

proteicas, organizado en función del modo de separación empleado. Por último, se hace también mención al interés de las muestras que se han utilizado a lo largo de este trabajo. Por un lado se hace una breve descripción sobre las proteínas de origen lácteo, las cuales se han utilizado como muestra durante gran parte de esta Tesis, y son responsables de multitud de problemas de alergias. En este sentido, resulta fundamental el desarrollo de nuevos métodos aplicados al control de alergenicidad en los productos alimentarios. De hecho, la β -lactoglobulina bovina ha sido descrita como una de las principales proteínas alergénicas de la leche de vaca y su detección de forma rápida y sensible en preparados hipoalergénicos y en alimentos infantiles resulta de gran interés. Por otro lado, también se hace una pequeña introducción sobre la importancia del control sobre los procesos de producción y purificación de biofármacos para asegurar su actividad biológica, estabilidad en el tiempo y la consistencia del producto, en la que se describe la metodología utilizada para verificar estas características y el potencial de los microchips en este campo.

A continuación, se presentan los Objetivos y el Plan de Trabajo del estudio realizado.

Después del apartado anterior, se encuentra la sección de Material y métodos, donde se describen tanto los reactivos como la instrumentación desarrollada para llevar a cabo la manipulación eléctrica e hidrodinámica de los fluidos en el interior del microchip y la detección de las proteínas de interés. Así como los procedimientos electroforéticos utilizados a lo largo de toda la Tesis.

Resumen y estructura de la Memoria

Seguidamente, se describe el trabajo desarrollado organizado en forma de apartados según el tema de estudio.

En el apartado 1 se realiza una evaluación de los microchips de poli(metil metacrilato) (PMMA) para el análisis de proteínas lácteas. Este tipo de microchip ha sido uno de los más aplicados para las separaciones por electroforesis capilar debido a las interesantes propiedades que presenta tales como bajo coste de fabricación y buenas propiedades ópticas, mecánicas y eléctricas. Partiendo de esta información previa, se desarrollaron diversos métodos de electroforesis capilar en microchips de PMMA para la separación por tamaño de la mezcla de patrones de proteínas lácteas, con detección fluorescente. Para ello, se evaluó la idoneidad de distintos polímeros para actuar como medio de cribado para la separación por tamaño y también para actuar como agente de recubrimiento de las paredes del canal y así disminuir el flujo electroosmótico y controlar la adsorción de las proteínas sobre las paredes del mismo. Es por ello, que se estudió la hidroxipropil metil celulosa (HPMC), un derivado de celulosa, como agente de cribado y de recubrimiento del canal por sí misma, así como su combinación con un agente de recubrimiento comercial, como era el EOTrol LN[®]. Sin embargo, se observó una co-agregación entre los polímeros que impedía llevar a cabo el análisis de la muestra. También, se evaluaron otros polímeros, como fueron los derivados de poli(etilenglicol) de diversos pesos moleculares como polímeros de cribado, en combinación con EOTrol LN[®], para la separación de patrones de proteínas lácteas en microchips de PMMA. Estos experimentos permitieron obtener unas condiciones apropiadas

para la separación, con buena resolución, de las proteínas patrón α -lactalbúmina y seroalbúmina bovina (BSA). No obstante, se hizo patente un problema de falta de reproducibilidad en las separaciones llevadas a cabo en este tipo de microchips. Dicho problema se intentó abordar desde diferentes puntos de vista, que iban desde el empleo de disoluciones de polímeros de cribado con menor viscosidad a procedimientos más agresivos de limpieza y acondicionamiento de los microchips. La dificultad que se halló para encontrar una metodología que permitiera reutilizar los microchips de PMMA junto con el elevado precio de cada uno, condujeron al descarte de este tipo de microchips para la separación por tamaño de las proteínas de suero lácteo.

En el apartado 2 se procedió al estudio de los microchips de electroforesis capilar de SU-8 para la separación por tamaño de proteínas lácteas, utilizando también detección fluorescente a través de una lámpara de mercurio como fuente de luz de excitación. Este tipo de material, que hasta la fecha había sido usado para separaciones electroforéticas en un pequeño número de trabajos publicados, presenta unas excelentes propiedades mecánicas, es químicamente estable y altamente transparente a la radiación en la parte visible del espectro y en el ultravioleta cercano, por lo que se decidió explorar su uso. Al igual que en el capítulo anterior se estudiaron diversos polímeros como medio de cribado, como el poli(etilenglicol) o el dextrano, ambos en combinación con el agente de recubrimiento EOTrol LN[®]. Así mismo, los métodos desarrollados empleando los diferentes polímeros de cribado se optimizaron variando parámetros de separación tales como longitud del canal de

Resumen y estructura de la Memoria

separación, voltaje de separación y concentración de los polímeros en el tampón de separación. Como criterios de optimización se consideraron la resolución de la mezcla de patrones de proteínas lácteas, el tiempo de separación y la repetibilidad de los tiempos de migración obtenidos. El polímero de cribado dextrano junto con el recubrimiento del canal con EOTrol LN® ambos en concentraciones del 10 %, proporcionaron las mejores condiciones de separación atendiendo a los criterios de optimización anteriores. Posteriormente, se aplicó la metodología optimizada a muestras naturales de leche cruda y UHT. Los resultados fueron satisfactorios demostrándose por tanto que la capacidad de resolución de la metodología desarrollada es apropiada para separar en una matriz compleja las principales proteínas del suero lácteo.

El apartado 3 recoge la modificación tanto de la metodología como de la instrumentación con el objetivo de mejorar la sensibilidad de detección en microchips de SU-8. Es de sobra conocido que la sensibilidad es una de las limitaciones más importantes de la electroforesis capilar en microchips especialmente cuando se emplean detectores basados en espectroscopía (UV-Vis y fluorescencia). Esto es debido principalmente a que el camino óptico es corto y que la cantidad de muestra que se utiliza en los análisis es pequeña, del orden de pL. En este apartado se abordó el problema de la falta de sensibilidad a través de dos estrategias diferentes. Por un lado, se realizó una modificación del agente de derivatización fluorescente de las proteínas por otro más apropiado a las características espectroscópicas del SU-8, como es el Chromeo P540™ cuyo máximo

de absorción está alrededor de 533 nm y el de emisión 627 nm. Los límites de detección que se consiguieron en estas condiciones no fueron significativamente diferentes a los obtenidos con el anterior agente de derivatización (FQ). La segunda estrategia que se abordó fue la modificación del sistema de detección mediante la implementación de un láser como fuente de excitación para la fluorescencia. En estas condiciones sí que se mejoró el límite de detección de las tres proteínas mayoritarias del suero lácteo en 2 órdenes de magnitud en relación a los obtenidos empleando la lámpara de mercurio, siendo ahora los nuevos valores 17 nM para la α -lactoalbúmina, 30 nM para la β -lactoglobulina y 70 nM para la BSA.

En el último apartado se aplicó la metodología electroforética desarrollada junto con el láser como fuente de excitación a la separación de las fracciones glicosiladas y no glicosiladas de proteínas. En los últimos años la industria biotecnológica ha experimentado un gran auge debido en parte al desarrollo de nuevos productos biofarmacéuticos, con procesos de producción y de purificación sumamente complejos. Este tipo de productos requiere de métodos analíticos eficientes que permitan controlar de forma sencilla y rápida tanto la fabricación como la calidad de estos fármacos. Dentro de los controles que se les realiza a estos productos para asegurar tanto su actividad biológica como su estabilidad y consistencia, destaca el control sobre la glicosilación de algunos fármacos, ya que una alteración en la glicosilación puede dar lugar a un producto sin la actividad biológica adecuada. En este apartado de la Memoria se usó como proteína modelo la α -1-glicoproteína ácida (AGP), la cual posee

Resumen y estructura de la Memoria

una fracción de glicanos que supone alrededor del 40 % de su peso. Se aplicó entonces, la metodología e instrumentación desarrolladas al análisis de las fracciones glicosiladas y no glicosiladas de esta proteína consiguiendo la resolución completa de la mezcla de ambas fracciones en tan sólo 6 minutos. De esta manera, se demostró el potencial que pueden ofrecer los microchips de electroforesis capilar de SU-8 para aplicaciones en el campo del control de calidad de glicoproteínas naturales o recombinantes. Sin embargo, todavía en este punto es necesario la realización de estudios en mayor profundidad que confirmen las posibilidades del método desarrollado en el campo de las glicoproteínas, ofreciendo una alternativa a los métodos convencionales de análisis.

En la última sección, Conclusiones Generales, se recogen las conclusiones más destacadas a las que se llega a lo largo del trabajo descrito en los apartados de esta Memoria.

Parte del trabajo descrito a lo largo de esta Memoria de Tesis se encuentra plasmado en el artículo ***“Development of an SDS-gel electrophoresis method on SU-8 microchips for protein separation with LIF detection: Application to the analysis of whey proteins”*** (Maria del Mar Barrios-Romero, Agustín G. Crevillén, José Carlos Diez-Masa, *Journal of Separation Science*, 36 (2013) 2530–2537).

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ***Breve introducción a los microchips. Ventajas de la miniaturización***

La idea de realizar en una plataforma miniaturizada todos los procesos que se llevan a cabo en un laboratorio de química analítica fue propuesta por A. Manz y colaboradores en 1990 [1]. En este trabajo, Manz introdujo el concepto del microanálisis total o μ -TAS, basándose en la mejora de las ventajas en los análisis químicos inherentes a la disminución en el tamaño y a la integración en una microestructura de todas las etapas del proceso analítico [2].

A partir de entonces, esta metodología ha experimentado un crecimiento exponencial gracias al uso en la fabricación de las microestructuras de la tecnología empleada en la microelectrónica y al enorme avance en paralelo de la microfluídica. Todo ello ha permitido el diseño de dispositivos analíticos cada vez más complejos y con mayores y mejores prestaciones. Fruto de la aplicación de este concepto, no sólo al campo de la química analítica sino a la química en general, surgió el concepto más amplio de *lab-on-a-chip* al cual le dedicó una sección especial la revista *Nature* en el 2006 [3] y, además, suscitó la aparición de una revista (*Lab-on-a-chip* editada por la *Royal Society of Chemistry*) dedicada exclusivamente a este campo científico. Actualmente, estos dispositivos se denominan indistintamente sistemas *lab on a chip* o sistemas microfluídicos por ser la microfluídica el fundamento de sus componentes principales.

Introducción

El uso de sistemas miniaturizados ofrece potencialmente múltiples ventajas:

- Análisis más rápidos, ya que se ha disminuido el orden de magnitud de sus dimensiones.
- Portabilidad, conllevando la descentralización parcial del análisis químico.
- Reducción del consumo de muestra y reactivos, con lo que se disminuye el coste de los análisis.
- Reducción de desechos, con la consiguiente protección del medio ambiente.
- Automatización de todas las etapas del análisis químico.
- Posibilidad de procesar muestras en paralelo sobre una misma plataforma, lo que aumenta el rendimiento de análisis.
- Análisis *on line*, para realizar la monitorización en continuo.

Se ha explorado el gran potencial que los sistemas lab on a chip pueden tener en múltiples y diversos campos [4-7] con intereses que van desde el análisis de compuestos químicos [8], la biología molecular [9-11], los análisis clínicos [12-14], hasta la defensa contra el terrorismo biológico que impulsó un gran desarrollo en la década de los 90 (Proyecto promovido por *Defense Advanced Research Projects Agency* (DARPA) del departamento de defensa de los Estados Unidos) [15]. Prueba de ello, es la gran cantidad de trabajos que han aparecido

en los últimos años, en campos muy diversos y aplicados al análisis de multitud de muestras diferentes.

A modo de ejemplo, cabe mencionar que se ha desarrollado un sistema microfluídico para la determinación de contaminantes ambientales en agua [16] y otro que permite detectar lactato, glucosa y la presión parcial de oxígeno en sangre en tan sólo 100 s, usando para ello microchips poliméricos desechables [17]. Otra aplicación interesante ha sido el análisis de anticuerpos de VIH en saliva [18]. En otro trabajo, se secuenciaron 600 bases de ADN en 6.5 minutos, gracias a un mecanismo de electromigración del ADN híbrido que se consiguió creando una matriz polimérica no distribuida de forma uniforme a lo largo del canal de separación [19]. También se han detectado múltiples antibióticos en leche cruda usando un sistema microfluídico con una repetibilidad del 95 % [20]. Como aplicación exótica podríamos destacar un prototipo de microchip multicanal diseñado por el grupo de Mathies que permitirá analizar la presencia de azúcares, aldehídos y ácidos en Marte [21].

En el campo de la preparación de muestra, los microchips también han experimentado un gran avance, teniendo en cuenta que era una de las etapas del proceso analítico en la que menos se había progresado [22]. En un microchip desarrollado por el grupo de Mathies, se integraron las etapas de limpieza y preconcentración de muestra necesarias para realizar el análisis de muestras de interés en química forense [23]. También se ha desarrollado un dispositivo microfluídico de extracción continua con disolvente que permite el enriquecimiento de la muestra [24] y una extracción en fase sólida para la purificación de ARN de muestras biológicas [25]. Además, por

Introducción

medio de micropilares de sílice desarrollados en el canal del chip se han separado bacterias en una muestra de sangre [26]. En otro trabajo, se ha llevado a cabo, además de las etapas previas de preparación de muestra, la amplificación por PCR para la detección de *E. coli* en un microchip [27].

El estudio de mutaciones de ADN se ha probado también en sistemas microfluídicos. Un ejemplo es el trabajo de Stenirri y colaboradores donde se usa un microchip de electroforesis capilar para la caracterización de la principal mutación genética responsable de la fibrosis quística [28].

También se han utilizado microchips para llevar a cabo inmunoensayos, que han permitido el desarrollo de métodos analíticos con gran selectividad y sensibilidad como, por ejemplo, un método para determinar clenbuterol, usado por los atletas como sustancia dopante, en un tiempo total de análisis inferior a 30 minutos [29] y otro sistema microfluídico que ha permitido detectar inmunoglobulina G humana a una concentración inferior a 10 ng/mL usando para ello un inmunoensayo tipo sándwich [30].

Los canales de los microchips se han utilizado también para llevar a cabo reacciones químicas, las cuales se ven favorecidas al conseguir una mayor relación superficie-volumen en los microcanales y un mejor control sobre la transferencia de calor y materia [31]. Otro ejemplo de reacciones favorecidas en microcanales son aquellas en las que la transferencia de materia durante la reacción se produce sobre una burbuja presente en el microcanal, permitiendo que la reacción se produzca de forma más controlada y eficiente [32].

Sin embargo, a pesar de todas las múltiples ventajas que se pueden obtener con los sistemas microfluídicos y de tener ya dos décadas de evolución, la aplicación de éstos fuera del ámbito de la investigación, en general, es bastante escasa. Como ya comentó Whitesides hace unos años, algunos de los principales problemas que se deben afrontar para conseguir el desarrollo de la microfluídica se encuentran en elegir y orientar los microchips en aplicaciones concretas y poner a punto estrategias que completen el ciclo de desarrollo incluyendo la comercialización, siendo necesario para ello imaginación e ingenio [15].

1.2. *Microchips de electroforesis capilar*

Los microchips se han aplicado a multitud de campos diferentes, tal y como se ha mostrado en el punto anterior, pero dentro de los diferentes campos, la aplicación pionera fue a la electroforesis capilar. En el año 1992, Harrison y colaboradores llevaron a cabo la primera electroforesis capilar en microchip [33], siendo éste uno de los campos de aplicación que ha experimentado un mayor auge en los últimos años. Este hecho es debido a que la cantidad de muestra inyectada puede ser controlada de manera más precisa, de forma que el volumen de muestra sea significativamente inferior (pL) al inyectado en los equipos convencionales (nL). Además, el campo eléctrico que se aplica a la separación puede ser superior al aplicado cuando se usan los capilares de sílice, ya que la disipación del calor generado en el proceso electroforético se produce de forma

Introducción

mucho más efectiva, debido a la mayor relación superficie volumen de los canales de los microchips frente a los capilares. Estas dos características de los microchips permiten, por tanto, acortar significativamente el tiempo de análisis y potencialmente conseguir mayor eficacia en las separaciones con menor longitud de capilar y cantidad de muestra [34].

Las ventajas de esta nueva tecnología ha promovido la aparición de equipos comerciales basados en los microchips de electroforesis capilar, los cuales se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de equipos comerciales de microchips de electroforesis capilar.

Fabricante (dirección)	Equipo comercial	Material del microchip	Aplicaciones de los kits
<i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, CA, EEUU)	2100 <i>Bioanalyzer</i>	Vidrio	Análisis de proteínas por SDS-PAGE. Citometría de flujo. Comprobación de la calidad del ARN con RIN (<i>RNA integrity number</i>). Cuantificación y separación por tamaño de ADN. Detección LIF.
Bio-Rad	<i>Experion™ Automated Electrophoresis Station</i>	Vidrio	Separaciones electroforéticas automáticas por tamaño de proteínas y ARN, combinado con marcaje, desmarcaje detección de bandas e imagen. Detección LIF.
<i>Caliper LifeSciences</i> (Perkin Elmer (Waltham, MA, EEUU))	<i>LabChip® GX</i>	Cuarzo	Detección y cuantificación de fragmentos de ADN. Evaluación y cuantificación de la calidad del ARN. Detección LIF.
	<i>LabChip® GX II</i>	Cuarzo	Análisis y cuantificación de proteínas, por tamaño. Análisis de alta capacidad de perfiles de N-glicanos. Detección y

			cuantificación de fragmentos de ADN. Evaluación de la calidad y cuantificación de ARN. Detección LIF.
<i>CE Resources</i> (CE Resources, Singapur, República de Singapur)	CE-P1, CE-P2	No indicado	Análisis de agua. Monitorización ambiental. Análisis clínicos. Análisis de alimentos y de aditivos en bebidas. Determinación de fármacos, iones inorgánicos. Diversos detectores.
Hitachi (Hitachi <i>Electronics Co.</i> , Tokio, Japón)	SV 1100 SV1210	PMMA	Este equipo permite 12 separaciones simultáneas al tener 12 canales independientes. Detector LED.
Micrux (Oviedo, España)	MicruX iHVStat	SU-8 / pyrex	Es un sistema muy versátil. Sistema portátil, muy compacto y con detección amperométrica.
Sandia National Laboratory (<i>Sandia Corporation</i> , Albuquerque, NM, EEUU)	μ - <i>ChemLab™</i>	Sílice fundida	Es un equipo muy versátil. Permite una gran variedad de separaciones cromatográficas. Detectores diversos.
Shimadzu (Nakagyo-ku, Japón)	MCE®TM- 202 MultiNA	Cuarzo	Separaciones por tamaño y cuantificaciones de ADN y ARN con detección fluorescente, con LED como fuente de excitación.

1.2.1. Microchips poliméricos de electroforesis capilar

Los primeros microchips que se empezaron a utilizar eran de vidrio [35-37]. Este material posee unas características similares a los capilares de sílice fundida que se utilizan en electroforesis capilar (por ejemplo, su flujo electroosmótico), por lo que una buena parte de la

Introducción

experiencia adquirida usando este tipo de capilares se pudo aplicar a estas microestructuras. Este tipo de microchip, además, es transparente a la luz visible y resistente a multitud de compuestos químicos. Sin embargo, presenta la desventaja de ser caro y, por ende, no desechable, además de precisar de un proceso de fabricación por vía húmeda bastante tedioso. Esto hace que sean necesarios laboriosos protocolos de lavado con el fin de reutilizar los microchips y que, por tanto, en algunos casos pueda darse una contaminación cruzada entre muestras.

Para evitar estos problemas surgió la idea de usar microchips desechables con un bajo coste de fabricación. Como alternativa al vidrio se introdujo entonces el uso de materiales poliméricos por la posibilidad que ofrecen de ser fabricados mediante métodos de producción en masa, siendo los polímeros más comúnmente utilizados el poli(dimetilsiloxano) (PDMS) [38], poli(metil metacrilato) (PMMA) [39], poli(carbonato) (PC) [40] y copolímero de cicloolefina (COC) [41]. A pesar de que estos sean los mayoritarios, son muchos los estudios que se están llevando a cabo para encontrar nuevos materiales con características compatibles con las aplicaciones para las que van a ser utilizados. Dentro de este último apartado, se encuentran materiales tan dispares como poli(uretano de metacrilato) (PUMA), resina epoxi SU-8, papel, poli(p-xililano) (Parylene[®]), poli(estireno) (PS), poli(éster) termoendurecible (TPS), tereftalato de poli(etileno) (PET), entre otros [42].

Las microestructuras construidas en estos polímeros también tienen propiedades eléctricas, ópticas, químicas y térmicas adecuadas

para llevar a cabo separaciones y aunque todos ellos, en mayor o menor grado, presentan el inconveniente de su falta de compatibilidad con algunos agentes químicos y biológicos, siempre se puede encontrar un polímero que posea las propiedades adecuadas que requiera el desarrollo de una determinada aplicación. Realmente, el gran inconveniente que presentan los chips poliméricos es la falta de experiencia en su empleo como sistemas de separación [43].

Se han publicado multitud de trabajos en microchips poliméricos sobre separaciones por electroforesis capilar y la mayoría de ellos tienen en común el empleo de agentes para controlar o disminuir el flujo electroosmótico [44]. El origen de la carga superficial que genera el flujo electroosmótico en los microchips poliméricos no está del todo consensuado y existen, de hecho, dos teorías que lo intentan explicar.

Una de ellas establece que el flujo electroosmótico en los microchips poliméricos es debido a las cargas que aportan las impurezas tales como restos de aditivos, agente entrecruzante, fotoiniciadores... que se usan en su proceso de fabricación y que se encuentran en la superficie de los canales del microchip [45]. En este artículo se sugiere también que las cargas pueden aparecer por reacciones que se producen en el material con el tiempo, como por ejemplo reacciones de oxidación o por la adsorción de moléculas del tampón o de la muestra durante su empleo. Son varios los trabajos que apoyan esta teoría, un ejemplo de ello, representa el artículo de Sikanen y colaboradores, en el que se explora el uso de chips de SU-8 y se sugiere que las cargas que se encuentran en la superficie de los

Introducción

canales pueden ser debidas a restos de complejos de hexafluoroantimoniato, que se usa como fotoiniciador en el proceso de fabricación [46].

La otra teoría propone que los microchips poliméricos poseen flujo electroosmótico debido a la adsorción de los grupos hidroxilo, procedente de la autólisis del agua sobre la superficie hidrófoba de los canales poliméricos [47]. Éste fenómeno es conocido desde el siglo XIX, cuando se observó que los grupos hidroxilo se adsorbían preferentemente sobre burbujas de aire, confiriendo carga negativa a éstas en su superficie [48]. Este origen del flujo electroosmótico explicaría por qué los microchips poliméricos independientemente del material del que estén fabricados presentan, la mayoría de ellos, un valor de punto isoeléctrico entre 3 - 4 con variaciones sutiles entre ellos [49].

A este respecto, los microchips de vidrio ofrecen la ventaja frente a los poliméricos, que su comportamiento superficial es más conocido que el de los construidos con materiales poliméricos. Así como también presentan una mayor homogeneidad en sus características entre lotes, mientras que esto puede no ocurrir en el caso de los microchips de plástico donde puede haber variaciones en la composición de los aditivos que se usan para fabricarlos entre lotes y marcas de microchips [34].

1.2.2. Métodos de fabricación de microchips poliméricos

Como anteriormente se mencionó, la rápida expansión de estos sistemas microfluídicos ha ido asociada a la aplicación de técnicas ya existentes de microfabricación adaptadas a las características del material a emplear y al desarrollo de otras nuevas que permiten obtener una mayor precisión y una menor rugosidad superficial en la elaboración de los microcanales.

Para la fabricación de microchips de vidrio se usan técnicas de fotolitografía estándar sobre obleas de vidrio [50] utilizando una fotomáscara que define la forma, posición, y tamaño de los canales y pocillos del microchips. Este procedimiento conlleva diferentes etapas, haciéndolo bastante largo y tedioso, además de utilizar en la fabricación reactivos altamente tóxicos. El método general de elaboración se resume en la siguiente serie de pasos:

- **deposición** sobre la oblea de vidrio de una capa sacrificial (Cr/Al),
- deposición del **material fotosensible** sobre la capa anterior,
- **exposición** del material fotosensible a la luz en la región definida por una fotomáscara, la cual protege las zonas que no se quieren litografiar,
- **endurecimiento** del material fotosensible no expuesto a la luz,

Introducción

- **retirada** por medio de una disolución reveladora del material expuesto y la capa sacrificial,
- **grabado en vidrio** de la estructura creada en el material fotosensible por medio de una disolución cuyo reactivo principal es el ácido fluorhídrico,
- **retirada** de la capa de material fotosensible y de la capa sacrificial y perforación de los pocillos del microchip,
- **sellado** de los microcanales creados con otra oblea de vidrio.

La obtención de microchips poliméricos se puede realizar a partir de diversos métodos de fabricación, algunos de los cuales requieren la creación de un molde, de manera que después se pueden fabricar los microchips en grandes cantidades (replicación); y otros métodos que son útiles para crear prototipos y permiten fabricar pequeñas cantidades de microestructuras a un precio razonable [39, 51-53]. A continuación, se describen los métodos de fabricación de microchips poliméricos más habituales empezando por los métodos que no utilizan un molde (métodos sin replicación) y terminando por los métodos de replicación.

1.2.2.1. Métodos sin replicación

Fotolitografía

Esta técnica es apropiada para polímeros que precisan de luz ultravioleta para su polimerización. Un polímero adecuado para esta

metodología es el SU-8, cuyos monómeros poseen ocho unidades de grupos epóxido y está basado en compuestos de bisfenol A, los cuales en presencia de luz ultravioleta experimentan un proceso de polimerización catiónica.

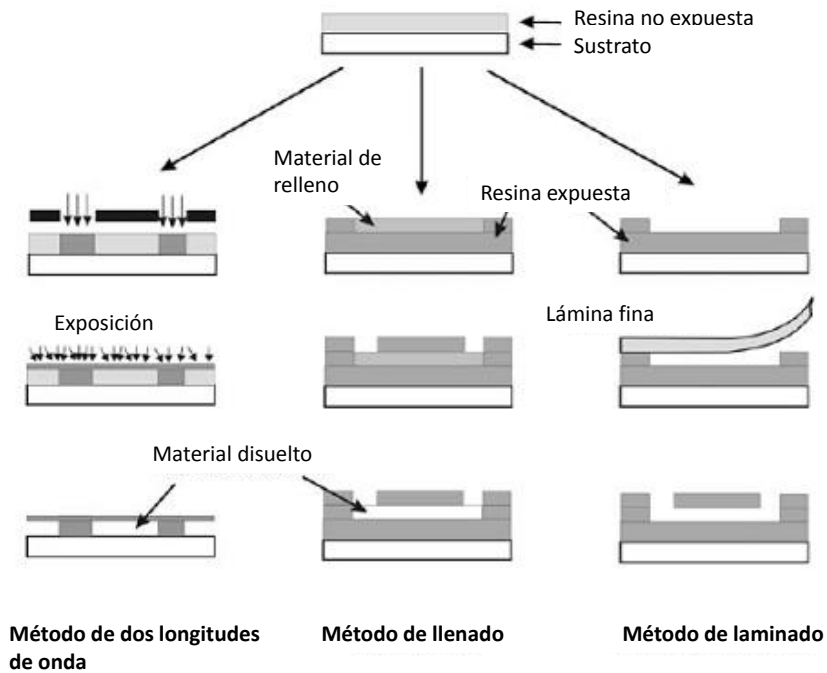


Figura 1. Esquema de varios procesos de fotolitografía utilizados para cerrar los microcanales. Figura obtenida de [51].

La manera de proceder es la siguiente. Primeramente, una lámina de la resina o material fotosensible se deposita, sobre una lámina de silicio o de vidrio, con ayuda de la fuerza centrífuga (*spin coating process*), y a continuación la lámina es pre-cocida para endurecerla y evaporar el disolvente. Después, se realiza la estructura que se quiere diseñar en el material empleando para ello una fotomáscara, la exposición a la luz UV, cocido y la disolución posterior

Introducción

del polímero no expuesto a la radiación con un disolvente orgánico (fotolitografía positiva). De esta forma, se crean microcanales abiertos (en un proceso fotolitográfico análogo al del vidrio). Para cerrar estos microcanales y terminar de crear la estructura tridimensional de los microchips existen tres procedimientos (ver fig. 1):

i) El método de llenado (*fill process*): Se añade una segunda capa sacrificial, de Araldite u otro material fotoresistente, sobre la estructura de los canales, que los rellena y permite crear una superficie lisa sobre la que, a su vez, se añade una segunda capa de resina. Esta segunda capa de resina se expone a la radiación UV como en el paso anterior (fotolitografía), de manera que se cierra el microcanal y se obtiene la estructura deseada. Esta última capa presenta los orificios que conectan los canales con el exterior y que permiten la entrada del disolvente adecuado para eliminar la capa sacrificial que rellena los canales.

ii) En el método de laminado (*lamination process*), se emplea una lámina fina de SU-8 seco u otro material para cerrar el canal. Para ello se aplica sobre esta lámina calor y presión siendo, por tanto, este procedimiento más simple que el anterior.

iii) Por último, el tercer método se aprovecha de la diferente densidad óptica (o capacidad de penetración de la radiación) que presenta el SU-8 (*two wavelength process*) frente a radiaciones UV de longitud de onda diferentes. En este caso, se expone el material primeramente a una radiación de longitud de onda de 365 nm, usando una máscara, de forma que así se crea la estructura de canales en la resina. Seguidamente, se expone el material, ya sin máscara, a una

radiación de menor longitud de onda, 254 nm. De manera que, como esta radiación es menos penetrante, solamente queda expuesta la parte más externa de la lámina de SU-8, obteniéndose así microestructuras con canales cerrados. Después, se elimina el SU-8 no expuesto o no polimerizado mediante una disolución reveladora.

Estereolitografía

Este procedimiento permite crear estructuras con tan sólo incidir sobre la resina líquida los haces de dos láseres de alta intensidad. De esta forma, se consigue que sólo en el punto donde confluyen los dos haces se produzca la polimerización de la fotoresina obteniéndose en poco tiempo los microchips, lo cual es útil para realizar prototipos. Este método presenta como inconveniente que la superficie de los microcanales puede ser bastante rugosa, en función de la precisión a la hora de posicionar los haces, y, además, los materiales apropiados para esta metodología son escasos.

Ablación láser

En este proceso los canales se forman por destrucción del material polimérico cuando se hace incidir sobre su superficie pulsos de radiación de alta intensidad de un láser (frecuencia de los pulsos $10\text{-}10^4$ Hz). De esta manera, en el punto donde incide el haz se destruye el material creándose los canales. Para realizar el diseño de los microcanales, se puede hacer uso de una máscara que proteja las zonas que no se quieren irradiar. Este método presenta problemas de

Introducción

rugosidad superficial en los canales al igual que el anterior, y además debido a la interacción del material con la luz intensa se pueden producir alteraciones en las propiedades químicas de la superficie de éstos, ocasionando problemas de reproducibilidad entre microchips.

Otros métodos adecuados para la fabricación de microestructuras en pequeñas cantidades y de forma rápida sin la limitación de que el polímero sea fotosensible son *precision machining* (mecanizado de precisión) y el grabado con plasma.

Mecanizado de precisión (*Precision machining*)

Este procedimiento implica el mecanizado directo del polímero, lo cual ha sido posible gracias a la disponibilidad de maquinaria altamente precisa. Por la razón anterior, el diseño se puede transferir rápidamente a la oblea pero presenta el problema de que el proceso es demasiado largo para ser empleado en la fabricación de grandes cantidades de microchips.

Grabado con plasma

Esta metodología permite fabricar microestructuras empleando un tiempo razonable de preparación para cada una de ellas, ya que se puede disponer de una amplia variedad de sistemas de plasma. Aunque presenta como inconveniente que requiere el empleo

de una máscara, comúnmente de metal, para definir la estructura de los canales.

1.2.2.2. Métodos de replicación

La producción comercial de microchips requiere el empleo de tecnologías que permitan fabricar grandes cantidades de microestructuras, con buena reproducibilidad y en un intervalo corto de tiempo. Para ello, los procedimientos anteriormente descritos no resultan válidos y surgen entonces los métodos de replicación. Estos métodos tienen como común denominador la necesidad de un molde con la estructura complementaria a la que se desea crear en los polímeros. Estos métodos engloban los siguientes procedimientos:

Grabado en caliente (*Hot embossing*)

En este método, se calienta el material polimérico a vacío hasta una temperatura justo por encima de la temperatura de transición vítrea (T_g). Por otro lado, el molde se calienta a la misma temperatura o un poco superior. Seguidamente el molde caliente se presiona sobre el material polimérico y a continuación, ambos se enfrían homogéneamente a temperatura inferior al T_g del polímero y se separan. Es un método bastante sencillo, rápido y que presenta una gran precisión entre las microestructuras creadas y el molde, lo cual lo hace útil tanto para la investigación como para la industria. Sin embargo, presenta la dificultad de que tiene que haber un estricto control sobre la temperatura, de forma que ésta sea uniforme en toda

Introducción

la estructura; sobre el vacío para que no se formen burbujas en el polímero; y sobre la compatibilidad entre el molde y el material polimérico, con el fin de que no haya problemas de pegado del polímero al molde.

Microtermoformado (*Microthermoforming*)

En este caso, una lámina delgada de material polimérico, normalmente de espesor inferior a 50 μm , se sujeta a un molde que tiene grabada en una cara la microestructura. La lámina entonces se calienta hasta una temperatura 10 $^{\circ}\text{C}$ superior a la T_g y se presiona contra el molde con una presión entre 40-60 bar. Posteriormente, se enfría el sistema hasta unos 20 $^{\circ}\text{C}$ por debajo de T_g y se separan. Este método, aunque es rápido y simple, tiene el inconveniente de que la precisión en las estructuras no es tan buena como la que se obtiene con el grabado en caliente, aunque sí suficiente cuando el tipo de microestructuras que se quiere crear son redondeadas (canales con sección semicircular).

Moldeado por inyección (*Injection molding*)

Este método resulta especialmente adecuado para fabricar microchips de estructuras muy diversas siempre que se trate de un polímero termoplástico. En este caso, el polímero es introducido en forma sólida dentro de la maquinaria de inyección y mientras se transporta hacia el punto donde se inyecta, es fundido a una temperatura entre 200-350 $^{\circ}\text{C}$. A continuación, se inyecta a alta

presión en el molde que tiene la estructura de canales. Luego, se enfría el conjunto lentamente y así el polímero se va endureciendo y; ya una vez duro, se retira el microchip del molde. Este procedimiento permite la fabricación de una gran cantidad de microchips en un espacio de tiempo muy corto, habitualmente entre 30 s y 2 minutos por chip, siendo, por tanto, el método más adecuado para la fabricación en masa.

Una variante de este método consiste en llenar completamente el molde haciendo uso de un pistón para impulsar el polímero fundido. De esta manera, se acelera el proceso empleándose entre 5 – 10 s por chip y consiguiéndose una precisión similar a la obtenida por *hot embossing*, grabado en caliente. Esta instrumentación fue desarrollada inicialmente para la fabricación de CDs y, posteriormente, se ha aplicado a la fabricación de microestructuras.

Litografía suave (*Casting*)

Este método permite fabricar microchips de una forma rápida, flexible, con bajo coste y con una gran precisión en la estructura. Al igual que el anterior, se precisa que el polímero sea termoplástico. El endurecimiento del polímero es químico, ya que se mezcla el polímero con un endurecedor o agente de entrecruzamiento, normalmente diez partes del polímero elastómero con una parte de agente de curado. El agente endurecedor suele ser un compuesto organometálico que hace que se entrecruce el material y se obtenga la estructura

Introducción

tridimensional. La mezcla líquida de estos dos componentes se vierte sobre el molde, de manera que el polímero toma su forma después de un tiempo a temperatura y presión atmosféricas. Finalmente, se desmolda el polímero; la duración de este proceso puede disminuir si el curado se realiza a temperaturas superiores a la ambiente. Para prevenir la presencia de burbujas en las microestructuras, normalmente la mezcla se desgasifica antes de la etapa de curado. Este método ha sido ampliamente usado para polímeros como el PDMS, el cual una vez obtenida la estructura de microcanales se puede sellar fácilmente sobre una superficie lisa del vidrio o sobre otra plancha plana de PDMS.

1.2.2.3. Sellado de los canales del microchip

En todos los métodos de fabricación, salvo en el método de fotolitografía que emplea dos longitudes de onda UV diferentes, se obtienen microcanales abiertos, que hay que sellar. Para ello, se realiza una etapa de pegado de una cubierta que cierra los microcanales, igual que se hacía para los microchips de vidrio.

El sellado se puede llevar a cabo de diferentes modos:

Pegado de una lámina mediante pegamento

Este procedimiento tiene el riesgo de que el pegamento penetre el interior de los canales y los obstruya, además de poder

alterar el flujo electroosmótico del capilar. Por ello, el tipo de adhesivo utilizado debe tener una alta viscosidad.

Pegado de la lámina protectora de forma térmica (termosellado)

Se calientan juntos el microchip con los canales y la lámina de sellado a una temperatura superior a la T_g mientras se aplica presión al conjunto, de manera que se funde la superficie de contacto de los dos materiales y se sella el chip de forma irreversible. Este procedimiento es usado en el sellado de los microchips de PMMA y mientras se realiza se deben cuidar las condiciones para que no se produzcan deformaciones de las estructuras creadas.

Adhesión directa

Esta forma de sellado es característica de los elastómeros como el PDMS. En este caso, los canales se sellan de forma reversible simplemente al ponerlos en contacto con la superficie lisa y limpia del vidrio y así se consigue un sellado suficientemente fuerte, siempre que no se apliquen altas presiones al dispositivo microfluídico.

Pegado mediante plasma

Este procedimiento es usado, como en el caso anterior, cuando se trata de PDMS. Permite sellar los canales de forma más fuerte gracias al uso de un plasma de oxígeno que oxida la superficie de PDMS, de manera que se generan grupos silanoles, los cuales

Introducción

interaccionan fuertemente con la superficie de la cubierta de sellado. Esta unión se debilita con el paso del tiempo teniéndose que repetir el proceso para volverlo a sellar.

Pegado por disolvente

En este caso, se unen las dos partes del microchip de forma irreversible y, para ello, se cubren con un disolvente los dos componentes. De esta forma, se consigue que se creen enlaces entre las dos partes al evaporarse el disolvente y solidificarse nuevamente.

Soldadura por ultrasonidos

Consigue el cierre del microchip gracias a la energía térmica que poseen las moléculas en la zona de contacto transferida por la acción del ultrasonido.

Soldadura mediante láser

Al igual que en el método anterior, se necesita que las moléculas de la interfase tengan más energía y, en este caso, la fuente es la radiación de un láser, siendo lo más usado un diodo láser con emisión infrarroja. De manera que, la radiación del láser debe transmitirse a través de una las capas de polímero y ser absorbida por la segunda capa cerca de la interfase de ambas. Por tanto, se precisan dos polímeros con coeficientes de absorción diferentes de la radiación.

Este procedimiento presenta como ventaja que el tiempo empleado es bastante corto.

Es necesario puntualizar que las dos últimas técnicas de soldadura resultan de utilidad cuando se trata de soldar pequeñas superficies, ya que la aplicación de estos modos de radiación de manera eficiente sólo se puede realizar en una sección pequeña. Debido a esto, su uso para la preparación de microchips ha sido escaso [54].

1.2.3. Principales modos de electroforesis capilar en microchips

Existen diversos modos de electroforesis capilar, los cuales han sido transferidos con éxito a la electroforesis en microchips. De una manera general, estos modos se pueden agrupar en cuatro tipos:

Electroforesis capilar en zona libre

Es la separación de moléculas en función de su relación carga/tamaño mediante la aplicación de un campo eléctrico a un canal lleno de tampón de separación, generalmente acuoso. En este modo, la movilidad propia de los analitos viene definida por su carga eléctrica, su radio molecular y la viscosidad del medio de separación. Además del movimiento de las moléculas de analito dentro del campo eléctrico, existe también la contribución al desplazamiento de éstas debido al flujo electroosmótico; el cual origina el movimiento de todo

Introducción

el líquido del interior del canal de separación como consecuencia de las cargas que existen en la pared interna de éste; este movimiento es independiente de las propiedades de cada molécula. La suma de ambos efectos controla el movimiento de los analitos en el interior de los canales de separación [55].

Electroforesis capilar con polímero de cribado

En este modo de electroforesis, la separación de los analitos se produce en función de su tamaño, al pasar éstos a través de un tamiz molecular. Dicho tamiz molecular se puede conseguir mediante varias estrategias. Una de ellas es introducir una disolución que contiene un polímero que se entrecruza creando un entramado en el interior del canal de separación del microchip [56], otra es la de usar monolitos porosos que permitan separar las proteínas al pasar a su través [57] y la última es mediante el empleo de un polímero de cribado en el tampón de separación, de manera que ese polímero a una concentración igual o superior a la concentración de interacción de sus cadenas (*entanglement point*) actúa como tamiz haciendo que los analitos de mayor peso molecular se desplacen más lentamente que los de menor tamaño [58]. En este aspecto, también se han estudiado multitud de polímeros (poli(acrilamida), derivados de celulosa...) que permiten obtener un tamiz apropiado a la separación a realizar.

Para que el único agente discriminante que actúe sea la diferencia de tamaño de los analitos es necesario que todos ellos presenten la misma relación carga/masa. Lo anterior se consigue por

la adición de un tensioactivo iónico, como es el dodecilsulfato sódico, que se une a los analitos confiriéndoles carga de forma proporcional a su peso molecular, de manera que la carga final no depende de la carga propia de cada macromolécula. En este modo de separación es preciso suprimir el flujo electroosmótico ya que si lo hubiera, el polímero de cribado se movería con la consecuente pérdida de eficacia en la separación, con este fin se usan agentes de recubrimiento del canal [59].

Cromatografía electrocinética micelar

Este tipo de separación electroforética se basa en la diferente interacción de los distintos analitos con las micelas presentes en el tampón, las cuales actúan como una fase pseudo-estacionaria. Las micelas se originan al añadir un tensioactivo en concentración superior a su concentración micelar crítica al tampón. La separación se lleva a cabo gracias a la diferencia de coeficiente de reparto de los analitos entre la micela y el medio que lo rodea, permitiendo la separación de analitos tanto neutros como cargados [60].

Isoelectroenfoque

En este modo de electroforesis capilar, la separación de las moléculas, principalmente proteínas, se lleva a cabo en función de su punto isoeléctrico. Para ello, se genera un gradiente de pH a lo largo del canal de separación por la aplicación de un campo eléctrico a una disolución de anfólitos contenida en este canal, de manera que los

Introducción

analitos se mueven hasta que alcanzan la banda que posee un pH igual a su punto isoeléctrico. A continuación, las bandas focalizadas son movilizadas hacia el detector ya sea por presión o por movilización química [55]. Al transferir este modo de separación a microchips una de las dificultades que surge es conseguir un gradiente de pH estable, lo cual puede conllevar un aumento de la temperatura debido al efecto Joule durante la etapa de focalización. Además, para que no se produzcan alteraciones en el gradiente de pH es necesario que el EOF se encuentre suprimido, ya que por el contrario la focalización de los analitos obtenida se destruiría o se vería impedida.

Electrocromatografía

La electrocromatografía es un modo híbrido entre la electroforesis y la cromatografía, en el que el electrolito de fondo es conducido a través de una fase estacionaria por electroósmosis en vez de por presión [6]. Los analitos se separan en función de su movilidad electroforética y del coeficiente de reparto entre la fase estacionaria y la fase móvil, lo que proporciona una mayor eficacia de la separación y selectividad [61]. Para ello dentro del microchip se produce la fase estacionaria in situ, gracias a técnicas de empaquetado usando nanopartículas o partículas de sílice de tamaño inferior a una micra. Este modo de separación en microchips de electroforesis resulta muy apropiado para las separaciones de analitos quirales.

Isotacoforesis

En este modo de separación la muestra es introducida entre un electrolito frontal con mayor movilidad que los analitos y otro terminal con menor movilidad que éstos. De esta forma, durante la electroforesis los analitos, que poseen movilidades intermedias entre los electrolitos frontal y terminal, se ordenan en bandas, migrando a la misma velocidad que el electrolito terminal hacia el electrodo correspondiente [62].

1.2.4. Modos de inyección en microchips

La electroforesis capilar en microchips se puede llevar a cabo de la misma forma que en los instrumentos convencionales aunque hay diferencias notorias en el modo de inyectar la muestra. Mientras que en electroforesis capilar convencional se usa tanto la presión como la electromigración, en los microchips la muestra se suele introducir por electromigración, haciendo uso de inyectores integrados en la microestructura que permiten introducir volúmenes de muestra muy pequeños de forma muy reproducible, lo que conduce a una gran eficacia en la separación [63].

Los inyectores integrados en el propio chip están formados por el cruce ortogonal del canal de separación con el canal de inyección, el cual conecta el reservorio de muestra con el de desecho de muestra (inyector en T). Existen también otro tipo de inyectores bastante usados, llamados de doble T; en este diseño las dos partes del canal de

Introducción

inyección, a uno y otro lado del canal de separación, están desplazadas una respecto a la otra, unas 100 μm . Con estas configuraciones se puede inyectar de tres maneras distintas: *unpinched* [64-67], *pinched* [50, 64, 66, 68] y *gated* [34, 50, 64, 69].

A continuación, se describen brevemente estos tres modos de inyección esquematizados en la figura 2, comentándose también sus ventajas y limitaciones:

Unpinched (figura 2 A)

Para la inyección se aplica un alto voltaje al reservorio de muestra (S) durante un tiempo corto manteniendo el depósito de desecho (W) conectado a tierra. Los otros dos reservorios, que corresponden al reservorio de desecho de muestra (SW) y al de tampón de separación (BR), no están conectados ni a una fuente de alimentación ni a tierra, están flotando. Transcurrido este tiempo, se aplica un voltaje al reservorio BR, y se deja conectado a tierra el depósito W, mientras los otros dos reservorios restantes flotan; así se realiza la separación. Este tipo de inyección, que es el más sencillo, sería el equivalente a la inyección por electromigración que se realiza en los equipos convencionales de electroforesis capilar. Esta inyección tiene el inconveniente de ser poco reproducible y de introducir grandes volúmenes de muestra, lo que genera menores eficacias en la separación. Además, presenta el problema de favorecer el enriquecimiento del bolo de muestra en aquellos analitos que tengan más movilidad, frente a los de menor movilidad, haciendo que el bolo

de inyección no sea completamente representativo de la composición original de la muestra.

Pinched (figura 2 B)

Durante la inyección se aplica un alto voltaje al reservorio de muestra (S), mientras el depósito de desecho de muestra (SW) está conectado a tierra. Durante el paso de la muestra a través de este canal, se aplica un pequeño voltaje en los otros dos reservorios (BR y W) así se genera también un flujo electroosmótico hacia el reservorio SW, que impide la difusión de la muestra hacia el canal de separación y a la vez comprime la vena líquida de la muestra. La etapa de separación se realiza aplicando una diferencia de potencial entre el reservorio BR y el depósito W, el cual se conecta a tierra. Durante la inyección los reservorios S y SW aplican un potencial menor que el de BR, de tal manera que el flujo electroosmótico que desde BR se dirige hacia ellos permite empujar el exceso de muestra hacia esos reservorios. Así se pueden introducir pequeños volúmenes de muestra sin discriminación entre analitos, obteniendo bandas de muestra muy estrechas.

Gated (figura 2 C).

En este modo de inyección, el uso de los reservorios es distinto respecto a los dos anteriores ya que las posiciones de BR y S se intercambian. Consta de dos etapas. En la primera (carga/separación), se aplica un voltaje en el depósito que contiene la muestra (S), un

Introducción

voltaje superior en el depósito del medio de separación (BR), un voltaje inferior en el depósito de desecho de muestra (SW) y se conecta a tierra el depósito de desecho (W). De esta manera, se crea un flujo de la muestra hacia el depósito SW y del tampón de separación hacia los depósitos SW y W, evitando que la muestra entre en el canal de separación. En la segunda etapa (inyección) los depósitos de desecho de muestra (SW) y de tampón (BR) están flotando, se aplica un voltaje al depósito de muestra (S) y se conecta a tierra el de desecho (W). Así, la muestra entra en el canal de separación. A continuación, se restablece de nuevo la distribución de voltajes original (carga/separación) y la muestra que ha entrado en el canal de separación se dirige hacia el pocillo W, mientras se realiza la separación de la misma. Este modo de inyección presenta una mayor reproducibilidad que el protocolo *unpinched* pero también discrimina a los analitos en función de su movilidad electroforética.

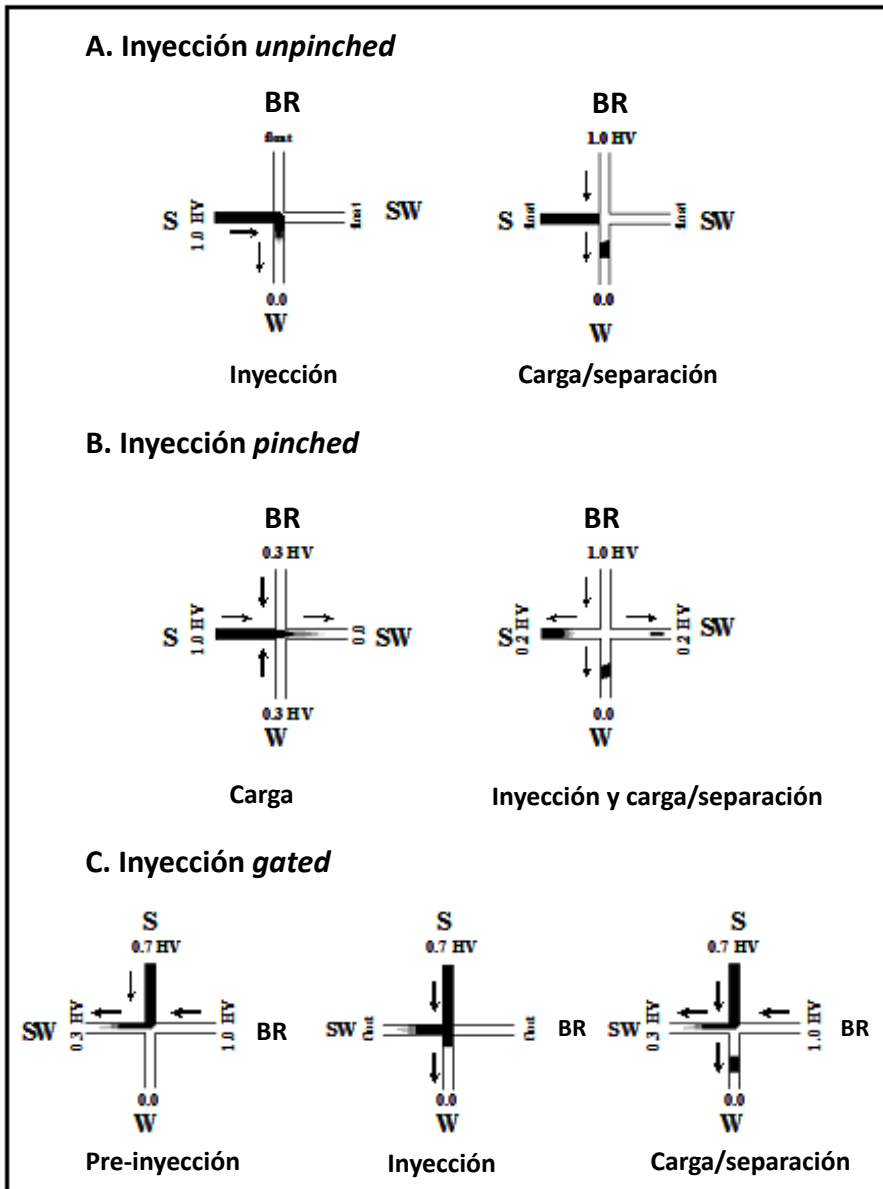


Figura 2. Modos de inyección electrocinética en microchips: (A) *unpinched*, (B) *pinched* y (C) *gated*, (BR) depósito del medio de separación, (S) depósito de muestra, (SW) depósito de desecho de muestra, (W) depósito de desecho. Figura obtenida de [50].

Introducción

1.2.5. Detección en microchips

Como en los sistemas electroforéticos convencionales, la detección en microchips para electroforesis capilar es un elemento esencial de la instrumentación en el que se está investigando intensamente. El objetivo de esa investigación es desarrollar un sistema que permita alcanzar una elevada sensibilidad pero con un tamaño reducido, compatible con la idea de conseguir un sistema portátil. En esta línea, se están desarrollando principalmente detectores basados en técnicas fluorimétricas, las cuales son altamente sensibles, y técnicas electroquímicas, fácilmente miniaturizables. Aunque ambas técnicas de detección carecen de la universalidad que sería deseable.

También se está trabajando en el acoplamiento de los microchips a la espectrometría de masas, por la información que esta técnica es capaz de dar sobre la estructura de los analitos, aunque su miniaturización es más problemática [70, 71].

Detección electroquímica

Existen diferentes modos como son la potenciometría, amperometría y la conductimetría. La amperometría es el modo de detección más usado en los microchips de electroforesis y se basa en la medida de la variación de la corriente que resulta del proceso de oxidación o reducción de los analitos electroactivos sobre el electrodo de trabajo. En este modo de detección se usa un potencióstato para aplicar un potencial constante al electrodo de trabajo relativo al

electrodo de referencia, de forma que la corriente generada por la reacción redox sobre el electrodo de trabajo es proporcional al número de moles de analito que se han oxidado o reducido sobre su superficie. La eficacia y selectividad de la detección amperométrica en microchips de electroforesis depende principalmente de la cinética del electrodo. En este sentido detectores amperométricos pulsados permiten obtener mayores sensibilidades que los que aplican un potencial constante [72, 73]. Este modo de detección presenta una buena sensibilidad (inferior al orden μM) pero no es un detector universal ya que solamente los analitos con propiedades redox pueden ser detectados. Otro modo de detección electroquímica es la detección conductimétrica, la cual mide la conductividad que existe entre dos electrodos que están en contacto con el líquido dentro del canal, de manera que al pasar los analitos esta conductividad se modifica respecto al tampón de separación permitiendo la detección de los mismos. Este modo de detección es universal para las especies cargadas, sin necesidad de usar cromóforos o fluoróforos, y en ella se utilizan electrolitos de fondo que tengan baja conductividad y así conseguir un mayor rango dinámico para detectar los analitos. Los detectores que se usan pueden ser electrodos de contacto o de acoplamiento capacitativo que no requieren contacto (*Capacitive Coupling Contactless Conductivity Detection C⁴D*), los cuales se está incrementado su uso en separaciones en microchips de electroforesis ya que permiten evitar los problemas derivados del deterioro del electrodo y del electrolito de fondo [74] pero presenta una sensibilidad inferior a la detección amperométrica [75]. En general, la detección electroquímica tiene como ventaja respecto a la detección

Introducción

fluorimétrica que es más fácilmente miniaturizable ya que sólo se necesita una serie de electrodos para llevarla a cabo, pero los límites de detección que se alcanzan no son tan bajos como en la fluorescencia [76, 77]. En este sentido se está realizando una intensa investigación en la mejora de los límites de detección [78, 79].

Detección por fluorescencia

Se basa en la medida de la radiación luminosa que emiten los analitos al ser excitados por una fuente de luz, generalmente, en la región visible del espectro. Como fuentes de excitación en microchips se utilizan principalmente una lámpara de vapor de mercurio o un láser. El empleo de lámparas de mercurio se debe a que es habitual utilizar microscopios de epifluorescencia, los cuales usan estas fuentes de excitación, como plataformas para llevar a cabo la detección por fluorescencia en microchips. Sin embargo, aún a pesar del elevado precio de los láseres, es la fluorescencia inducida por láser (LIF) el modo de detección más empleado por su enorme sensibilidad alcanzándose límites de detección inferiores al orden nM [80-82]. En los últimos años, se ha extendido el uso de diodos emisores de luz (LED) como fuentes de excitación gracias a que se ha avanzado enormemente en el desarrollo de LEDs más estables, con mayor brillo y con una amplia variedad de longitudes de onda en la región del visible y algunas en el UV y, además, se encuentran disponibles comercialmente. Entre las características más interesantes de los LEDs hay que destacar su pequeño tamaño, su bajo coste y su larga duración pero presentan el hándicap de que los límites de detección

alcanzados con esta fuente de excitación (orden μM - nM) todavía distan mucho de los obtenidos mediante LIF [83, 84].

El principal inconveniente de este tipo de detección es la necesidad de emplear técnicas de derivatización para hacer fluorescentes los analitos ya que, en la mayoría de los casos, éstos no lo son por sí solos o, bien, son fluorescentes a unas longitudes de onda muy pequeñas (UV), siendo para ello necesario el uso de láseres bastante costosos [85]. Durante el marcaje fluorescente se puede producir, en función del mecanismo de unión de la sonda fluorescente a la proteína, la unión de múltiples unidades de sonda a una misma proteína, obteniéndose por tanto múltiples especies para un mismo analito complicando la separación [82]. Otra de las dificultades para derivatizar los analitos radica en la baja concentración en la que suelen estar presentes éstos en la muestra. Esta baja concentración provoca que los tiempos de reacción sean demasiado largos para ser utilizados, al ser las velocidades de reacción lentas.

Detección quimioluminiscente y electroquimioluminiscente

La quimioluminiscencia es la producción de luz mediante una reacción química. En presencia de un catalizador, los reactivos reaccionan para formar un intermedio excitado, el cual al transformarse libera la energía en forma de un fotón de luz, al volver al estado fundamental. La luz emitida puede ser tanto en la zona del ultravioleta del espectro, como la visible o infrarroja, pero lo más habitual es la visible. La diferencia entre ambos modos de detección es

Introducción

que mientras la quimioluminiscencia se refiere generalmente a reacciones químicas de compuestos que son especies muy oxidadas (ej. peróxido de hidrógeno), la electroquimioluminiscencia es la luz obtenida al producirse una reacción debido al uso de una corriente eléctrica. Estos modos de detección están bastante menos empleados en separaciones en microchips, aunque se han hecho algunos trabajos debido por ejemplo a la elevada sensibilidad, comparable a los detectores de LIF y espectrofotómetros de masas, y a la pequeña cantidad de muestra que se necesita [86, 87].

Detector de masas

Este es el detector más reciente que se ha acoplado a los microchips de electroforesis. Este tipo de detección posee una gran capacidad resolutive y de aislamiento de iones, proporcionando información tanto cuali como cuantitativa sobre los analitos separados en el microchips. Sin embargo, el acoplamiento de este detector a los microchips todavía es un área en la que se están realizando intensas investigaciones, que implican desde modificaciones en el diseño de los microchips, como el desarrollo de interfaces capaces de transferir las moléculas en fase líquida desde el microchip a iones en fase gaseosa, así como la miniaturización de este detector a un diseño portátil. En este sentido la integración de la interface de ionización en el microchip es la parte más crucial para obtener una buena reproducibilidad y precisión analíticas en el análisis [88-91].

1.2.6. Aplicación de los microchips a la separación de proteínas

Los microchips de electroforesis capilar se están aplicando en campos muy diversos como son el análisis clínico y forense, el campo alimentario y el medioambiental [4, 92]. Dentro de todas estas aplicaciones, el análisis de biomoléculas ha sido la aplicación que ha experimentado un mayor crecimiento en cuanto al volumen de publicaciones y, en particular, el análisis de proteínas [92].

Las proteínas con interés como biomarcadores de enfermedades se encuentran presentes en los fluidos biológicos, como el suero sanguíneo, a menudo en muy baja concentración, lo que hace que para su detección sea necesario el uso de técnicas muy sensibles como LIF [82, 93]. Este tipo de análisis presenta además el inconveniente de la pequeña cantidad de muestra disponible, lo que hace que la electroforesis capilar en microchips tenga buenas perspectivas futuras en este campo, ya que la cantidad de muestra usada por análisis es teóricamente muy pequeña (nL - pL). Además, esta técnica ofrece excelentes eficacias y tiempos de análisis cortos (habitualmente inferiores a 5 minutos).

A continuación, se van a detallar algunos ejemplos interesantes de separaciones de proteínas, principalmente, en microchips poliméricos, organizados en función del modo de separación utilizado.

Electroforesis capilar en zona libre (CZE)

Este modo de separación es el más simple y rápido de aplicar en microchips y, por ello, es uno de los modos más usados [94]. Pero este tipo de separación presenta como principal inconveniente que cuando se aplica a proteínas se obtienen bajas eficacias y poca resolución. Este problema es debido generalmente a la adsorción de las proteínas sobre las paredes de los canales de los microchips y aunque se produce en todos los materiales que se utilizan para fabricar los microchips, es cierto que algunos tienen una mayor tendencia a la adsorción de proteínas que otros [44].

El modo de evitar este problema ha sido la modificación de las paredes de los canales mediante el empleo de agentes de recubrimiento. De esta manera, se consigue mejorar la reproducibilidad y la eficacia en la separación. Las estrategias que se han seguido son de dos tipos: recubrimientos estáticos y recubrimientos dinámicos, ambas con el objetivo de conseguir canales más hidrofílicos [44, 95]. La principal diferencia entre estos dos tipos de estrategias es que en el recubrimiento estático se une covalentemente el agente de recubrimiento a la superficie del canal, mientras que en el dinámico esa unión no es química sino que es una adsorción física sobre la superficie. Por tanto, en el primer caso se precisa de un proceso tedioso que normalmente implica varias etapas de reacción, mientras que en el recubrimiento dinámico, el adsorbente generalmente va disuelto en el tampón de separación, siendo su aplicación y la regeneración del canal mucho más sencilla. Sin embargo, las eficacias que se obtienen con el recubrimiento

estático suelen ser generalmente mejores que con el recubrimiento dinámico.

A continuación, se describen algunos de los trabajos realizados en microchips de electroforesis capilar que han aparecido en la bibliografía y que emplean este modo de separación.

Organizados en función del tipo de material, se puede diferenciar entre los trabajos que emplearon microchips poliméricos y los que emplearon microchips de vidrio. Dentro del primer grupo se probaron microchips de diferentes polímeros, uno de ellos es el PMMA, el cual ha sido utilizado por diferentes autores para realizar separaciones de proteínas modelo [96, 97]. Se empleó para ello un recubrimiento dinámico de Tween 20 o CTAB y se consiguió la separación de una mezcla de patrones de proteínas en 60 s utilizando detección conductimétrica sin contacto en el primer trabajo [96] y detección LIF en el segundo trabajo [97]. El trabajo de Nii y colaboradores [98] muestra la separación en microchips de PDMS recubiertos de un polímero anfílico de fosfolípidos adsorbido, de las proteínas BSA e insulina con una gran eficacia y resolución respecto a los microchips de PDMS sin tratar. El grupo de Lee y colaboradores ha publicado una serie de artículos donde se ancla químicamente poli(etilenglicol) a la superficie de los canales de los microchips hechos del copolímero poli(glicidil metacrilato)-co-(metil metacrilato), todo ello, empleando distintas metodologías [99, 100]. Gracias al poli(etilenglicol) se redujo tanto la absorción de las proteínas como el EOF, obteniéndose separaciones de patrones de proteínas con buenas eficacias (número de platos por cm del orden de 10^4). A su vez, este

Introducción

grupo, utilizando dicha experiencia previa, modificó la composición de los microchips (microchips fabricados a partir de un copolímero acrílico de poli(etilenglicol) funcionalizado), de forma que ya no fuera necesario la adición de ningún agente de recubrimiento, ni dinámico ni estático, para conseguir separaciones con una buena eficacia [101, 102]. Otro material polimérico usado para fabricar microchips es el poli(éster) termoestable (TPE) [103]. En este trabajo, se consiguió la separación entre *phosducin-like* proteína y *phosducin-like* proteína fosforilada en 40 s empleando para ello un recubrimiento de poli(etilenglicol) y detección LIF. El poli(carbonato) también se ha usado para separaciones en zona libre. Un ejemplo es el microchip de 16 canales que permitió la separación de las proteínas quimotripsinógeno A, citocromo C y seroalbúmina bovina (BSA) en tan sólo 120 s usando para ello detección conductimétrica. En este caso, se utilizó la metil hidroxietil celulosa como agente de recubrimiento dinámico [40].

La mayoría de las separaciones en zona libre llevadas a cabo en microchips poliméricos tienen en común el empleo de proteínas modelo, siendo escasos los esfuerzos que se han realizado para la determinación de proteínas en muestras naturales. Por el contrario, existen varios trabajos donde se determinan proteínas presentes en muestras naturales usando microchips de vidrio. Un ejemplo es el trabajo desarrollado por Wang y colaboradores donde se estudian lipoproteínas en muestras de suero de pacientes con enfermedades coronarias y aterosclerosis usando LIF como sistema de detección [104]. Este análisis se llevó a cabo en 3 minutos, en una longitud de

separación efectiva de 42.5 mm y con una alta eficacia ($N = 2.98 \cdot 10^4$), para ello, se añadió en el tampón de separación una pequeña cantidad de dodecilsulfato sódico (0.02 mM), éste cumple la doble función de recubrir el microchip y aportarle carga a las proteínas. Otro ejemplo, es el trabajo realizado por Fruetel y colaboradores en el que utilizaron el μ Chemlab™, que usa un microchip de sílice fundida junto con detección LIF [105]. En este caso, se determinó junto con otras proteínas modelo, ricina, una proteína que es un potente tóxico y se extrae de semillas de ricino. Esta proteína tiene varias glicofomas diferentes que se consiguen separar en este trabajo en menos de 180 s. En este caso como aditivos del tampón se usó un detergente anfótero (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (DAPS)) en el tampón de ácido fólico. También se han analizado en microchips de sílice fundida las proteínas presentes en muestras de clara de huevo [106]. En este caso, se recubrió el microchip con poli(vinil alcohol) (PVA) y se separaron las proteínas lisozima, conalbúmina y ovalbúmina, que son las mayoritarias en la clara del huevo, en 110 s. Además, hay que hacer notar que no se precisó de ninguna etapa de marcaje fluorescente de las proteínas, ya que se usó un láser con una longitud de onda de excitación de 266 nm, el cual permite excitar la fluorescencia de las proteínas directamente en su forma nativa. Como contrapartida, el empleo de esta radiación de excitación implica el uso de una óptica en el microscopio adecuada que encarece el análisis. La separación en zona en microchips también ha permitido determinar anticuerpos monoclonales con diferentes cargas con un pI en un intervalo de 7 - 10 [107]. Este método permite obtener dichas separaciones en menos de 90 s, consiguiendo unos

Introducción

tiempos de separación entre 8 – 90 veces menores que en los métodos convencionales, manteniendo una resolución similar. En dicho trabajo se realiza un extenso estudio de algunas variables electroforéticas que influyen en la separación de las diferentes variantes de los anticuerpos que difieren en la carga eléctrica. Posteriormente, se aplica al estudio de 4 casos lo que permite demostrar la capacidad que presentan los microchips para la monitorización de la calidad en el desarrollo de los anticuerpos monoclonales.

Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

En este modo de separación la movilidad electroforética de las proteínas depende directamente del tensioactivo que se haya añadido y de su cantidad, ya que éste se une a las proteínas a través de interacciones hidrofóbicas. Este tipo de interacción presenta la ventaja de que puede mejorar la solubilidad de las proteínas y reducir, en la mayoría de los casos, la adsorción de las mismas sobre los canales del microchip. Los tensioactivos más empleados son dodecilsulfato sódico (SDS), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y sus derivados. Sin embargo, este modo de separación está cayendo en desuso en los últimos años debido probablemente a que la unión del tensioactivo, el cual posee carga, a la proteína produce una disminución en la eficacia de la separación [94].

A pesar de lo anteriormente indicado, existen varios grupos que siguen explorando las posibilidades de este modo de separación

en microchips de electroforesis capilar. Por ejemplo, hay dos trabajos donde separan patrones de proteína empleando microchips de PDMS. El primero es un artículo donde se usa SDS a una concentración de 25 mM en el tampón de separación y así se consigue separar varias proteínas modelo (citocromo C, lisozima, ribonucleasa A y mioglobina) en tan sólo 30 s, como sistema de detección se usó la fluorescencia inducida por láser [108]. En este trabajo, además se añadió un modificador orgánico (20 % (v/v) de acetonitrilo) para mejorar la resolución de la separación y se hizo un estudio comparativo muy interesante entre microchips con canal de separación recto o en forma de serpentín (mayor longitud de separación). Este análisis permitió concluir que, aunque dicho método permite realizar separaciones muy rápidas, no es válido para separar mezclas complejas, aun usando un serpentín como canal de separación, ya que la separación alcanza un máximo después de los primeros centímetros de canal y luego no mejora. En otro trabajo, se realizó la separación entre extravidina y una inmunoglobulina G en 130 s [109]. En este artículo, se evaluó el empleo de un líquido iónico funcionalizado, 1-butil-3-metilimidazol dodecanosulfonato ($\text{BMIm-C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_3$, BAS), como agente para formar las micelas y se demostró que los líquidos iónicos mejoran la resolución en la separación de dichas proteínas en microchip de PDMS, además de disminuir la adsorción de las mismas sobre las paredes del canal.

La cromatografía electrocinética micelar también se ha llevado a cabo en microchips de PMMA [93]. En este caso, se usó SDS en una concentración de 14 mM como agente formador de las micelas y la

Introducción

metil hidroxietil celulosa en una concentración de 0.05 % (m/v) como recubrimiento del canal de separación. Este polímero crea un recubrimiento dinámico en las paredes de los canales, haciendo que el valor del flujo electroosmótico sea menor y produciendo una disminución de la adsorción de las proteínas sobre las paredes, lo que genera mejores eficacias en la separación. En este trabajo se separó una mezcla de 10 proteínas modelo usando para ello la separación electroforética micelar combinada con la electroforesis en gel en la primera dimensión de un microchip de 2 dimensiones. Otra separación realizada en microchips de PMMA es la separación bidimensional realizada por el grupo de Soper [110] en la que utilizaron la combinación de electroforesis microcapilar en gel con SDS (SDS micro-CGE) con micro-cromatografía electrocinética micelar (micro-MEKC) para separar las proteínas citosólicas (con derivatización fluorescente) de *Escherichia coli*. La columna en la que se realizaron las separaciones tenía una longitud efectiva de 10 mm y el tiempo de análisis fue de tan sólo 220 s. En este trabajo también se estudió como segunda dimensión la separación por cromatografía electrocinética de microemulsión (mu-MEEKC), la cual conseguía mejores capacidades de pico que la combinación anterior (481 para micro-MEEKC y 332 para micro-MEKC) debido a la mayor eficacia asociada con micro-MEEKC.

Isoelectroenfoque (IEF)

Se han desarrollados también métodos de IEF en microchips para la separación de proteínas, aunque existen dificultades técnicas y la sensibilidad de detección usando monitorización por LIF se ve

limitada por la fluorescencia de fondo de los anfolitos, ofrecen la ventaja de obtener buenas resoluciones [34]. La resolución en la separación llevada a cabo de este modo es independiente de la longitud de focalización de la muestra, siempre que el voltaje aplicado sea suficientemente bajo como para que el efecto Joule no afecte la separación. En este sentido, los microchips tienen aquí una gran ventaja, al permitir realizar separaciones en menor longitud de canal que en los equipos convencionales y, por tanto, en menor tiempo [111]. Una vez se alcanza el equilibrio, las zonas focalizadas se mueven gracias a la acción de unas microbombas o válvulas, de manera que se desplazan hasta el punto de detección [94]. Éste último paso conlleva el inconveniente de que, al tener que movilizar las diferentes zonas, los tiempos de análisis sean más largos y se produzca un ensanchamiento de las bandas, debido a que se pierde parte de la focalización conseguida con el gradiente de pH. Para intentar solucionarlo, se han desarrollado estrategias donde se emplea como sistema de detección una cámara CCD y una fuente de iluminación que permiten monitorizar el canal de separación completo y visualizar simultáneamente todas las bandas [112, 113].

Recientemente, se han realizado trabajos de análisis de proteínas en microchips poliméricos por IEF. Un ejemplo es un artículo donde utilizan microchips de copolímero de ciclolefina (COC) para realizar la separación de seroalbúmina bovina (BSA) y proteína verde fluorescente utilizando la detección por fluorescencia inducida por láser (LIF) [114]. En este modo de separación, se usan aditivos al tampón de separación para disminuir el flujo electroosmótico y poder

Introducción

así conseguir una buena separación. En este artículo, en concreto, se usó la hidroxietil celulosa con este fin, que además evitaba la adsorción de las proteínas sobre las paredes de los canales. Así se consiguió una eficacia en la separación de 0.1 unidades de pH, lo cual demuestra el poder de separación de este tipo de microchips. Se han realizado también esfuerzos en utilizar microchips de PMMA junto con este modo de separación. Por ejemplo, se realizó la separación de BSA, lisozima y anhidrasa carbónica en 160 s, combinado con detección LIF [111]. En dicho trabajo, se utilizó metil celulosa para disminuir el flujo electroosmótico de los canales. A su vez, se demostró que esta metodología puede ser empleada para medir interacciones proteína-proteína. También se han usado microchips de PDMS en isoelectroenfoque (IEF) empleando diferentes disoluciones de metil celulosa para atenuar el flujo electroosmótico y la adsorción de las proteínas sobre los canales. Además, en estos artículos se utiliza una disolución con un porcentaje mayor de metil celulosa en los pocillos para incrementar su viscosidad, de manera que así ésta no se mezcle con la del interior del canal y no se rompa el gradiente de pH [115, 116]. De este modo, se consiguió separar proteínas modelo como la aloficocianina, ficoeritrina y la proteína verde fluorescente en un canal con una longitud de 20 mm y con una resolución entre las dos variantes de la proteína verde fluorescente de 4,68, utilizando para ello 3 etapas sucesivas de isoelectroenfoque, en las que se variaba la longitud del canal y los anfolitos utilizados. El PDMS también se ha empleado para fabricar microchips compatibles con equipos comerciales [117], que se han desarrollado para realizar separaciones de proteínas por IEF en microchips. Un ejemplo es el equipo comercial

protein simple iCE280, que utiliza microchips de vidrio para hacer separaciones por IEF, el método de detección es la absorción de radiación ultravioleta y se registra mediante una cámara CCD que visualiza el canal completo, de forma que no es necesario la movilización de las fases una vez focalizadas. Empleando este equipo comercial se ha realizado el trabajo mencionado anteriormente [117], en el que se separan patrones de 4 tipos de hemoglobina humana (HbA, HbF, HbS, HbC) utilizando para ello un microchip de PDMS. En este artículo, se empleó poli(vinil pirrolidona) como recubrimiento, debido a la alta hidrofobicidad del PDMS, para impedir la adsorción de las proteínas al canal y disminuir el flujo electroosmótico. Además, se utilizó una membrana de diálisis en el pocillo de muestra lo que permitió mejorar la reproducibilidad del método, al disminuir los problemas de presión hidrostática, y facilitar la introducción de la muestra al sistema.

Otro ejemplo de aplicación de IEF a las separaciones de proteínas, fue el desarrollado por el grupo de Kakeji y colaboradores [118]. En dicho trabajo realizaron el análisis de varios productos farmacéuticos cuyo principio activos son anticuerpos monoclonales (bevacizumab, tratuzumab y cetuximab) en microchips de cuarzo por IEF. La evaluación de variantes de carga de cada uno de estos anticuerpos se consiguió en 380 s, adicionando para ello al tampón de separación hidroxipropil metil celulosa (1 %) que ayuda a disminuir el EOF y disminuir la adsorción irreversible de las proteínas a las paredes de los canales. De esta forma, se consiguieron valores de RSD de pl

Introducción

inferiores a 0.25 %, comparables a los obtenidos para las separaciones de este tipo en capilares.

Otro trabajo en el que se ha realizado una separación proteica por IEF utilizando un equipo comercial de microchips fue desarrollado por Vlocka y colaboradores [119]. En este artículo, se llevó a cabo la separación de tres proteínas eritropoietina, bevacizumab e hirudin, las cuales son tres fármacos comerciales, usando el equipo desarrollado por Shimadzu, *MCE-2010*, que utiliza microchips de cuarzo y detección ultravioleta.

Electroforesis capilar en gel (CGE)

Este es el modo de separación que más ampliamente se ha explorado en los microchips de electroforesis capilar para su aplicación a la separación de proteínas. De hecho, la mayoría de los equipos comerciales de microchips de electroforesis capilar emplean esta metodología junto con chips de vidrio para hacer separaciones de biopolímeros.

A continuación, se describen algunos trabajos realizados en microchips poliméricos, donde cabe destacar que en casi todos ellos se han utilizado microchips de poli(metil metacrilato) (PMMA). Un primer ejemplo es la separación por tamaño de las proteínas modelo inhibidor de la tripsina, seroalbúmina bovina (BSA) y β -galactosidasa en microchips de PMMA en tan sólo 60 s [58]. Se utilizó como polímero de cribado una disolución al 5 % de poli(acrilamida) lineal y, además, los microchips estaban recubiertos de poli(etilenglicol) para

disminuir la adsorción de las proteínas. En otro trabajo, se empleó este tipo de microchips pero con un gel de poli(acrilamida) lineal polimerizado en el interior del canal [56]. Este tipo de separación a su vez se combinó en este artículo con una separación previa por isoelectroenfoque, ya que ambas técnicas proporcionan una información muy valiosa en los estudios proteómicos de proteínas intactas, y gracias al diseño del microchip se integró en él la etapa de adición de SDS a los analitos necesaria para realizar la separación por tamaño. En estas condiciones, se consiguió la separación de proteínas de lisados celulares de *E. coli* utilizando detección fluorescente. Otro trabajo donde emplean microchips de PMMA fue llevado a cabo por Lin y colaboradores [120]. En ese trabajo, se separó una mezcla de proteínas modelo usando como agente de cribado una disolución que contenía un 1 % (p/v) de hidroxipropil metil celulosa. El interés de este artículo reside en que los autores pusieron a punto una etapa de preconcentración de la muestra mediante isotacoforesis que permitió la mejora de la sensibilidad en dos órdenes de magnitud.

El grupo de Yoshinobu Baba tiene una larga experiencia en este campo. Este grupo trabaja con microchips comerciales de PMMA, i-chip 3 (*Hitachi Technologies*, Japón), junto con el equipo comercial de microchips de electroforesis capilar (μ CE) de Shimadzu. Con esta instrumentación y detección LIF acoplada, separaron por tamaño BSA y su inmunocomplejo [121]. Combinando este modo de separación con una preconcentración mediante isotacoforesis, consiguieron aumentar la sensibilidad 20000 veces. Como polímero de cribado usaron metil celulosa en una concentración del 1 %, concentración

Introducción

suficiente para crear un tamiz que separara los analitos y a la vez disminuir el flujo electroosmótico y la adsorción de los mismos sobre las paredes del canal. Este polímero también se usó en otro trabajo para separar BSA, amiloglucosidasa e inhibidor de tripsina. Se emplearon condiciones no desnaturizantes y detección fluorescente [122]. En condiciones no desnaturizantes, se analizaron también proteínas modelo empleando como polímero de cribado la poli(vinil pirrolidona) (PVP) junto con magnesio en forma catiónica, obteniéndose así una mejora en la separación de las mismas, al ayudar el magnesio a la estabilización de los puentes entre las distintas cadenas de polímero [123]. En otro trabajo, el grupo de Baba empleó la poli(acrilamida) lineal para separar la mezcla de patrones de lisozima, inhibidor de tripsina y anhidrasa carbónica [124]. En este caso, se utilizó detección LIF con un diodo láser con emisión a 650 nm. Para llevar a cabo esta separación, se realizó previamente una etapa de recubrimiento por secado del microchip con una disolución de metil celulosa. La forma de operar con esta disolución fue llenar con ella los canales del microchip y dejarla secar durante 1 día, de manera que se obtuvo un recubrimiento estático del canal que permitió disminuir el flujo electroosmótico a $1.97 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$, siendo el valor de este parámetro en un microchip sin ningún tipo de tratamiento de $5.86 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$. Sin embargo, este procedimiento presenta como inconveniente que, al secar los canales con la disolución de metil celulosa en su interior, se pueden producir obstrucciones que bloqueen los canales. La misma estrategia de recubrir el canal con metil celulosa, se siguió en otro artículo de estos autores [125]. En este caso, la diferencia estribó en que se usó dextrano como polímero

de cribado, obteniendo disoluciones de baja viscosidad que facilitaron el acondicionamiento de los canales y mejoraron la reproducibilidad.

Por otro lado, existen en el mercado disoluciones comerciales apropiadas para separar proteínas por tamaño. Un ejemplo es el gel SDS 14-200 de *Beckman Coulter*, que ha sido ampliamente utilizado tanto en capilares como en microchips. Este gel se ha empleado para separar una mezcla de aglutinina de germen de trigo, estreptavidina, transferrina, ovoalbúmina, seroalbúmina bovina, concanavalina A, con una eficacia de $4.8 \cdot 10^4$ platos (altura de plato, $H = 0,62 \mu\text{m}$) en microchips de PMMA [93]. El gel de *Beckman Coulter* se empleó junto con una disolución que contenía metil hidroxietil celulosa al 0.05 % (m/v) cuya función era recubrir el microchip para suprimir el flujo electroosmótico. En este artículo, la separación por tamaño estaba acoplada a una separación por cromatografía electrocinética micelar, que ha sido descrita previamente en esta Memoria, para llevar a cabo una separación bidimensional y así se consiguió resolver completamente dicha mezcla compleja de proteínas. Como sistema de detección se utilizó LIF. Osiri y colaboradores también llevaron a cabo una separación bidimensional en microchips de PMMA [126]. Al igual que en el caso anterior, se usó el gel SDS 14-200 para separar por tamaño y la metil hidroxietil celulosa como agente de recubrimiento en la primera dimensión. En la segunda dimensión se llevó a cabo una cromatografía electrocinética micelar, consiguiéndose la separación de una mezcla compleja de proteínas presentes en muestras de suero fetal de ternero.

Introducción

A pesar de todos los intentos de separaciones de proteínas que se han llevado a cabo en microchips poliméricos de electroforesis capilar, la mayoría de este tipo de separaciones se ha realizado en microchips de vidrio. A continuación, se describen brevemente algunos ejemplos de esta clase de trabajos.

Un primer ejemplo es el trabajo de Lin y colaboradores [127], en el que se determinaron los complejos aptámero-proteína de trombina, VEGF165 (factor de crecimiento del endotelio vascular) y PDGF-BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas) en medios celulares, usando microchips de cuarzo con detección fluorescente con LED. En este artículo se utilizó la hidroxietil celulosa como polímero de cribado alcanzando unos límites de detección de 2.03 – 5.15 nM para PDGF-BB y 2,53 – 3.14 nM para VEGF165. Otro ejemplo es la separación de una serie de proteínas patrón (20 - 200 kDa) en un microchip de vidrio, empleando para ello un gel de poli(acrilamida) entrecruzada formado por fotopolimerización en interior del canal de separación [128]. La separación se realizó en un tiempo de 26 s y en una longitud de canal de separación inferior a 2 mm, por lo que la eficacia que se obtuvo fue entre $1.5 - 4 \cdot 10^5$ platos/m. Se empleó detección fluorescente usando como fuente de excitación una lámpara de mercurio. Hatch y colaboradores. también llevaron a cabo la separación de proteínas patrón por tamaño usando un gel de poli(acrilamida) entrecruzada [129]. La originalidad de este trabajo radica en la fabricación de una membrana polimérica estrecha de 50 μm dentro del canal de separación, previa a la zona donde está el gel de separación y con un tamaño de corte de 10 kDa. La función de dicha membrana era preconcentrar la muestra, consiguiendo

umentar la concentración de las proteínas unas 10000 veces. Así se consiguió detectar 50 fM de proteínas (parvalbumina, ovoalbúmina e inhibidor de la tripsina) cuando se realizaron 30 minutos de preconcentración o 1000 con 5 min de preconcentración, como sistema de detección se usó LIF. En otro trabajo realizado en microchips de vidrio se usó la poli(acrilamida) lineal como polímero de cribado dinámico, junto con un recubrimiento dinámico de poli-(N-hidroxietil acrilamida) para suprimir el EOF y disminuir la adsorción de las proteínas sobre los canales. Como en los trabajos anteriores, se separó una mezcla de patrones de proteínas (β -lactoglobulina, anhidrasa carbónica, ovoalbúmina, BSA y β -galactosidasa) y se empleó como tensioactivo, en lugar de SDS como es habitual, ALS (*acid-labile surfactant*) el cual es compatible con espectrometría de masas y abre la puerta a la combinación de estas dos técnicas [130]. En otro trabajo, se estudió la capacidad de resolución del dextrano como polímero de cribado para separar proteínas en microchips de vidrio, recubiertos de poli(acrilamida) lineal [131]. En este caso, la separación por tamaño de la mezcla de proteínas usada como muestra (anhidrasa carbónica, ovoalbúmina, BSA y conalbumina) se combinó también con una etapa de preconcentración previa de la muestra mediante isotacoforesis de manera que se mejoró la sensibilidad 40 veces. Hay un trabajo muy original donde emplean nanotubos de carbono (CNT) como material de cribado. Para ello, se fotopolimerizó una mezcla de nanotubos de carbono con monómeros de polímeros (acrilamida 6 % (p/v), EDMA (etilenglicol dimetil acrilato) 20 % (v/v) y un fotoiniciador DPA (α,α -dimetoxi- α -fenilacetofenona) al 1% (p/v)) en el interior del canal de separación del microchip [57]. De esta forma, se creó un gel de

Introducción

cribado de menor viscosidad que permitió la separación de BSA, caseína e inmunoglobulina G en tan sólo 1 cm de distancia de separación, en lugar de 4 cm que se precisaban para realizar dicha separación con un gel de óxido de poli(etileno). El tipo de detección que se usó fue LIF.

Otro gel comercial que se ha evaluado para separación por tamaño en microchips de vidrio es el gel desarrollado por Bio-Rad. Dicho gel se usó para separar una mezcla de patrones de inhibidor de tripsina, anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa, miosina, BSA y β -galactosidasa en microchips de vidrio recubiertos de poli(dimetil acrilamida) (PDMA) [132]. Este trabajo tiene la particularidad de que se fabricó una membrana porosa de silicato de potasio (KASIL 2130) entre dos canales adyacentes (canal de inyección y canal de preconcentración) lo que permitió preconcentrar la muestra antes de ser inyectada en el canal de separación y aumentar la sensibilidad 32 veces.

Como se mencionó anteriormente, la separación por tamaño ha sido el modo más utilizado por los fabricantes de equipos comerciales de microchips, debido a su robustez en comparación con los otros modos de separación electroforéticos. La mayoría de fabricantes han desarrollado kits completos para realizar los análisis empleando microchips de vidrio. Un ejemplo de equipo comercial que se basa en esta metodología es el *Bioanalyzer* de *Agilent Technologies*, con el que se han desarrollado multitud de trabajos y aplicaciones. Un trabajo destacable es aquel en el que se separan las cadenas ligeras de las pesadas de un anticuerpo y se compara la eficacia que se obtiene

con la obtenida con la técnica SDS-PAGE tradicional [133]. Se observó una mejora en la detección del anticuerpo en dos órdenes de magnitud respecto a la técnica tradicional. También se analizó utilizando esta instrumentación, la pureza de la inmunoglobulina monoclonal recombinante G₄, ya que este tetrámero se puede disociar [134]. Este análisis se realizó empleando tiempos mucho más cortos (45 s) que los que se emplean utilizando la técnica SDS-PAGE tradicional y con un procedimiento mucho menos laborioso. Otro trabajo que merece la pena mencionar, es la determinación de la proteína C reactiva, marcador de asepsia que se utiliza por ejemplo en las unidades de cuidados intensivos [135]. Dicha proteína fue determinada con este equipo comercial, alcanzando una elevada sensibilidad (LOD = 25 ng/μL en muestras de suero y 126 pg/ μL para el patrón, LOQ = 75 ng/μL), y aunque el LOD es peor que el proporcionado por los métodos de ELISA, es lo suficientemente sensible para ser comparado con los métodos de ELISA clínicamente aceptados (1 ng/μL), métodos inmuno-nefelométricos o inmuno-turbidométricos (0.1 ng/μL), ofreciendo una preparación de muestra más sencilla, menos consumo de reactivos y una gran capacidad de análisis (10 muestras/3 h). Previa a la separación por tamaño, se realizó una inmunoprecipitación, con partículas magnéticas recubiertas de proteína G. Otro trabajo interesante fue la determinación de inmunoglobulina A en muestras naturales de fluido cervicovaginal [136]. Se estudió la concentración de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo en estas muestras, demostrándose que era una técnica válida para esta aplicación. Este artículo presentó como novedad la forma de tomar la muestra, ya que para ello se usó una tira

Introducción

de papel que adsorbía el fluido para posteriormente analizarlo. También se han analizado otros tipos de muestra mediante esta instrumentación como orina, lágrimas y suero de rata para determinar diversas proteínas [137-139]. Además, en otro trabajo se compararon los resultados obtenidos con este equipo al analizar proteínas presentes en suero de ratón, con los obtenidos por SDS-PAGE convencional, determinándose que este último método es más lento y con menor reproducibilidad en tamaño desde el punto de vista técnico que el realizado en microchips de separación por tamaño. Sin embargo, hay que destacar que en el caso de la separación por tamaño en microchips es crítica la cantidad de muestra que se utiliza, de forma que se alcance un compromiso entre la detección de analitos de baja concentración, que requiere mayores cantidades de muestra inyectada y la resolución de los picos obtenidos en la separación [140].

Otro equipo comercial de μ CE es el *LabChip 90* de *Caliper Life Sciences*. Este equipo al igual que el de *Agilent* posee también una serie de kits y de microchips para realizar separaciones de proteínas por tamaño. Un ejemplo de su aplicación al análisis de muestras naturales es la desarrollada por Chen y colaboradores, en la que se estudió la calidad de un anticuerpo monoclonal en términos de posibles impurezas presentes [141] Los análisis se llevaron a cabo en un tiempo muy corto, tal y como ocurría en el *Bioanalyzer*, y con un buen límite de detección y de cuantificación de 1 y 3.3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Se realizó también un trabajo de separación de proteínas por tamaño en un equipo $\mu\text{Chemlab}^{\text{TM}}$, que emplea microchips de sílice

fundida y detección LIF, junto con el polímero de cribado comercial SDS 14-200 de *Beckman* [105]. En este caso, se separaron proteínas extraídas de semillas de ricino, las cuales son un potente tóxico. Una característica interesante de este equipo es que usa un microchip con dos canales, lo que permite realizar una separación diferente en cada canal. Concretamente, en este artículo se separaron las proteínas por zona libre en un canal y por tamaño en el otro.

Electrocromatografía (CEC)

La electrocromatografía es un híbrido entre la cromatografía líquida y la electroforesis capilar, en la que en lugar de presión, la fase móvil se mueve a través del canal de separación electroosmóticamente, con lo que se limita el ensanchamiento de las bandas. En esta área la investigación está principalmente centrada en el desarrollo de nuevas fases estacionarias para las separaciones [142]. Un ejemplo de este tipo de separación es el trabajo realizado por el grupo de Wolley [143] en el que separaron las proteínas citocromo C, α -fetoproteína, antígeno carcinoembrionario y HSP90 en microchips de PMMA. Los canales del microchip se recubrieron para formar las columnas de afinidad con una mezcla de polímeros (glicidil metacrilato, poli(etilenglicol) diacrilato y 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona) por fotopolimerización y sobre ellos, se inmovilizaron los anticuerpos de cada una de las proteínas objetivo. El dispositivo desarrollado en este trabajo consiguió detectar dichas proteínas en concentraciones de ng/mL y finalmente también se aplicó al análisis de muestras de suero humano. Otro trabajo en el que

Introducción

utilizaron microchips de plástico para realizar separaciones electrocromatográficas fue el desarrollado por Nge y colaboradores [144]. En dicho trabajo, utilizaron microchips de COC que integraban la concentración y la derivatización de la muestra en la estructura, para la separación de las proteínas BSA y HSP90 (*heat shock protein 90*). La concentración se realizó a través de unos monolitos de butil metacrilato creados en el interior del canal, los cuales retenían más fuertemente a las proteínas derivatizadas que al reactivo en exceso, permitiendo realizar una purificación de la muestra durante su elución. Otro trabajo es el desarrollado por Jemere y colaboradores [145]. Estos investigadores utilizaron microchips de vidrio para la separación por electrocromatografía de las proteínas inmunoglobulina G e insulina derivatizadas fluorescentemente. Para ello se utilizó como fase estacionaria las partículas BIOSEP 2000 recubiertas de un agente hidrofílico para minimizar las interacciones de las proteínas y dejar pocos lugares con carga disponibles. De esta forma se consiguió la separación de las proteínas anteriores en una columna de 2 mm de largo en tan sólo 10 s, con eficacias de $1.39 \cdot 10^6$ platos/m. El grupo de Tsukagoshi y colaboradores [146] desarrolló un microchip que permitió detectar la proteína inmunosupresiva ácida, marcador de cáncer en el suero, que incorporaba un inmunoensayo y detección quimioluminiscente. La fase estacionaria estaba formada por partículas de vidrio con anticuerpos inmovilizados situadas en el pocillo de muestra. De esta forma, después de la introducción de muestra, la fracción de anticuerpo sin unir, era eluída electroforéticamente, y el analito marcado reaccionaba al final del canal de separación con peróxido de hidrógeno produciendo

quimioluminiscencia. El tiempo necesario para hacer este tipo de análisis fue inferior a 2 min.

Isotacoforesis (ITP)

La isotacoforesis es un modo de separación que puede ser miniaturizado y que permite hacer inyecciones de grandes volúmenes de muestra, preconcentración *on-line* y separación de componentes que se encuentran a nivel de trazas, debido a que se han superado las dificultades en cuanto a la sensibilidad y la resolución [147]. Un ejemplo reciente de isotacoforesis en microchips de PMMA fue el desarrollado en el grupo de Dong y colaboradores [148]. En dicho trabajo se separó la troponina cardiaca I de R-ficoeritrina utilizando para ello una isotacoforesis catiónica a pH 8. Y en una segunda parte del trabajo se separó la troponina cardiaca I de un contaminante en el suero, la albúmina, demostrando que esta técnica es útil para aislar esta proteína de interés. Otro ejemplo, es el trabajo desarrollado por Fung y colaboradores [149]. En dicho artículo se realizó una separación en dos dimensiones combinando la ITP de transición con la CZE. Se separaron proteínas presentes en fórmulas infantiles, y se combinaron estos dos métodos de separación debido a que la separación de las proteínas no era posible utilizando sólo uno de ellos. En este caso se pudieron detectar las principales proteínas funcionales de la leche (lactoferrina, inmunoglobulina G, α -lactoalbúmina, β -lactoblobulina A y B), en un tiempo total de análisis de 18 minutos y con unos límites de detección, acorde a las normativas, que iban desde 2.3 – 10 mg y una repetibilidad de 3.8 – 5.3 % para 100 g de fórmula infantil. También en

Introducción

otro trabajo de este mismo grupo [150] se combinó, como en el caso anterior, la ITP con la CZE en un microchip bidimensional para la separación de proteínas urinarias (transferrina, β 2-microglobulina, seroalbúmina humana e inmunoglobulina G). En dicho trabajo demostraron que el límite de cuantificación cumplía con los requisitos médicos, alcanzando una mejora de 40 veces en la sensibilidad y unos límites de detección inferiores a 0.3, 0.05, 0.6 y 0.5 mg/L respectivamente. Otro ejemplo de separación por isotacoforesis en microchips poliméricos es el realizado por el grupo de Ivory y colaboradores [151]. Dicho grupo realizó una separación bidimensional en microchips de PDMS, combinando ITP en la primera dimensión y CZE en la segunda. De esta forma se demostró que se podían concentrar y agrupar en zonas adyacentes 3 proteínas fluorescentes en una longitud de canal de 2 cm. En este trabajo también se demostró que al pasar a la segunda fase a través de una unión en T, se producía la dispersión de las estrechas bandas que se habían obtenido en la primera dimensión y que la CZE no tiene capacidad para restablecer la definición de las bandas perdida.

1.3. Interés de las proteínas lácteas

En esta sección de la Memoria se describen las proteínas de suero lácteo más importantes que serán las proteínas que se utilizarán como analitos en la mayor parte de este trabajo. La elección de estos analitos no sólo se debe a la larga experiencia del grupo de

investigación en el que se ha realizado este trabajo sino, también, a su importancia en el campo de los alimentos y la salud.

La leche de vaca es un alimento con un gran valor nutritivo pero que presenta problemas de alergenicidad en algunas personas, siendo los responsables principales de dichas reacciones las proteínas que contiene [152]. El problema de la alergenicidad tiene especial importancia cuando los productos que se comercializan bajo el nombre de hipoalergénicos, todavía contienen trazas de proteínas lácteas como la β -lactoglobulina, que pueden proceder de una contaminación cruzada durante su producción [153]. Por ello, es fundamental el desarrollo de métodos de análisis que permitan detectar la presencia de trazas de estas proteínas tanto en productos aptos para la población con este tipo de alergia como en productos infantiles [154-156].

Las proteínas que se encuentran en la leche pueden ser de dos tipos, caseínas o proteínas de suero lácteo, las cuales se encuentran en proporción 80:20 en la leche de vaca. Esta última fracción contiene a su vez varias proteínas [157]:

β -Lactoglobulina (18 kDa)

Es la proteína mayoritaria en el suero de la leche (50 %) y a temperaturas superiores a 40 °C se producen cambios reversibles en su estructura. Su cadena polipeptídica contiene dos puentes disulfuro y un residuo de cisteína libre, que permite que forme agregados al aumentar la temperatura, haciendo que su concentración disminuya

Introducción

cuando se somete a un tratamiento térmico. Es una de las principales responsables de la alergenicidad de la leche, con multitud de epítomos alérgicos a lo largo de su estructura [158]. Presenta diferentes variantes genéticas siendo las principales en la leche de vaca la β -lactoglobulina A y la β -lactoglobulina B.

α -Lactoalbúmina (14 kDa)

Es la segunda proteína más abundante en el suero lácteo (20 %). Su estructura tiene cuatro puentes disulfuro intramoleculares. Es resistente a la coagulación térmica y, aunque se desnaturaliza la mayor parte de ésta a temperaturas entre 20 - 110 °C, este proceso es casi totalmente reversible, haciendo que su concentración no se modifique por el tratamiento térmico al que es sometida la leche.

Seroalbúmina bovina (BSA) (66 kDa)

Representa sobre el 10 % de las proteínas del suero y es la proteína principal en la sangre del tejido mamario. Su estructura contiene 17 puentes disulfuro internos y un grupo tiol libre, que permite que esta proteína forme agregados. Esta proteína es muy lábil térmicamente, disminuyendo su concentración drásticamente durante el tratamiento térmico.

Immunoglobulinas (150 kDa)

Son también el 10 % de las proteínas de suero lácteo y representan a una mezcla compleja de glicoproteínas. Tienen la estructura básica de anticuerpo con 2 cadenas pesadas y otras 2 ligeras unidas con puentes disulfuro intra e intermoleculares.

Fracción de *proteose-peptone*

Supone el 10 % de las proteínas de suero lácteas y está formada por productos de la degradación de las β -caseínas. Esta fracción es estable térmicamente y no precipita durante el tratamiento térmico.

Existen también en el suero lácteo otras proteínas minoritarias como son la lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima, etc.

Esta composición de proteínas se ve alterada cuando se realiza un tratamiento térmico a la leche, el cual es necesario debido a razones de estabilidad microbiana, seguridad del producto, aumento del periodo de consumo, etc, haciendo que algunas fracciones disminuyan como se ha descrito anteriormente [157].

Dada la importancia de detectar y cuantificar estas proteínas lácteas en productos hipoalergénicos y descubrir posibles contaminaciones cruzadas, es de especial interés el desarrollo de métodos de análisis rápidos y portátiles que permitan detectar su

Introducción

presencia a nivel de trazas en los productos que se comercializan bajo esta condición.

1.4. Proteínas de interés farmacéutico

La industria biotecnológica ha sido el área que más ha crecido en el campo farmacéutico en los últimos años. Este gran auge se debe en parte al desarrollo de nuevos productos, llamados productos biológicos o biofármacos (una denominación frecuente en inglés es *biologics*), los cuales se obtienen generalmente, mediante técnicas recombinantes [159, 160]. Existen en la actualidad multitud de fármacos de este tipo, ya sea en el mercado o en fase de desarrollo, de hecho en los últimos 4 años se han aprobado en Estados Unidos y en Europa (Bruselas) 54 nuevos productos, siendo el número total de productos biofarmacéuticos aprobados para su uso de 246 [160]. Estos fármacos poseen una gran variedad de aplicaciones terapéuticas, desde la lucha contra agentes infecciosos, hasta los tratamientos de diversos tipos de cáncer (leucemia, cáncer de mama, colorrectal, linfoma no Hodgkin entre otros) [161].

El proceso de producción y de purificación de los biofármacos es sumamente complejo, al igual que lo son los propios compuestos en sí. Esto hace que sea necesario el desarrollo de eficientes métodos analíticos que permitan controlar de forma rápida y fiable el proceso de fabricación y que además aseguren la calidad de estos fármacos [162]. Entre los muchos controles que se les realizan para asegurar

tanto su actividad biológica como su estabilidad en el tiempo y la consistencia entre lotes, destaca el control sobre la glicosilación de algunos biofármacos [163]. Una pequeña alteración en su proceso de producción, puede dar lugar a una glicosilación incompleta y, por tanto, a un lote de biofármaco que no tenga la actividad biológica adecuada o que no sea consistente con los lotes fabricados anteriormente.

Aunque se utilizan varias técnicas analíticas para realizar los controles de calidad de los biofármacos, una de las más habituales es el SDS-PAGE y de forma más minoritaria se usa la electroforesis capilar en gel (CGE). Esta última técnica ha permitido el desarrollo de metodologías que realizan los análisis de una forma más rápida y automática que la anterior y, además, estos análisis pueden llegar a ser cuantitativos, mientras que el SDS-PAGE es únicamente semicuantitativo [164-166]. Existen en la bibliografía algunos trabajos en los que se han analizado biofármacos empleando CGE obteniéndose buenos resultados en términos de precisión y exactitud [167, 168]. A pesar de todo, la metodología desarrollada empleando la electroforesis capilar en gel se puede mejorar si se realiza el análisis en microchips de electroforesis capilar. Esto es debido a las múltiples ventajas que presenta esta técnica y que ya se han indicado a lo largo de esta Memoria, como son una mayor velocidad de análisis, alta eficacia en la separación, consumo reducido de reactivos, capacidad para realizar múltiples análisis de forma simultánea y además la posibilidad que ofrecen de integrar todas las operaciones analíticas en el microchip [169]. Por el contrario, también es necesario considerar

Introducción

las limitaciones que ofrecen los microchips para este tipo de análisis, entre las cuales se encuentra una longitud del canal de separación corta, necesidad de derivatizar la mayoría de los analitos para tener buena sensibilidad, poca selectividad (en el caso de separaciones en geles), etc.

Sin embargo, y en base principalmente a las ventajas que ofrece la electroforesis capilar en microchip frente a los equipos convencionales, existen en la actualidad algunos trabajos en los que se han analizado anticuerpos monoclonales, un tipo de biofármaco, usando equipos comerciales de microchips de electroforesis capilar [141, 169].

Objetivo General y Plan de Trabajo

2. OBJETIVO GENERAL

Aunque la aplicación de los dispositivos microfluídicos poliméricos en el análisis de proteínas se lleva a cabo desde hace unos 15 años [170], éste era el primer trabajo realizado en nuestro grupo sobre microchips. Al iniciarse esta investigación ya existía en dicho grupo una amplia experiencia en electroforesis en capilares de sílice fundida, sin embargo no se tenía ninguna experiencia en el empleo de capilares poliméricos para separaciones electroforéticas. Por ello, una buena parte de este trabajo ha supuesto el desarrollo de instrumentación y metodologías nuevas en dicho grupo para comparar microchips de diferentes materiales y diversos medios de separación con el fin de evaluar las posibilidades de esta técnica en el análisis de proteínas.

El objetivo general de esta Tesis ha sido el desarrollo de la instrumentación y de la metodología necesaria para la separación de proteínas mediante el uso de microchips poliméricos de electroforesis capilar.

OBJETIVOS PARTICULARES

Teniendo presente el objetivo general de la Tesis, el trabajo ha abordado cuatro objetivos particulares:

1. Evaluación de los microchips de poli(metil metacrilato) (PMMA) para el análisis de proteínas lácteas Desarrollo de

Objetivos y Plan de trabajo

métodos para el análisis de dichas proteínas en microchips de electroforesis capilar de PMMA.

2. Estudio de los microchips poliméricos de SU-8 para la separación de proteínas. Desarrollo de métodos para la separación por tamaño de proteínas lácteas en microchips de electroforesis capilar de SU-8, que permitan su aplicación a muestras de origen natural.
3. Modificaciones de la metodología e instrumentación estudiadas para aumentar la sensibilidad de detección del método desarrollado.
4. Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de formas glicosiladas y desglicosiladas de proteínas en microchips de SU-8.

Estos objetivos se corresponden con los cuatro apartados que se recogen en la sección de Resultados y discusión de esta Memoria.

PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo que se abordó para la consecución de los objetivos particulares fue el siguiente:

1. Desarrollo de métodos de electroforesis capilar para la separación por tamaño de la mezcla de patrones de proteínas lácteas en microchips de PMMA, con detección fluorescente.
 - 1.1. Estudio de la idoneidad de diversos polímeros para actuar como medio de cribado molecular y agente de recubrimiento.
 - 1.2. Estudio de la reproducibilidad de la metodología desarrollada para los microchips de PMMA.

2. Desarrollo de un método para la separación por tamaño de proteínas lácteas en microchips de electroforesis capilar de SU-8.
 - 2.1. Estudio de la idoneidad de diversos polímeros para actuar como medio de cribado molecular y agente de recubrimiento.
 - 2.2. Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de muestras de origen natural.

3. Modificaciones de la metodología e instrumentación para la mejora de la sensibilidad de detección en microchips de SU-8.
 - 3.1. Estudio de la longitud de onda de excitación más apropiada para los microchips de SU-8.

Objetivos y Plan de trabajo

- 3.2. Empleo de luz láser para la mejora de la sensibilidad.
4. Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de formas glicosiladas y desglicosiladas de AGP.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

- α -Lactoalbúmina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- β -Lactoglobulina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Ácido bórico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Acido clorhídrico (Panreac, Barcelona, España)
- Agua Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia)
- Bórax (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Cianuro potásico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Chromeo P540TM (Active Motif, Tegernheim, Alemania)
- Dextrano 425-575 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- EOTrol LN^(R) (Target Discovery, Palo Alto, CA, Estados Unidos)
- FQ (3(2-furoil)-quinolin-2-carboxialdehido) (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos)
- Hidróxido de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Hidroxipropil metil celulosa (Shin-Etsu, Tokio, Japón)

Material y métodos

- Poli(etilenglicol) 35 kDa (Sanofi-Aventis, Hoechst, Alemania)
- Poli(óxido de etileno) 100 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Rodamina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos)

3.2. Instrumentación

3.2.1. Descripción de los microchips

Los microchips usados en este trabajo fueron adquiridos a Microfluidics Chip Shop (Jena, Alemania) y a microLIQUID (Arrasate-Mondragón, España). Los primeros estaban hechos de poli(metil metacrilato) (PMMA) con dimensiones exteriores de 16 x 95 x 2 mm (espesor), con un diseño de cruz sencilla (Figura 3 A1) y con canales de sección trapezoidal (Figura 3 A2). La longitud de los diferentes canales medida desde la intersección de los mismos era de 5 mm para los canales que terminaban en el pocillo de tampón de separación (BR) y en el de desecho de muestra (SW), de 6 mm para el que terminaba en el depósito de muestra (SR) y de 82 mm para el canal largo, que terminaba en el pocillo de desecho (W). Los canales estaban conectados al exterior mediante unos reservorios de sección circular de 2 mm de diámetro. En los trabajos iniciales realizados con derivados de celulosa como polímero de cribado, se emplearon

microchips de PMMA con inyectores de doble T (distancia entre canales de inyección de 0.1 mm) y con las restantes dimensiones iguales a los anteriores.

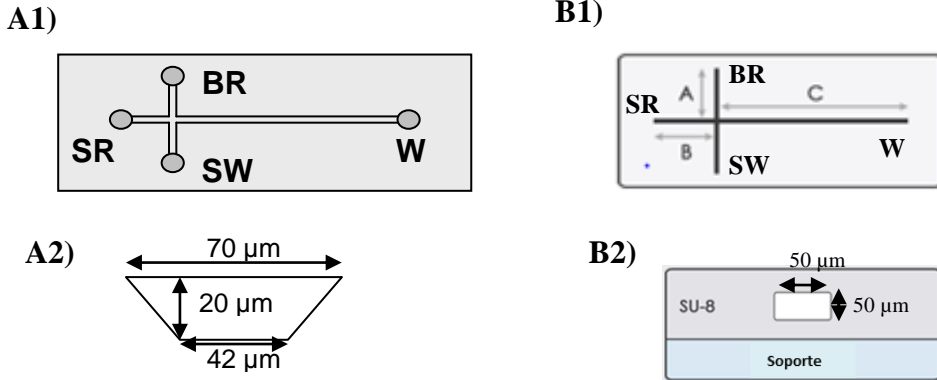


Figura 3. Microchips de electroforesis usados en este trabajo. A1) Esquema de un microchip comercial de poli(metil metacrilato). A2) Esquema de la geometría del canal del microchip. B1) Esquema de un microchip comercial de SU-8. B2) Esquema de la geometría del canal del microchip.

Los microchips de microLIQUID eran de SU-8 (referencia MLCE4515-5050) con dimensiones exteriores de 15 x 45 x 0.9 mm (espesor) (Figura 3 B1) y los canales eran de sección cuadrada de 50 x 50 μm (Figura 3 B2). Los canales, al igual que anteriormente, eran ortogonales y la longitud de los mismos era de 5 mm para los canales cortos y 35 mm para el canal largo medido desde la intersección de los canales. Además, se conectaban al exterior a través de unos orificios de 2 mm de diámetro, como los microchips de PMMA.

La lámina de SU-8 que poseía la estructura de los microcanales era muy delgada y como soporte el microchip tenía una lámina de vidrio pyrex. Los dos materiales se encontraban unidos físicamente, ya

Material y métodos

que sobre la lámina de vidrio se depositaba por *sputtering* una capa fina de SU-8 y a ella se unía la lámina de SU-8 que poseía la estructura del microchip grabada, de esta manera, los canales no eran híbridos, sino sólo de SU-8.

3.2.2. Desarrollo del portachip

Para llevar a cabo las separaciones electroforéticas en microchips, fue necesario desarrollar una plataforma que permitiera conectar los canales del microchip con el exterior, con el fin de realizar la manipulación de flúidos dentro del mismo tanto hidrodinámica como eléctricamente. Esta manipulación resultaba más complicada cuando los microchips que se utilizaban eran de PMMA que cuando se empleaban microchips de SU-8, ya que los de PMMA eran más hidrófobos y presentaban una gran resistencia al paso de disoluciones acuosas a través de los canales cuando se usaban sin una activación previa que los hiciese hidrófilos.

El portachip que se diseñó y construyó para este trabajo, se optimizó por prueba y error, de manera que aquí sólo se describe su diseño final. Este diseño estaba basado en un sistema de tapas con las conexiones eléctricas y fluídicas integradas, cuyo esquema final se muestra en la figura 4.

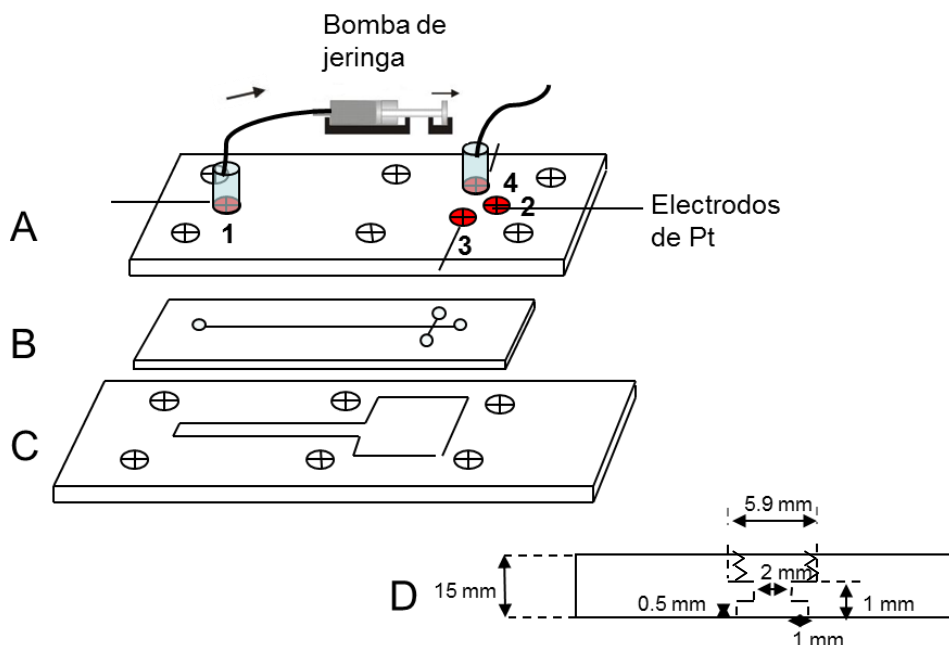


Figura 4. Esquema de los diferentes elementos del portachip. (A) Tapa superior con pocillos con rosca para conexión de los tubos de entrada y salida de líquidos y electrodos incorporados de platino en cada pocillo; lleva a su vez, seis taladros pasantes para fijar todos los elementos del portachip sobre la placa C utilizando tornillos de poli(etileno) M-6. (B) Microchip. (C) Tapa inferior con seis taladros pasantes con rosca para fijar los otros elementos. (D) Vista lateral de la tapa A, donde se observa el diseño de los pocillos con rosca y los cajetines para encastrar las juntas de nitrilo (por razones de simplicidad sólo se muestra un taladro de los 4 que tiene la tapa).

El portachip que se diseñó, fue fabricado en PMMA por el taller del Centro de Química Orgánica “Manuel Lora Tamayo” (C.S.I.C.) y cada una de las partes del dispositivo tiene la siguiente función.

Tapa inferior (figura 4C)

Tapa de forma rectangular y dimensiones 86 x 128 x 4 mm para los microchips de PMMA, y 86 x 88 x 4 mm para los de SU-8, llevaba 6

Material y métodos

agujeros pasantes con rosca M-6 que permitían el ensamblaje de todo el portachip por medio de tornillos de poli(etileno) M-6. Esta tapa tenía en la parte central una ranura alineada con el canal de separación (canal largo) del microchip, así se conseguía que el haz de luz de excitación incidiese directamente en el microchip disminuyendo, de esta manera, la posible absorción de la luz que le llegara al microchip, que podría limitar la sensibilidad en la detección. Los tornillos que se enroscaban sobre esta tapa comprimían el chip (figura 4B), permitiendo que éste quedase plano y que cualquier punto del mismo equidistara del objetivo del microscopio.

Tapa superior (figura 4A)

Tapa de dimensiones 36 x 115 x 15 mm para los microchips de PMMA y 36 x 68 x 15 mm para los de SU-8. Esta tapa tenía agujeros pasantes para los tornillos M-6 y rosca en los pocillos (representados por un círculo color rojo en la figura) para que así se permitiera la conexión del reservorio del microchip al tubo de teflón procedente de la jeringa, consiguiendo de este modo la manipulación hidrodinámica de los fluidos en el interior del microchip. A su vez, poseía los electrodos que permitían aplicar la diferencia de potencial necesaria para realizar la electroforesis capilar. Estos electrodos integrados eran de platino de 0.5 mm de diámetro y se situaban en el interior de un canal de 1 mm de diámetro, horadado en la tapa, y que conectaba el lateral de ésta con el interior del pocillo. El sellado de este canal, manteniendo así el electrodo en una posición fija se realizó aplicando un pegamento bicomponente (Araldite, Huntsman International). La

integración de los electrodos en el portachip evitaba su manipulación, reduciéndose así la entrada de suciedad ambiental (motas de polvo, fibras de celulosa,...) al interior de los canales del microchip, que los pudiera obstruir.

Esta tapa tenía en la parte inferior, alrededor de cada agujero correspondiente a los pocillos, una hendidura circular de 0,5 mm de profundidad y 4 mm de diámetro, donde se situaba una junta tórica de nitrilo de 1 mm de espesor. Estas juntas permitían hacer cierre hermético entre las tapas y el chip, con el fin de evitar las fugas de líquido y conseguir hacer vacío para la limpieza y acondicionamiento de los canales. Esta tapa tenía mucha importancia para el buen funcionamiento del microchip, ya que permitía conectar el microchip con el exterior y a la vez lo protegía de la entrada de motas de polvo, fibras, etc, del ambiente.

Una fotografía del portachip con todos sus elementos y un tubo de conexión a la jeringa puede observarse en la figura 5.

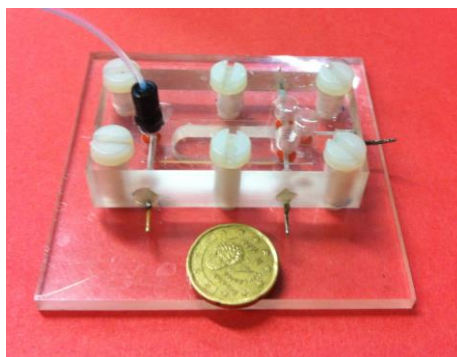


Figura 5. Fotografía del portachip para el microchip de SU-8, donde se observan los electrodos y una conexión con la bomba de jeringa (su tamaño se compara con una moneda de 20 céntimos de euro).

Material y métodos

Todo este dispositivo de tapas permitía una mayor automatización del sistema, consiguiéndose, por tanto, una mejor reproducibilidad de los resultados.

3.2.3. Fuentes de alimentación y control

El voltaje aplicado en el proceso de electroforesis capilar fue proporcionado, independientemente a cada pocillo, mediante 4 fuentes Fug HCN 7E-12 500 (Rosenheim, Alemania) de tensión negativa. Estas fuentes se controlaron a través del ordenador mediante el programa LabView 8.2 y las tarjetas NI PXI 833, MXI-4 (interfaz instalada en la carcasa NI-PXI 1036) y TB2705, todos ellos de National Instruments (Austin, Texas, USA). Este montaje electrónico permitió controlar los 8 relés de alto voltaje (Switching Technology Günther, Nurenberg, Alemania) a través de los optoacopladores PC817 y los transistores Darlington SN7545N. De esta forma, desde el ordenador se pudieron controlar tanto el potencial que se aplicaba en cada pocillo como el tiempo de aplicación durante el proceso electroforético.

3.2.4. Manipulación de fluidos

La introducción de líquidos al microchip se realizó por medio de bombas de jeringa (Aladdin, WPI, USA). Para trabajar con microchips de PMMA se introdujeron los líquidos por succión (aspiración de la

bomba 3600 $\mu\text{L/h}$), mientras que con los microchips de SU-8, el acondicionamiento con NaOH y H_2O se hizo por presión a un flujo de 2600 $\mu\text{L/h}$ y el tampón de separación se introdujo por succión al mismo caudal.

La manera de acoplar las bombas al microchips fue la siguiente:

Las jeringas que se usaron en la bomba fueron de plástico, desechables y con conexión luer-lock. Éstas se unieron mediante un conector de plástico a un tubo de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), de 0,51 mm de diámetro interno.

Este tubo de PTFE de la jeringa se conectó a una válvula de 3 vías mediante una conexión luer-lock. En otra de las salidas de la válvula se conectó otro tubo de 0.51 mm de diámetro interno que permitió reducir el volumen muerto de la conexión, al acortar el tiempo necesario para reemplazar el líquido del tubo y de la válvula durante el acondicionamiento del microchip. La última conexión de la válvula se conectó con el portachip a través de un tubo PTFE que, por un extremo, poseía una conexión luer-lock y, por el otro extremo, un tornillo (rosca $\frac{1}{4}$ -28) de material polimérico (Omnifit, Danbury, CT, USA) que se acoplaba al portachip. El cierre hermético de este tornillo con el chip se consiguió gracias a una junta tórica de nitrilo, de 2 mm de diámetro interno y 1,5 mm de espesor, que se comprimía al apretar el tornillo de plástico y que estaba retenida en el extremo del tubo mediante el deflagrado de éste.

Material y métodos

3.2.5. Detección fluorimétrica

Para la visualización de los canales del microchip se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Motic AE31, Xiameng, China) con un objetivo de x 20. Como fuente de excitación se utilizó la luz procedente de una lámpara de arco de vapor de mercurio de 100 W (HBO 103 W/2, Osram, Augsburg, Alemania), montada en el propio microscopio. Para aquellos experimentos que lo requirieron, se utilizó la radiación procedente de un láser de 532 nm (referencia MLM-CDRH Excelsior DPSS laser, Spectra-Physics, Irving, CA, USA) de 20 mW de potencia.

Para filtrar la radiación procedente de la lámpara de mercurio se usó un cubo de filtros (MB-1) con un filtro de excitación, con centro de banda a 480 nm y ancho de banda de 30 nm ($\lambda_{exc} = 480/30$ nm), un espejo dichroico que sólo refleja luz de longitud de onda inferior a 505 nm y un filtro de emisión $\lambda_{em} 535/40$ nm. La fluorescencia emitida por la muestra se recogió por el mismo objetivo y se redirigió hacia una cámara CCD Moticom 3000 (Motic, Xiameng, China). La monitorización y la adquisición de imágenes y videos se hicieron con el software (Motic Images Advanced 3.2.). Posteriormente esta cámara fue sustituida por una Orca flash 2.8 (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japón), basada en tecnología CMOS. Al igual que anteriormente, la monitorización y adquisición de videos e imágenes se hizo con el software propio de la cámara (HCLImage live)

El uso del láser de 532 nm llevó asociado el cambio del cubo de filtros a uno denominado MG-1 que posee un filtro de excitación de

$\lambda_{exc} = 535/25$ nm, un espejo dichroico que sólo refleja luz de longitud de onda inferior a 560 nm y un filtro de emisión de λ_{em} 600/40 nm.

3.2.6. Desarrollo instrumental para el acoplamiento del láser al microscopio

El acoplamiento del láser de 532 nm al microscopio requirió, en primer lugar, el desalojo de toda la óptica del microscopio que servía para enfocar la radiación procedente de la lámpara de mercurio. Se precisó, también, del diseño de una plataforma de aluminio sobre la que se situó el láser, unida a un sistema de desplazadores micrométricos, para el alineado del láser en las 3 coordenadas del espacio.

La unión de la plataforma sobre la que se encontraba el láser con los micrométricos se realizó gracias a otras 2 piezas de aluminio en forma de L. Un esquema general y simplificado del montaje que se realizó se muestra en la figura 6.

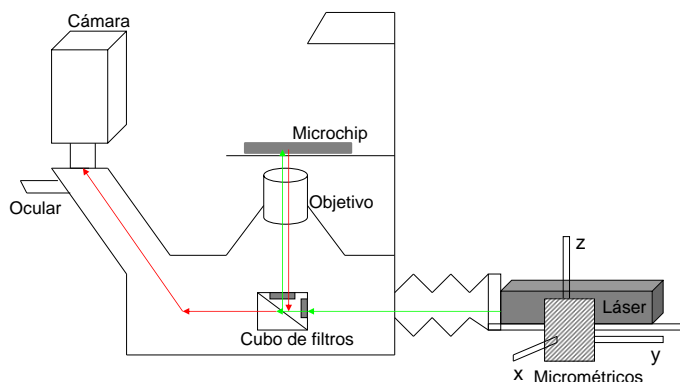


Figura 6. Esquema del acoplamiento del láser al microscopio de epifluorescencia, donde se muestra los diferentes componentes ópticos y el diagrama de rayos para la excitación de la fluorescencia y recogida de la luz emitida por la muestra.

Material y métodos

La entrada de luz láser al microscopio se aisló ópticamente del ambiente mediante un fuelle de PVC negro. Este fuelle se unió al microscopio a través de una pieza que se sujetó a la parte trasera del microscopio y que poseía un adaptador para el fuelle. El otro extremo del fuelle se unió al láser, para ello, se diseñó una pieza de aluminio con un adaptador para el fuelle y se acopló a la cabeza del láser. Esta pieza permitió hacer cierre hermético sobre el láser gracias a una junta de viton[®]. Las piezas de aluminio fueron anodizadas en negro para evitar problemas de reflexión de la luz del láser.

Posteriormente, se realizó una modificación de este diseño ya que fue necesario acoplar al sistema un filtro de densidad neutra (Spectra-Physics, Irving, CA, USA) para disminuir la potencia de la luz del láser que llegaba al microchip. Se usaron filtros de distinta densidad óptica en un intervalo de 0.1-1 OD, que se sujetaron gracias a un portafiltros, con adaptadores que permitieron unir fuelles de PVC a ambos lados. El montaje final fue el siguiente: de la pieza de la cabeza del láser salía un fuelle que se unía al portafiltro y, por la otra cara del portafiltro, se colocó otro fuelle que se unía al microscopio.

3.3. Procedimientos

3.3.1. Acondicionamiento de los microchips

El acondicionamiento de los microchips se realizó del siguiente modo: antes de cada inyección, se introdujo, por succión en los microchips de PMMA (3600 $\mu\text{L/h}$) y por presión en los microchips de SU-8 (2600 $\mu\text{L/h}$), agua (10 min), NaOH 0.1 M (10 min), agua (10 min)

y, por último, tampón de separación (5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, polímero de cribado, 10 % EOTrol, pH = 8.5) durante 20 minutos por succión (3600 $\mu\text{L/h}$ para el microchip de PMMA y 2600 $\mu\text{L/h}$ en el caso del SU-8). Todas estas disoluciones fueron previamente filtradas con filtros de jeringa de nylon de 0,2 μm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro (OlimPeak, Teknokroma, Barcelona, España).

La preconcentración de la muestra por cambio de viscosidad (*stacking*), se realizó introduciendo una etapa adicional después del protocolo de acondicionamiento habitual. Para ello, se reemplazó el tampón de separación, que llenaba el canal de inyección, por la muestra, que no contenía polímero de cribado, succionando desde el pocillo de desecho de muestra (SW, figura 3) durante 2 minutos, mientras los pocillos de tampón de separación (BR) y desecho (W) estaban llenos de la disolución polimérica y el pocillo de muestra lleno de la disolución con las proteínas. Esta operación fue preciso hacerla mediante succión, debido a que el flujo electroosmótico está prácticamente suprimido y no hay desplazamiento del tampón por campo eléctrico. Así se consiguió que el canal de inyección no contuviese polímero de cribado y que el resto de canales sí, de manera que cuando se inyectaba la muestra, se producía un cambio de viscosidad justo en la cruz de inyección, provocando el *stacking* de las proteínas.

Material y métodos

3.3.2. Protocolos electroforéticos

El modo de separación utilizado fue la separación por tamaño, empleando un polímero de cribado. Como polímeros de cribado se han estudiado hidroxipropil metil celulosa, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno) y dextrano, a diferentes concentraciones en el tampón de separación que está descrito en el apartado anterior.

El modo de inyección que se empleó para realizar los estudios era electrocinético y de tipo *gated*. La secuencia de voltajes utilizada se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de voltajes.

Pocillos Etapas	Pocillo de muestra (SR) (V)	Pocillo de tampón de separación (BR) (V)	Pocillo de desecho de muestra (SW) (V)	Pocillo de desecho (W) (V)
Carga	-625	-750	Tierra	Tierra
Inyección (3 s)	-750	Flotando	Flotando	Tierra
Separación	-625	-750	Tierra	Tierra

La posición del punto de detección y, por tanto, la longitud de canal de separación, se determinó empleando una escala milimétrica colocada junto al desplazador del microscopio. Se tomó como referencia de longitud 0 el cruce de los canales de separación e inyección del microchip.

3.3.3. Medida del flujo electroosmótico (EOF) en microchips de SU-8

El procedimiento para medir el flujo electroosmótico estaba basado en el método desarrollado por el grupo de Viovy [171]. Consistía en una electroforesis frontal usando una disolución 1 μM de rodamina B en el tampón de separación 5mM bórax a pH 9 como marcador neutro del EOF. Al tampón de separación anterior se le adicionaron además diferentes concentraciones de EOTrol LN[®]. La configuración de voltajes para la carga de muestra fue -500 V en el SR, -625 V en el BR, -100 V en el SW y conectado a tierra el W. La inyección de la muestra se realizó aplicando -625 V al SR, conectando el W a tierra y dejando los otros dos pocillos flotando.

3.3.4. Medida de la capacidad del EOTrol LN[®] para impedir la adsorción de proteínas

La medida del efecto del EOTrol LN[®] para evitar la adsorción de las proteínas sobre las paredes de los canales del microchip se hizo mediante una serie de inyecciones consecutivas de una disolución de BSA 50 μM en el tampón de separación. En este estudio, se usaron tres disoluciones diferentes: (i) el tampón de separación sin polímero de cribado ni EOTrol LN[®], (ii) el tampón de separación con el polímero de cribado (10 % (v/v) dextrano) y sin EOTrol LN[®] y (iii) el tampón de separación sin el polímero de cribado pero con 10 % (v/v) EOTrol LN[®].

El acondicionamiento del microchip y la configuración de voltajes cuando se emplearon disoluciones con EOTrol LN[®] fueron las mismas que se describieron en los apartados 3.3.1. y 3.3.2. Cuando se

Material y métodos

emplearon disoluciones sin agente de recubrimiento, la BSA se movía en la dirección del EOF por lo que hubo que cambiar la configuración de voltajes. En este caso, los voltajes que se aplicaron para la etapa de carga y separación de la muestra fueron -875 V en el SW, -750 V al W y los restantes pocillos se conectaron a tierra. Para la etapa de inyección, se aplicó -750 V al W mientras el SR se mantuvo a tierra y el resto de pocillos flotando. La duración de la inyección fue de 2 s y el punto de detección se situó a 3 mm del cruce de los canales.

3.3.5. Derivatización de las proteínas

Con el fin de poder detectar las proteínas por fluorescencia, éstas se derivatizaron covalentemente con sustancias fluorescentes o fluorogénicas. En estos experimentos se usaron dos agentes fluorogénicos, el 3(2-furoil)-quinolin-2-carboxialdehído (FQ), el cual ha sido ampliamente usado en el grupo de trabajo [156, 172, 173], y el Chromeo P540TM con el que no había experiencia previa en el grupo, aunque sí con un compuesto similar, Chromeo P503TM [174].

El 3(2-furoil)-quinolin-2-carboxialdehído (FQ) es un agente fluorogénico que reacciona con las aminas primarias para formar conjugados, que se pueden analizar usando métodos electroforéticos o cromatográficos [175]. En el caso de las proteínas, la unión con FQ se produce a través de las aminas primarias de los residuos de lisina (Lys). El esquema de la reacción se representa en la figura 7.

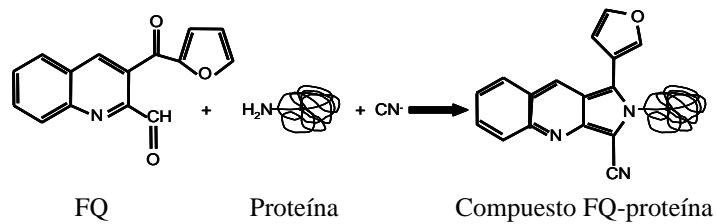


Figura 7. Esquema de la reacción de derivatización de una proteína modelo con el agente fluorogénico FQ.

Los conjugados que se obtienen presentan un máximo en su longitud de onda de excitación a 488 nm y el máximo de emisión se produce a longitudes de onda próximas a 590 nm. Este reactivo presenta la ventaja de que, al ser fluorogénico, no es necesaria una etapa de lavado para eliminar el exceso de reactivo que queda tras la reacción con la proteína, ya que no da fluorescencia. Para que esta reacción se produzca es necesario que en el medio de reacción haya cianuro, que permite la formación del compuesto isoindólico fluorescente. La reacción se realizó a una temperatura de 65 °C y con un tiempo de reacción de 5 minutos. Además, debido a la baja concentración de proteína en las muestras naturales, en las reacciones de derivatización es preciso añadir un gran exceso de agente derivatizante en relación con la cantidad de proteína para conseguir que todas las proteínas de la muestra se derivaticen.

El Chromeo P540TM es un derivado de pirilio que se usa como agente fluoróforo. Reacciona, como en el caso anterior, con las aminas primarias de las proteínas y péptidos y así éstos se pueden detectar fluorescentemente [176]. Éste Chromeo en disolución es violeta y al reaccionar con la proteína se vuelve roja la disolución, ya que el

Material y métodos

reactivo conjugado con la amina sufre un desplazamiento de la longitud de onda de 54 nm. El Chromeo P540TM en su forma conjugada tiene un máximo de absorción a 533 nm y de emisión a 627 nm. El reactivo libre absorbe a una longitud de onda de 587 nm, aunque su rendimiento cuántico es inferior al 1%, lo que hace que no se requiera su eliminación de la muestra tras la reacción de marcaje. La derivatización con este fluoróforo se esquematiza en la figura 8.

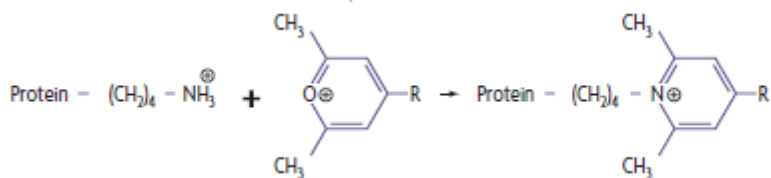


Figura 8. Esquema de la reacción de derivatización de una proteína modelo con el derivado de pirilio Chromeo P540TM.

Ambas sondas se unen a los residuos de lisina y amino terminal de las proteínas, pero en el caso del FQ se elimina la carga que aporta este residuo porque se forma un anillo neutro que es el responsable de la fluorescencia, mientras que en el caso de Chromeo se sustituye la carga del amino por la del Chromeo que también tiene carga positiva.

El procedimiento seguido para llevar a cabo la derivatización fue el siguiente:

Protocolo para FQ

El FQ debe conservarse en frío y protegido de la luz. Por ello, el contenido de un vial suministrado por el fabricante (10 mg) se disolvió en 995 μL de metanol y se alicuotó en viales (10 μL en cada uno). Para

que este reactivo esté fácilmente disponible para realizar la reacción es necesario evaporarlo a vacío quedándose entonces sobre las paredes del vial. Para ello, se usó el concentrador evaporador rotatorio (Speed Vac, Savant, USA). El residuo seco se conservó a -20°C en la oscuridad hasta el momento de su uso.

Inmediatamente antes de llevar a cabo la reacción con FQ, se desnaturalizó la proteína (20 μL), disuelta en agua en concentración 10^{-2} M, mezclándola en proporción 1:1 (v/v) con una disolución al 4 % (m/v) de SDS y calentando la mezcla en un baño termostatzado a 100°C durante 5 minutos.

Seguidamente, se añadieron 68 μL del tampón de separación a una alícuota de FQ (4×10^{-7} mol) y se sonicó durante 2 min. Es importante que este tampón contuviese SDS ya que éste permite la disolución del FQ.

Por último, a 32 μL de la solución de proteína desnaturalizada se añadieron 4 μL de una disolución que contenía 200 mM de cianuro potásico (KCN) disuelto en bórax 2.5 mM (pH 9). Esta nueva disolución se añadió sobre el vial que contenía FQ y se calentó en el baño termostatzado a 65°C durante 5 min para llevar a cabo la derivatización de la proteína con el agente fluorogénico FQ.

Precauciones de seguridad

El cianuro de potasio es una sustancia peligrosa que reacciona rápidamente con ácidos generando cianuro de hidrógeno, que es un gas letal. Para evitar los posibles riesgos, las disoluciones de KCN se deben preparar en medio básico. Los restos de KCN deben neutralizarse con una disolución de NaOH concentrada, depositarse en

Material y métodos

un recipiente que contenga lejía y ser retirados por un gestor de residuos.

Protocolo para Chromeo P540™

El Chromeo, al igual que el FQ, debe conservarse en frío y protegido de la luz. Por ello, el contenido de un vial suministrado por el fabricante (1 mg) se disolvió en metanol (100 µL) y se alicuotó en viales (10 µL en cada uno). Para que este reactivo esté fácilmente disponible para realizar la reacción es necesario evaporarlo a vacío quedándose entonces sobre las paredes del vial. Para ello, se usó el concentrador evaporador rotatorio (Speed Vac, Savant, USA). El residuo seco se conservó a -20 °C en la oscuridad hasta el momento de su uso.

Las proteínas (20 µL) a la concentración correspondiente se desnaturalizaron como se describió previamente. Para eliminar el exceso de SDS que hay en la disolución de proteína, que puede interferir en la reacción, se cambió el medio de disolución de la proteína por el tampón de separación sin el polímero de cribado y el EOTrol LN®. Para ello, se usaron unos dispositivos de ultracentrifugación con un corte de peso molecular de 10 kDa (Nanosep®, Pall , Port Washington, NY, USA) y se procedió del siguiente modo: Primero, se filtró la proteína, se lavó con 50 µL de tampón durante 7 minutos a 14000 g y luego se lavó una segunda vez con otros 50 µL de tampón por un tiempo de 3 minutos a la misma fuerza centrífuga. Finalmente, se recuperó la proteína del dispositivo mediante una micropipeta, lo que permitió estimar el volumen de la solución y la concentración de la proteína.

Como último paso, a un alícuota de Chromeo (2.3×10^{-7} mol), se le añadió el volumen de tampón y de proteína suficiente para que, al final, la concentración de proteína fuera de 4 mg/mL en unos 500 μ L de tampón. A continuación, se mantuvo la disolución con agitación suave a temperatura ambiente durante 1 hora.

3.3.6. Tratamiento de las muestras de leche

En primer lugar, se realizó una etapa de purificación de las muestras de leche de vaca cruda y UHT. Este tratamiento se llevó a cabo para obtener el suero desnatado, libre de fracción lipídica y de caseínas que pudieran interferir en el análisis.

El tratamiento fue distinto para cada tipo de leche. En el caso de la leche de vaca cruda, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

a) Desnatado de la leche.

- a.1. Calentamiento de 50 mL de leche cruda de vaca a 40 °C durante 30 minutos y con agitación continua.
- a.2. Centrifugación a 2000 g durante 30 minutos.
- a.3. Precipitación de la fracción lipídica por enfriamiento en un baño de hielo durante 20 minutos.
- a.4. Eliminación de la nata formada con una espátula.

b) Obtención del suero.

- b.1. Precipitación de las caseínas con HCl 2 M. Se adicionó directamente esta disolución a la leche desnatada en la etapa anterior, hasta que se alcanzó un pH de 4.6.

Material y métodos

- b.2. Mantener en reposo durante 20 minutos para formar dos fases.
- b.3. Centrifugación del sobrenadante a 4500 g durante 15 minutos.
- b.4. Filtrado del sobrenadante con un filtro de jeringa de 0.45 μm .
- b.5. Filtrado de la disolución obtenida anteriormente con un filtro de jeringa de 0.22 μm .

El tratamiento que se utilizó para obtener el suero de muestras de leche UHT semidesnatada de vaca fue más sencillo que el anterior, ya que esta muestra ha sido sometida a un tratamiento previo de desnatado. El procedimiento fue el siguiente:

- a.1. Precipitación de las caseínas con HCl 2 M. Se adicionó directamente esta disolución a 25 mL de leche hasta que se alcanzó un pH de 4.6.
- a.2. Mantenimiento en reposo durante 20 minutos para formar dos fases.
- a.3. Filtrado del sobrenadante con un filtro de jeringa de 0.22 μm .

Una vez obtenido el suero de la leche se alicuotó en viales (20 μL en cada vial) que se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación.

3.3.7. Caracterización espectroscópica del SU-8

Se registró el espectro de absorción de un microchip de SU-8 utilizando, para ello, un espectrofotómetro Lambda 35 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Se hizo un barrido desde 400 nm hasta 600 nm, la velocidad de barrido fue 120 nm/min y la rendija que se usó fue de 4 nm.

También se registró el espectro de emisión de fluorescencia usando un espectrómetro de fluorescencia LS 50B (Perkin Elmer) en modo *frontal face*, de esta forma disminuía el ruido de fondo proveniente de la radiación incidente. Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia al excitar el SU-8 con un haz de 480 nm y con otro de 532 nm (longitudes de onda correspondientes a las de la lámpara de mercurio y el láser de trabajo con los microchips), recogiéndose en un intervalo de longitudes de onda 510 – 600 nm y 560 - 650 nm, respectivamente. La velocidad de barrido fue de 150 nm/min y las rendijas de excitación y de emisión eran de 6.5 nm.

3.3.8. Desglicosilación de la α -1-glicoproteína ácida (AGP)

La obtención de la AGP desglicosilada, es decir, sin glicanos, se realizó en tres etapas siguiendo el procedimiento optimizado previamente en el laboratorio [177].

En la primera etapa, se llevó a cabo la desnaturalización de la AGP. Como disolución desnaturalizante se utilizó la mezcla compuesta por 100 mg de octil- β -D-glucopiranosido disueltos en 4 mL de agua Milli-Q, a la que se le adicionaron 35 μ L de 2-mercaptoetanol y 0.965

Material y métodos

mL de agua Milli-Q. A continuación, se preparó la muestra de AGP a una concentración de 8 mg/mL y se mezclaron 20 μ L de esta disolución con 8 μ L de disolución desnaturalizante. La mezcla resultante se calentó a 100 °C durante 10 min.

La segunda etapa es la que permitió romper la unión química entre los glicanos y la AGP. Para ello, primero se dejó enfriar la disolución anterior hasta temperatura ambiente. Seguidamente, se mezcló esta disolución con 17 μ L de bicarbonato amónico 25 mM y 8 μ L de la enzima PNGasa F (4 IU) y la mezcla resultante se mantuvo a 37 °C durante 24 h.

Durante la última etapa se purificó la AGP desglicosilada eliminándose los glicanos. Primero, se enfrió la disolución anterior a -20 °C durante 30 minutos. A continuación, se le adicionó 1 mL de etanol y la mezcla se metió en un baño de hielo durante 30 minutos. Seguidamente, se redujo el volumen de disolución a 200 μ L mediante 30 minutos en el concentrador evaporador rotatorio (Speed Vac, Savant, USA). Por último, se centrifugó la mezcla a 8000 g durante 10 minutos, usando dispositivos de ultracentrifugación con membrana de corte de peso molecular 10 kDa (Nanosep[®], Pall, Port Washington, NY, USA), de forma que se obtuvo la AGP desglicosilada sin restos de glicanos en disolución.

3.3.9. Análisis de la AGP por espectrometría de masas

La comprobación de la desglicosilación de la AGP se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Para la preparación de la muestra se repitió primero todo el tratamiento descrito en el apartado anterior 3.3.8., de manera que finalmente se obtuvo la muestra de AGP desglicosilada en la parte superior de la membrana del dispositivo de ultracentrifugación. A continuación, se volvió a disolver la proteína obtenida en 150 μ L de etanol y se metió en un baño de hielo durante 30 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 8000 g durante 10 minutos y finalmente la disolución que quedó sobre la membrana se llevó a sequedad utilizando el concentrador evaporador rotatorio (Speed Vac, Savant, USA). Por último, se disolvió en 4 μ L de agua Milli-Q.

Como matriz para MALDI se empleó una disolución de 10 mg/mL de ácido sinapínico en 0.3 % TFA (m/v) / ACN (70/30). El análisis se realizó en modo lineal positivo.

La AGP glicosilada también se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF (Voyager-DE PRO, *Applied Biosystems*, Foster, CA, USA) siguiendo el mismo procedimiento anterior, salvo el tratamiento con la enzima PNGasa F.

3.3.10. Procesamiento de imágenes y representación de los datos

Las separaciones electroforéticas que fueron registradas mediante la cámara de fluorescencia Moticam 3000, en forma de video (extensión “.avi”) se procesaron mediante un software creado en MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) por Rafael Redondo Tejedor del Instituto de Óptica Daza de Valdés del CSIC. La aplicación permitió seleccionar una región estrecha del canal (30 μ m de ancho) en un fotograma del vídeo, calcular la intensidad luminosa promedio

Material y métodos

en esa región en cada uno de los fotogramas del vídeo y representarla. De esta manera, se obtuvo la variación de intensidad luminosa en función del tiempo (electroferograma). Los datos numéricos correspondientes al electroferograma fueron exportados a Origin Pro. 7.0 para su tratamiento numérico y representación.

Cuando las separaciones se registraron mediante la cámara Orca flash 2.8, el propio software de la cámara permitía seleccionar una región del video y procesarla, se obtuvieron así los datos de intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Estos datos se exportaron posteriormente a Origin Pro. 7.0 para el tratamiento numérico y representación del electroferograma.

Resultados y **Discusión**

4.1. EVALUACIÓN DE LOS MICROCHIPS DE POLI(METIL METACRILATO) (PMMA) PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS

Los microchips de poli(metil metacrilato) se han utilizado con éxito como sistemas de separación de proteínas por electroforesis capilar [124, 125, 178, 179]. Este material ha sido uno de los más aplicados en este ámbito debido a las interesantes propiedades que presenta, tales como bajo coste de fabricación y buenas propiedades ópticas, mecánicas y eléctricas [39]. Las razones anteriores justificaron la elección de este tipo de microchip para en un primer intento conseguir los objetivos planteados en esta Tesis.

4.1.1. Estudio de la hidroxipropil metil celulosa (HPMC) como polímero de cribado y agente de recubrimiento para separaciones por tamaño

La metodología de separación de proteínas por tamaño usando disoluciones de cribado dinámicas y disminuyendo el EOF por adsorción de sustancias sobre las paredes del canal fue la que se escogió para el trabajo desarrollado. Dicha metodología ofrece una buena reproducibilidad y es sencilla de llevar a cabo al no implicar la realización de reacciones químicas en el interior del canal [180, 181]. Como polímero de cribado se escogió un derivado de celulosa, la hidroxipropil metil celulosa (HPMC), la cual se ha aplicado con éxito a la separación de ADN y proteínas en microchips de electroforesis

Resultados y discusión

capilar [182]. Este polímero tiene, además, la particularidad de que una vez inmovilizado sobre el canal permite disminuir el flujo electroosmótico del microchip, haciendo que las proteínas en su interior se muevan según su movilidad electroforética y no se vean arrastradas por el flujo electroosmótico.

En esta parte del trabajo se estudió la capacidad de la HPMC para disminuir el flujo electroosmótico y formar un entramado capaz de separar proteínas por tamaño en microchips de PMMA. Para comprobar esto, se realizaron unos estudios previos donde se usó como analito una disolución de fluoresceína 10^{-4} M. El modo de proceder para la preparación del microchip está descrito dentro de Material y métodos (apartado 3.3.2.). El recubrimiento del canal se realizó después del lavado con agua y antes de introducir el tampón de separación, pasando una disolución concentrada del derivado de celulosa (Se probaron concentraciones de 0.1, 0.2, 0,3 % (m/v) de HPMC en tampón de separación (12 mM Trizma, 0.4 % (m/v) SDS, pH 8.5)), durante 40 minutos para que se adsorbiese la HPMC sobre las paredes del canal. En el tampón de separación, la concentración de HPMC era de 0.05 % (m/v), suficiente para actuar como agente de cribado.

Los resultados que se obtuvieron de estos experimentos no fueron los esperados ya que se observó que la fluoresceína se movía de manera no controlada a lo largo de los canales del chip. En la figura 9 se muestra un ejemplo de una inyección, por medio de una serie de fotogramas consecutivos del video (fotogramas a - g), donde se puede observar que, mientras se aplicaba una diferencia de potencial

constante a los diferentes pocillos del microchip, la muestra primero avanzaba para luego retroceder y, finalmente, volver a entrar en el canal de muestra del microchip.

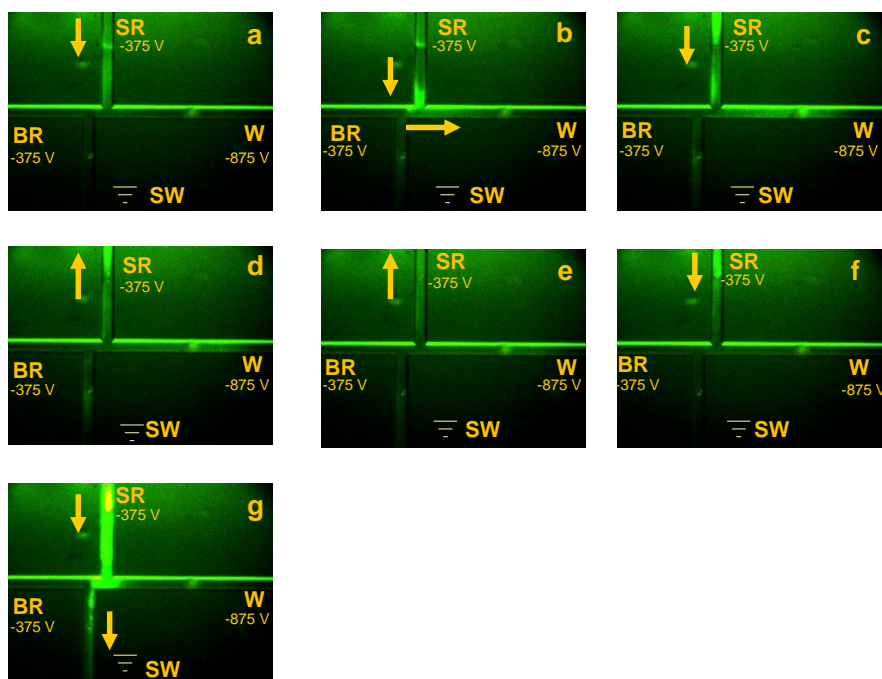


Figura 9. Fotogramas de la inyección de la muestra de fluoresceína 10^{-4} M en un microchip de PMMA con los canales recubiertos con 0.2 % HPMC. La figura está dividida en diferentes fotogramas consecutivos tomados mientras se realiza la inyección de la muestra. Diferencia de potencial de -375 V entre SR y SW. Las flechas indican el movimiento de la muestra en el interior del microchip, mientras se aplica la diferencia de potencial anterior.

La naturaleza del movimiento aleatorio de la muestra demostraba que no existía un flujo electroosmótico estable, probablemente, fruto de la acción conjunta de múltiples factores. Por un lado, puede que parte de la HPMC adsorbida en la etapa de recubrimiento se disolviera en el buffer de separación que contenía menos celulosa, creándose por tanto zonas con diferente flujo

Resultados y discusión

electroosmótico y que podrían variar a lo largo del tiempo [182]. Por otro lado, el SDS, presente en el tampón de separación, puede que se adsorbiera sobre la superficie del PMMA creando también zonas con diferente carga superficial y, por tanto, flujo electroosmótico [58]. Finalmente, la distribución aleatoria e irreproducible a lo largo de los canales de inyección y separación de zonas de elevada densidad de carga eléctrica (elevado potencial ζ) y baja carga eléctrica podría dar lugar a formación de remolinos en el desplazamiento del tampón en el interior de los canales del chip [183]. La suma de estos factores hizo que no fuera posible obtener un resultado reproducible en esas condiciones, por ello, se buscó otra metodología que permitiera conseguir un mejor control sobre el flujo electroosmótico.

4.1.2. Estudio de la HPMC como polímero de cribado y EOTrol como agente de recubrimiento para separaciones por tamaño

Como alternativa a la metodología desarrollada anteriormente se decidió usar la HPMC como polímero de cribado pero en combinación con EOTrol LN[®] para recubrir los canales del microchip, y disminuir así el flujo electroosmótico del canal.

El EOTrol LN[®] es una sustancia comercial, empleada como agente de recubrimiento en la electroforesis capilar de proteínas. Es una disolución concentrada que contiene copolímeros de acrilamida N-sustituida [184]. Este tipo de recubrimiento es dinámico y se adiciona directamente al tampón de separación, haciendo que ya no sea necesaria una etapa previa de recubrimiento del canal

Estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de acondicionamiento indicado en Material y métodos (apartado 3.3.1.) y una vez preparado tampón de separación se le adicionó el EOTrol LN[®] al 10 % (v/v). Esta concentración es superior a la indicada por el fabricante, debido a que los experimentos iniciales realizados a dicha concentración (5 % (v/v)) mostraron que no se podía controlar de forma apropiada el movimiento de la muestra. Se evaluaron también distintas concentraciones de HPMC en el medio de separación como polímero de cribado, 0.1 % (m/v) y 0.5 % (m/v) y como analito se utilizó la proteína BSA 10^{-4} M derivatizada con el reactivo fluorogénico FQ.

Se estudió la capacidad del EOTrol LN[®] para disminuir el flujo electroosmótico en microchips de PMMA. Para ello se realizaron una serie de inyecciones consecutivas de la disolución de BSA en el canal del microchip, sin que hubiese HPMC en el tampón de separación. Se observó que en estas condiciones, se podían realizar hasta 20 inyecciones de esta muestra, con lo cual, se demostraba que el EOTrol LN[®] era útil para disminuir el flujo electroosmótico y mantenerlo estable.

A continuación, se estudió la compatibilidad del EOTrol LN[®] con la celulosa cuando ambos están presentes en el tampón de separación. Durante la preparación del medio de separación, al añadir el agente de recubrimiento, se observó un enturbiamiento de la disolución. Este fenómeno pudo ser debido a una interacción entre polímeros, tal y como está descrito en la bibliografía que ocurre al mezclar disoluciones de celulosa y dextrano [182]. La coprecipitación

Resultados y discusión

daba como resultado una elevada irreproducibilidad en las separaciones que se obtenían, probablemente debido a los agregados que se formaban entre la HPMC y el EOTrol LN[®]. Estos agregados eran fácilmente distinguibles al observar los canales del microchip al microscopio (figura 10a)

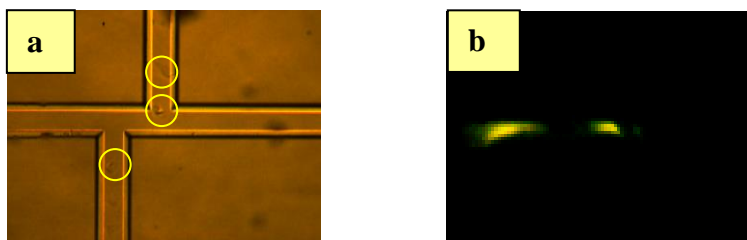


Figura 10. Fotografía de los canales del microchip de PMMA cuando la HPMC y el EOTrol LN están presentes en el tampón de separación. a) Fotografía en campo claro de la cruz de inyección donde pueden observarse en los círculos la presencia de grumos probablemente debidos a la interacción de los dos polímeros. (b) Fotografía en fluorescencia del bolo de muestra de BSA 10^{-4} M en el canal de separación iluminado por la lámpara de mercurio.

La formación en el canal de los agregados, provocaba la destrucción del bolo de muestra de BSA que se introducía en el microchip para el análisis. Este hecho se fotografió iluminando el microchip con luz procedente de la lámpara de mercurio (figura 10b) y se observó cómo la BSA era retenida o frenada al encontrarse con uno de esos agregados, que se movían de forma aleatoria por el interior del canal. De esta forma, se perdía la eficacia y la reproducibilidad de la separación. Al obtener los electroferogramas a partir de los videos que se registraron correspondientes a estos análisis, éstos mostraban múltiples picos, no correspondientes al número de analitos que se estaban analizando y completamente aleatorios (figura 11).

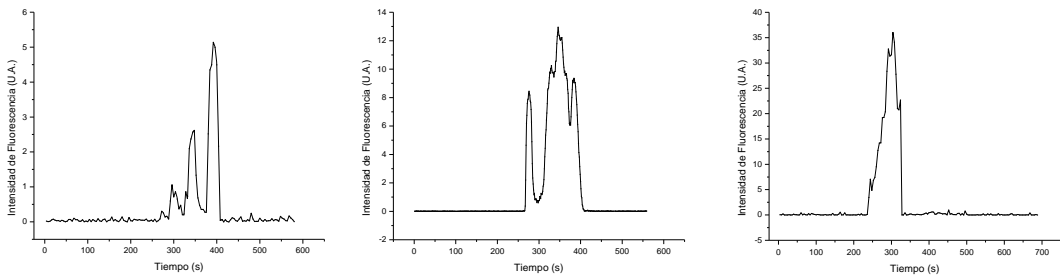


Figura 11. Electroferogramas de BSA 10^{-4} M. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 0.1 % (m/v) HPMC y 10 % (v/v) EOTrol LN[®]. Longitud del canal de separación: 4.7 cm. Fuente de excitación: lámpara de mercurio.

Estos resultados muestran que la metodología utilizada tampoco era apropiada para el análisis por electroforesis capilar, debido a la incompatibilidad existente, por su interacción, entre los polímeros de cribado y de recubrimiento.

4.1.3. Evaluación del poli(etilenglicol) como polímero de cribado y EOTrol como agente de recubrimiento para separaciones por tamaño.

A continuación, se decidió abordar el empleo de otro polímero como agente de cribado para la separación de proteínas compatible con el EOTrol[®], ya que se había comprobado que éste era eficaz como supresor del flujo electroosmótico en microchips de PMMA. Se escogió el poli(etilenglicol) (PEG), el cual ha sido ampliamente usado para separar proteínas por tamaño en electroforesis capilar debido a la baja viscosidad de sus disoluciones [185-187]. Existen en el mercado multitud de poli(etilenglicoles) con diferentes pesos moleculares, en

Resultados y discusión

este trabajo se han explorado los PEGs de 8000, 35000 y 100000 g/mol.

Para determinar la concentración de polímero adecuada para llevar a cabo una separación por tamaño fue necesario conocer la concentración a partir de la cual se produce interacción entre las cadenas del mismo, formándose así un entramado (*entanglement concentration* (c^*)) [188]. Esta interacción es la que permite que se forme en el interior del canal una estructura de malla que separa los analitos en función de su tamaño. Para calcular dicha concentración se recurrió a considerar la aproximación de régimen semi-diluido (c^* inferior al 10 % (m/v)). La fórmula que se aplicó fue la siguiente:

$$c^* \cong 1.5 \cdot [\eta]^{-1}$$

donde η es el valor de la viscosidad intrínseca del polímero en estas condiciones.

A su vez, para calcular la viscosidad se hizo uso de la aproximación de Mark-Houwink, la cual es una aproximación empírica que se puede aplicar a un gran número de polímeros:

$$[\eta] \approx K \cdot M_w^a$$

donde a y K son parámetros moleculares característicos para cada sistema polímero/disolvente y que dependen de la temperatura.

Para el caso de PEG disuelto en agua, los valores de a y K a 25 °C son 0.76 y 0.016 mL/g respectivamente [189].

Se empezó estudiando el PEG de 8000 g/mol como polímero de cribado. Inicialmente se preparó una disolución de este polímero al 10

% (m/v), concentración que corresponde a su valor de c^* , en el tampón de separación que contenía 5 mM bórax y 0.1 % SDS (m/v) a pH 8.5. Una vez preparada se le adicionó el 10 % (v/v) EOTrol LN[®] y se observó que la disolución enturbiaba. Esa turbidez no se eliminaba al agitar la disolución, como ya sucedía en el caso de la HPMC, con lo cual descartó este PEG.

Se estudió a continuación el PEG de 35000 g/mol como agente de formación del entramado polimérico. Por el mismo procedimiento que antes se estimó que para este polímero el valor de c^* correspondía a 3.3 % (m/v). Para determinar la concentración apropiada de polímero en el tampón de separación para separar proteínas se realizaron una serie de experimentos preliminares. Se probaron tres concentraciones de polímero empezando por el 3 % (m/v) y las otras dos superiores a este valor, 6 y 10 % (m/v) ya que el tamaño de poro creado por un polímero dado depende sólo de su concentración y va disminuyendo conforme aumenta su concentración [181, 190]. En primer lugar, se preparó el tampón de separación (5 mM bórax y 0.1 % SDS (m/v) a pH 8.5) con el PEG de 35000 g/mol y después se añadió el 10 % (v/v) de EOTrol LN[®], no observándose un enturbiamiento de la disolución, con lo cual se decidió continuar con este estudio. El protocolo electroforético que se llevó a cabo está descrito en la parte de Material y métodos (apartado 3.3.2) y los analitos que se escogieron fueron la α -lactoalbúmina y la BSA en concentraciones de 10^{-4} M y $5 \cdot 10^{-5}$ M, respectivamente.

Se observó que cuando se empleó el tampón de separación que contenía el 3 % (m/v) de PEG (figura 12a) no se obtuvo ningún tipo

Resultados y discusión

de separación, sino que apareció un solo pico con cierta asimetría en la parte frontal. Al aumentar la concentración del polímero de cribado al 6 % (figura 12b), se empezó a ver que aparecía un hombro delante del pico pero tampoco se obtenía una resolución suficiente. Cuando se aumentó al 10 % (m/v) la concentración de PEG en el tampón de separación, se obtuvo una separación de las dos proteínas (figura 12c). La mayor anchura del pico correspondiente a la BSA en relación al de la α -lactoalbúmina se explica en base a que la BSA es una proteína que puede formar agregados por la presencia de una cisteína libre en el residuo 34 de su estructura. Estos residuos de cisteína hacen que la BSA comercial contenga entre un 4 - 10 % de dímeros y agregados superiores [191]. La identificación de los picos se hizo por adición a la muestra de una concentración superior de proteína patrón. De estos experimentos se llegó a la conclusión de que la concentración más apropiada para separar por tamaño estas dos proteínas era la disolución con el 10 % de PEG 35000 g/mol.

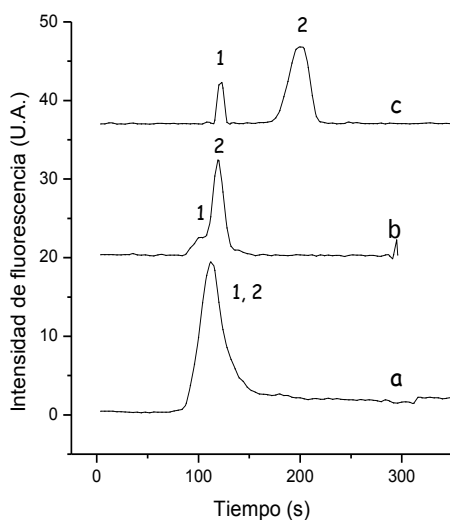


Figura 12. Electroferogramas con diferente concentración de polímero de cribado: (a) 3 % (m/v) PEG 35000, (b) 6 % (m/v) PEG 35000 y (c) 10 % (m/v) PEG 35000. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 10 % (v/v) EOTrol LN[®] a pH 8.5. Inyección tipo *gated*: 10 s. Voltajes aplicados durante la separación: -625 V BR, -500 V SR, resto de pocillo conectados a tierra. Longitud del canal de separación: 0.5 cm.. Fuente de excitación: lámpara de mercurio. Proteínas: (1) α -lactoalbúmina 100 μ M y (2) BSA 50 μ M.

En estas condiciones, se decidió estudiar la repetibilidad del método. Se observó, que al realizar un segundo análisis de la muestra en el mismo microchip, después de haber sido acondicionado, no se obtenían los mismos resultados. Por el contrario, lo que sucedía era que o bien no se inyectaba la muestra o ésta entraba de forma continua, produciendo una gran aleatoriedad en los resultados que se obtenían. La figura 13 recoge el electroferograma que se obtuvo al realizar un primer análisis en un microchip de PMMA (figura 13a) que muestra una buena separación de las dos proteínas y el resultado obtenido al realizar una segunda separación en el mismo microchip, después de haber ejecutado el protocolo de lavado del mismo (figura

Resultados y discusión

13b). En este último electroferograma no se obtuvo ninguna señal al realizar la inyección de la muestra a la concentración anterior.

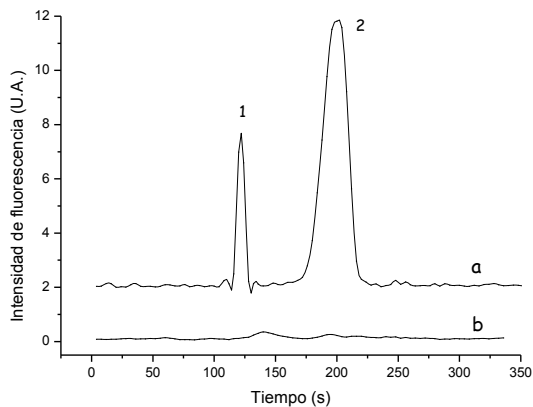


Figura 13. Electroferogramas (a) primer análisis en un microchip de PMMA y (b) segundo análisis obtenido en un microchip de PMMA tras el acondicionamiento del mismo. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 10 % (m/v) PEG 35000 g/mol, 10 % (v/v) EOTrol a pH 8.5. Resto de condiciones electroforéticas como en la figura 12. Proteínas: (1) α -lactoalbúmina 100 μ M y (2) BSA 50 μ M.

Teniendo en cuenta este fenómeno y que para determinadas aplicaciones los microchips son de un solo uso, se estudió la repetibilidad del método. Se utilizaron 4 microchips de PMMA diferentes, en los que se repitieron los experimentos anteriores en las mismas condiciones y se tomaron los datos de la primera inyección de muestra en cada uno. Los resultados que se obtuvieron se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de reproducibilidad obtenida entre diferentes análisis (n = 4).

Proteínas	Tiempo de migración		Área	
	Media (s) ± SD	RSD	Media (U.A.) ± SD	RSD
α-Lactoalbúmina	140 ± 30	23	20 ± 12	61
BSA	220 ± 40	18	70 ± 64	96

La reproducibilidad en los tiempos de migración y en las áreas que se obtuvo para los analitos fue bastante mala, a pesar de haber usado un microchip distinto para cada inyección. La posible explicación de este fenómeno puede ser la falta de reproducibilidad tanto en el PMMA que constituye a los microchips, como en el proceso de fabricación de éstos, que altera la superficie haciendo que los resultados del flujo electroosmótico varíen de unos microchips a otros [180, 192]. Este hecho, junto con el coste que implica utilizar un microchip nuevo para cada análisis, hace que sea necesario el reutilizar un mismo microchip varias veces.

Se establecieron dos hipótesis como posibles orígenes de este problema, las cuales se comprobaron por separado. Por una parte, la falta de reproducibilidad podía deberse a la elevada viscosidad del tampón de separación que dificulta la renovación de éste entre los análisis y el equilibrado del microchip. Y otra posible causa podía ser un incorrecto protocolo de lavado del microchip entre inyecciones. Para estudiar estas causas de irreproducibilidad se diseñaron los experimentos que se detallan a continuación.

Resultados y discusión

Si el origen de esta falta de reproducibilidad era la elevada viscosidad del tampón de separación, una posible solución era el emplear un tampón de separación de menor viscosidad. Para ello se decidió estudiar un derivado de PEG de mayor longitud de cadena, ya que como está descrito en la bibliografía, cuanto mayor es el peso molecular del polímero empleado, más baja es la concentración de dicho polímero necesaria para formar un entramado, siendo por tanto esta disolución de menor viscosidad [190]. Se escogió el PEG de peso molecular de 100000 g/mol, con una c^* de 1.5 % (m/v). Este polímero presenta la particularidad de que cuando se trata de cadenas de mayor peso molecular su denominación cambia y pasa a llamarse óxido de poli(etileno) (PEO). Se empezó por estudiar una concentración de polímero en el tampón de separación del 3 % (m/v), para que así resultara más inmediata la comparación entre los resultados obtenidos para diferentes variantes del mismo polímero.

En primer lugar, se midió la viscosidad de cada una de las disoluciones y se compararon los valores obtenidos. Para ello se prepararon los tampones de separación por separado con el 10 % (m/v) de PEG 35000 g/mol y el 3 % (m/v) de PEO 100000 g/mol, sin EOTrol LN[®] en ninguno de los dos casos. Este último reactivo no se añadió, debido a que para realizar la medida de viscosidad se precisaban unos volúmenes de disolución de 250 mL y por tanto, habría que añadir un gran volumen de EOTrol LN[®], el cual posee un precio elevado para ser usado en esta prueba. La medida de la viscosidad se realizó con un viscosímetro Brookfield, con el rotor número 2 y una velocidad de giro de 200 vueltas por minuto para las

dos disoluciones. Los valores que se obtuvieron eran concordantes con lo esperado, ya que la disolución con el 10 % (m/v) de PEG 35000 g/mol poseía una viscosidad aparente en estas condiciones de 79.8 cP y la disolución del 3 % (m/v) PEO 100000 g/mol tenía una viscosidad aparente en las mismas condiciones de 46.2 cP.

Se realizó entonces la separación de las dos proteínas patrón de suero lácteo cambiando el polímero de cribado. El tampón de separación que se utilizó fue 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 3 % (m/v) PEO 100000 g/mol y 10 % (v/v) EOTrol LN[®] a pH 8.5. Se preparó siguiendo el mismo procedimiento que antes, es decir, añadiendo el EOTrol LN[®] a la disolución final con el polímero de cribado. Esta vez, tampoco se observó un enturbiamiento de la disolución final. Los analitos y sus concentraciones fueron iguales a los que se emplearon en los experimentos anteriores y también el resto de parámetros electroforéticos. En estas condiciones se consiguió un principio de separación entre las dos proteínas (figura 14).

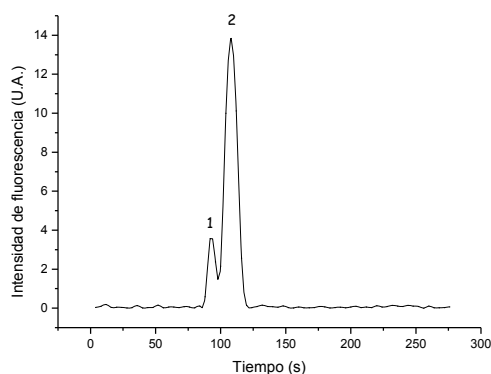


Figura 14. Electroferograma de la separación de proteínas α -lactoalbúmina y BSA. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 3 % (m/v) PEO 100000 g/mol, 10 % (v/v) EOTrol LN[®] a pH 8.5. Resto de condiciones electroforéticas como en la figura 12. Proteínas: (1) α -lactoalbúmina 100 μ M y (2) BSA 50 μ M.

Resultados y discusión

Sin embargo, y a pesar de la disminución de viscosidad del tampón de separación se continuó observando la irreproducibilidad en la inyección de la muestra, al igual que en el caso anterior, demostrando por tanto que esta hipótesis no era correcta.

La segunda hipótesis que se estableció fue que la falta de reproducibilidad se debía a un incorrecto protocolo de lavado del microchip entre inyecciones. La razón era que posiblemente, a pesar de la presencia de EOTrol LN® en el medio de separación, después de una inyección de muestra parte de ésta, se quedase adsorbida sobre el canal y no se eliminara mediante el acondicionamiento entre análisis.

Para abordar este problema se exploraron diversas metodologías de limpieza de los microchips entre análisis, que iban desde aumentar los tiempos de lavado con NaOH 0.1 M o con agua, a lavados más agresivos de los canales del microchip con NaOH 1 M o bien la mezcla propuesta por Hjerten y Kubo [193] de NaOH 0.1 M y SDS al 5 % (m/v). A pesar de todos los esfuerzos que se realizaron por encontrar un protocolo de limpieza, adecuado no se pudo encontrar uno que permitiera reutilizar los microchips.

Shadpour y colaboradores [192] han comparado la repetibilidad de los tiempos de migración de la miosina en microchips de PMMA de diferentes calidades con canales sin recubrir y recubiertos con BSA, utilizando cromatografía electrocinética micelar con SDS en el tampón de separación. Las repetibilidades en los tiempos de migración que se obtuvieron fueron 1,5 – 2,1 % (para el mismo microchip) y 3,1 – 5,1 % (para diferentes microchips) en canales no recubiertos y 0.7 - 1,3 % (para el mismo microchip) y 1,4 – 2,2 %

(para diferentes microchips) en canales recubiertos con BSA. En nuestro caso las repetibilidades obtenidas para los tiempos de migración entre diferentes microchips fueron un orden de magnitud peor.

A pesar de los intentos que se han realizado en este trabajo para mejorar la repetibilidad, esto no ha sido posible. Pensamos que el procedimiento aquí utilizado para el control del flujo electroosmótico no es suficientemente eficaz para los microchips de PMMA empleados. Este hecho junto con el precio que tenía cada microchip (70 euros/unidad) hizo que se buscara un microchip polimérico de otro material que permitiese una mejor repetibilidad entre análisis y que, a ser posible, fuese reutilizable, y así poder rentabilizar el coste.

4.2. ESTUDIO DE LOS MICROCHIPS POLIMÉRICOS DE SU-8 PARA LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

Los microchips de electroforesis capilar, como ya se describió en la introducción, pueden ser fabricados en múltiples materiales. Entre los materiales que han sido utilizados recientemente para fabricar microchips poliméricos y realizar en ellos separaciones electroforéticas se encuentra el SU-8, el cual fue propuesto por Sikanen y colaboradores en el 2005 [46]. Este material se caracteriza por tener unos valores de flujo electroosmótico (EOF) similares al vidrio a pH superiores o iguales a 4, pero, a diferencia del vidrio, cuando se alcanzan pH inferiores a 3 el sentido del EOF se invierte (hacia anódico) [46].

El SU-8 es un material polimérico basado en una resina epoxi (el glicidil éter de bisfenol A), la cual puede ser fácilmente grabada por fotolitografía. Esta resina cuando se expone a radiación ultravioleta y en presencia de un fotoiniciador, se endurece por el entrecruzamiento de las cadenas de polímero a través de los grupos epoxi. Como fotoiniciador se suele usar una combinación de sales de hexafluoro antimonio de triaril sulfonio. De esta forma, se origina una estructura rígida desde el punto de vista mecánico, en la que se han convertido los grupos epoxi de los polímeros en éteres e hidroxilos alifáticos [46]. El polímero resultante presenta excelentes propiedades mecánicas, es estable químicamente frente a ácidos y bases y, además, es altamente transparente a la radiación en la región visible del espectro y en el ultravioleta cercano [194]. Aunque no existen

Resultados y discusión

muchos antecedentes en la bibliografía, estas buenas propiedades del SU-8 nos decidieron a explorar este tipo de microchip para realizar separaciones electroforéticas de proteínas lácteas y aplicarlos al análisis de muestras naturales.

4.2.1. Efecto del EOTrol sobre el flujo electroosmótico de los microchips de SU-8

El valor del flujo electroosmótico y su repetibilidad de unas separaciones a otras son como se ha comentado anteriormente, dos aspectos fundamentales para obtener resultados reproducibles en las separaciones por electroforesis capilar. Por esta razón, en primer lugar se determinó el valor del EOF de estos microchips de SU-8.

Las medidas del flujo electroosmótico se realizaron siguiendo el método propuesto en el artículo de Viovy [171] que consiste en llevar a cabo una electroforesis frontal usando rodamina B como marcador neutro. El procedimiento que se utilizó se describe en el apartado 3.3.3. de Material y métodos. En estas condiciones, el flujo electroosmótico era catódico y el valor que se obtuvo para el microchip de SU-8 sin ningún tipo de recubrimiento fue de $1.8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$, valor ligeramente inferior, aunque del mismo orden que el dado en el trabajo de Sikanen y colaboradores a pH superiores a 7 ($5.8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$) [46]. La diferencia en el valor del EOF obtenido puede ser debida a la diferente composición química por el fotoiniciador utilizado o su concentración empleada en la preparación de los microchips de SU-8 en los diferentes laboratorios. De hecho, cabe

destacar que en el artículo anteriormente citado se muestra que los valores de repetibilidad de EOF obtenidos al comparar microchips procedentes de 4 lotes diferentes difieren un 15.6 % y se justifica dicha variación en base al proceso de fabricación. La repetibilidad (% RSD) del EOF entre análisis diferentes utilizando el mismo microchip obtenida en el trabajo desarrollado en esta Memoria fue del 11 % (n=3). El grupo de Sikanen en el trabajo mencionado, obtuvo para microchips de SU-8 repetibilidades de 0.6 – 7.8 %, valores ligeramente mejores a los obtenidos en este trabajo.

La separación de proteínas por tamaño mediante electroforesis capilar con polímero de cribado (μ CSE) requiere anular o disminuir el valor del flujo electroosmótico del capilar o del canal de microchip. Si lo anterior no se cumple, se puede producir el movimiento del polímero de cribado que conlleva una disminución en la resolución de la muestra [195]. Esto es particularmente crítico en el caso de los microchips donde las distancias de separación son de tan solo unos centímetros. Con este fin, se ha utilizado en este trabajo el recubrimiento dinámico comercial EOTrol LN[®], añadiéndolo en el tampón de separación teniendo en cuenta los resultados prometedores obtenidos inicialmente en microchips de PMMA.

En primer lugar, se evaluó la capacidad del EOTrol LN[®] para disminuir el EOF de los microchips de SU-8 en las condiciones experimentales seleccionadas. Para ello, se adicionaron diferentes concentraciones del agente de recubrimiento (desde 0 al 12 % (v/v)) al tampón de separación y se midió el EOF. Se observó que un incremento de EOTrol LN[®] en el medio de separación producía una

Resultados y discusión

disminución del flujo electroosmótico, hasta alcanzar un valor constante cuando se añadía el 8 % (v/v) del mismo. En estas condiciones el valor del EOF residual fue de $4.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ siendo éste 4 veces menor al que poseían los microchips sin recubrir. Este estudio nos permitió fijar la concentración final óptima de EOTrol LN[®] para nuestros estudios en un 10 % (v/v), concentración que nos aseguraba haber alcanzado el valor más bajo del flujo electroosmótico. Empleando también un recubrimiento dinámico en microchips de SU-8, Sikanen y colaboradores obtuvieron una disminución en el valor del EOF de dos veces respecto al microchip sin recubrimiento mediante el uso de agregados de fosfolípidos (discos) [196].

4.2.2. Efecto del EOTrol sobre la adsorción de las proteínas en los microchips de SU-8

Además de disminuir el flujo electroosmótico, otra de las propiedades deseables para un recubrimiento dinámico, es que impida la adsorción de los analitos sobre las paredes del capilar o del canal, ya que esto genera una pérdida de la eficacia en la separación, de la resolución y de la sensibilidad del método. Se estudió la posibilidad de que el EOTrol LN[®] cumpliera dicha función. Para ello, se realizaron una serie de inyecciones repetitivas de una disolución de BSA disuelta en tampón de separación sin polímero de cribado, ni EOTrol LN[®] (50 μM) en un microchip nuevo de SU-8. Se eligió la BSA al ser una proteína que se caracteriza por mostrar un elevado poder de

adsorción sobre diversas superficies. La adsorción de BSA se estudió en las siguientes condiciones: (i) tampón de separación sin el polímero de cribado y sin EOTrol LN[®], (ii) tampón de separación con el polímero de cribado (10 % (m/v) dextrano) sin EOTrol LN[®], y (iii) tampón de separación sin el polímero de cribado y con 10 % (v/v) de EOTrol LN[®].

Se observó que en las condiciones en las cuales no se añadió EOTrol LN[®] en el medio de separación (condiciones i, ii), el movimiento de la BSA era a favor del flujo electroosmótico, ya que éste no estaba suprimido. Además, este comportamiento sólo se podía observar en la primera inyección de muestra, produciéndose a continuación de esta inyección un retroceso del bolo de proteína con un movimiento en contra del flujo electroosmótico. Este cambio de sentido podía ser debido a la fuerte adsorción de la proteína sobre el canal polimérico que provoca, como está descrito en la bibliografía, alteraciones en el EOF [94, 95]. Por el contrario, cuando el tampón de separación contenía EOTrol LN[®] (condición iii), aparentemente se conseguía disminuir el EOF y se disminuía la adsorción de BSA sobre la pared del canal, de forma que la proteína migraba según su movilidad electroforética. En estas condiciones, se pudo realizar 10 inyecciones consecutivas de la muestra sin que se observara un aumento significativo en la anchura de pico y produciéndose sólo una disminución en la altura de pico entorno al 30 % (figura 15).

Resultados y discusión

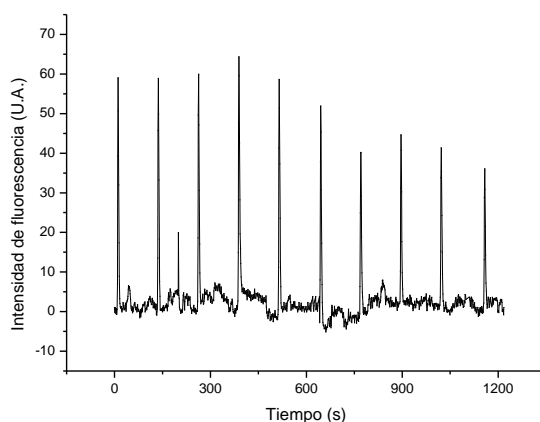


Figura 15. Electroferograma de 10 inyecciones consecutivas de BSA 50 μM disuelta en tampón de separación sin polímero de cribado ni EOTrol LN[®] en un microchip de SU-8. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 10 % (v/v) EOTrol a pH 8.5. Inyección tipo *gated*: 2 s. Voltajes aplicados en los pocillos: etapa carga/separación -750 V BR, -625 V SR, resto de pocillos conectados a tierra; inyección -750 V SR, W estaba conectado a tierra y resto de pocillos flotando. Longitud de canal de separación 0.3 cm. Fuente de excitación: lámpara de mercurio.

La observación de que la BSA derivatizada se adsorbe sobre la superficie del canal del SU-8 cuando se emplean los tampones sin EOTrol LN[®] concuerda con lo encontrado de forma general por el grupo de Allbritton [197] y por el de Sikanen y colaboradores [198]. En este último trabajo se sugiere que este hecho se explica por el carácter hidrofóbico del SU-8, ya que al pH del tampón utilizado (8.5) la proteína BSA con pI 4.5 estaría negativamente cargada, con lo cual las interacciones con las cargas negativas de la pared del canal deben ser despreciables. Sin embargo, en este trabajo, a diferencia de lo observado por Sikanen, el tampón que sólo contiene SDS (3.5 mM) como aditivo (condición i), no es capaz de evitar dicha adsorción. Una probable explicación es que el FQ al ser una molécula neutra, el carácter hidrofóbico del conjunto BSA-FQ debe ser superior al que

presenta la BSA derivatizada con FITC (isotiocianato de fluoresceína), que en estas condiciones está cargado negativamente, usada en el trabajo de Sikanen.

De los resultados anteriores se extrae que el EOTrol LN[®] cumple una doble función, disminuir el EOF y la adsorción de proteína sobre las paredes del canal.

4.2.3. Estudio del poli(etilenglicol) como polímero de cribado

El tipo de polímero de cribado es otro de los parámetros que es necesario evaluar en la separación de analitos por tamaño. Su elección se basó en la experiencia adquirida durante el empleo de los microchips de PMMA (apartado 4.1.3.). En esos experimentos se usó poli(etilenglicol) como polímero de cribado y se comprobó que era compatible con el uso del EOTrol LN[®]. También se observó que las mejores eficacias de separación se conseguían con el tampón de separación del 10 % (m/v) de PEG 35 kDa, sin embargo, estas disoluciones tenían una elevada viscosidad que dificultaba su introducción y reemplazo en los canales del microchips.

Como alternativa, se estudió otro derivado de poli(etilenglicol), el óxido de poli(etileno) (PEO) de 100 kDa, cuya disolución presentaba una menor viscosidad, lo que facilitaba el acondicionamiento del microchip. Por esta última razón, se optó por empezar los estudios con la disolución de PEO y el primer punto que se abordó fue la posibilidad

Resultados y discusión

de la reutilización de los microchips de SU-8 para la separación de proteínas por tamaño.

4.2.3.1. Reutilización de los microchips de SU-8 para la separación por tamaño de proteínas lácteas.

Como ya sucedió con los microchips de PMMA, el coste de los chips de SU-8 era demasiado elevado para ser utilizados una sola vez. Por esta razón, se evaluó en primer lugar la posibilidad de reutilización de este tipo de microchips. Para ello, se comprobó si se conseguía la separación por tamaño de la mezcla de α -lactoalbúmina y BSA derivatizadas con FQ.

Las condiciones experimentales fueron las mismas que las utilizadas en los estudios realizados en los microchips de PMMA (apartado 4.1.3.), como resultado se obtuvo un electroferograma en el que se conseguía la separación de estas proteínas (figura 16), aunque con una resolución baja ($R_s = 0,7$). Por adición de una concentración superior de patrón de cada proteína a la mezcla se observó que el primer pico correspondía a la α -lactoalbúmina, que tiene un peso molecular de 14178 Da, y el segundo a la BSA cuyo peso es de 66000 Da. Como anteriormente, la identificación de las proteínas en la muestra se hizo por sucesivas adiciones de proteína patrón a la muestra.

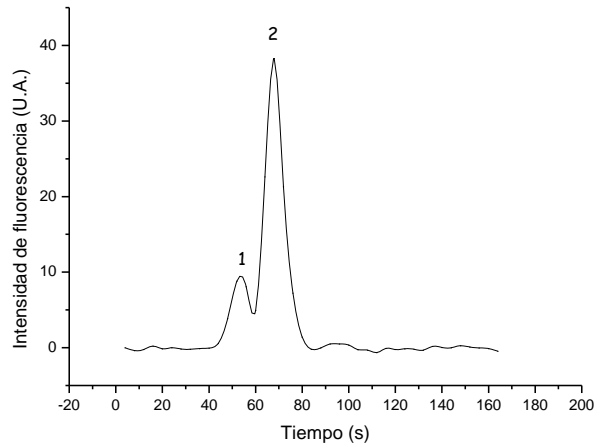


Figura 16. Electroferograma de la mezcla de α -lactoalbúmina y BSA en un microchip de SU-8. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 3 % (m/v) PEO 100 kDa, 10 % (v/v) EOTrol a pH 8.5. Inyección tipo *gated*: 5 s. Voltajes aplicados durante la separación: -625 V BR, -500 V SR y resto de pocillos a tierra. Longitud del canal de separación: 1.5 cm. Fuente de excitación: lámpara de mercurio. Picos: (1) α -lactoalbúmina 100 μ M y (2) BSA 50 μ M.

La figura 16 puso de manifiesto que se podía conseguir la separación de las dos proteínas con una resolución entre picos similar a la obtenida en los microchips de PMMA pero usando otro tipo de material, como es el SU-8.

A continuación, se comprobó si se podía reutilizar un mismo microchip. Se observó que al llevar a cabo un segundo análisis después de acondicionar el microchip (Material y métodos, apartado 3.3.1.) se conseguía la señal correspondiente a las dos proteínas, a diferencia de los resultados que se obtuvieron para el PMMA. El estudio se realizó con un solo microchip y, aunque la repetibilidad no era muy elevada (ver tabla 4), se demostró que los microchips de SU-8 se podían reutilizar para este tipo de separaciones.

Resultados y discusión

Tabla 4. Datos de reproducibilidad obtenidos entre diferentes análisis.

Proteínas	Repetibilidad (n = 3).			
	Tiempo de migración		Área	
	t_m (s) \pm SD	RSD (%)	Área (U.A.) \pm SD	RSD (%)
α -LA	45 \pm 7	17	380 \pm 189	50
BSA	50 \pm 8	16	450 \pm 169	37

Este estudio preliminar con microchips de SU-8 indicó que estos microchips eran prometedores para nuestro estudio pues permitían una separación de proteínas (aunque con baja resolución en las condiciones ensayadas), el EOTrol LN[®] disminuía la adsorción de proteínas sobre su superficie y eran reutilizables.

4.2.3.2. Elección del derivado de poli(etilenglicol)

Una vez comprobada la compatibilidad de los microchips de SU-8 para este tipo de separación, se decidió continuar con el desarrollo y optimización de un método para la separación por tamaño de las proteínas de suero lácteo. Para ello, se tomaron como punto de partida los polímeros PEG 35 kDa y PEO 100 kDa en el tampón de separación (ver apartado 4.1.3), los cuales ya demostraron su capacidad de separar las mencionadas proteínas en los microchips de PMMA.

Para facilitar la elección del polímero de cribado, se construyeron las correspondientes curvas de Ferguson (logaritmo de la movilidad de cada proteína frente a la concentración de polímero de

cribado) para PEG 35 kDa y PEO 100 kDa, de manera que la mejor separación se obtendrá con aquella concentración de PEG en la que las diferencias entre las movilidades de cada proteína sean mayores. Las condiciones electroforéticas utilizadas fueron las descritas en el apartado 3.3.2. de Material y métodos, excepto la longitud del canal de detección que fue de 3.5 cm en los dos casos (se aprovechaba toda la longitud de canal disponible en el microchip) y el voltaje de separación utilizado de -875 V, de esta manera se estudiaba la máxima capacidad de separación en estas condiciones. Como analitos, se utilizaron las proteínas α -lactoalbúmina $5 \cdot 10^{-5}$ M y BSA $5 \cdot 10^{-6}$ M derivatizadas con FQ.

En primer lugar, se estudió la concentración de PEG 35000 g/mol en el medio de separación probándose los valores 3, 6 y 7 % (m/v) (ver figura 17). No fue posible realizar un ensayo a concentraciones superiores al 7 % de polímero debido a la elevada viscosidad que presentaba el tampón de separación con esa composición de PEG. Las pendientes de las rectas que se obtuvieron fueron -0.044 para la α -lactoalbúmina y -0.048 para la BSA, y las ordenadas en el origen fueron -3.690 y -3.758 respectivamente. El hecho de que las pendientes de las dos rectas no sean paralelas indica que al aumentar la concentración de polímero en el tampón se consigue mejorar la selectividad de la separación.

Resultados y discusión

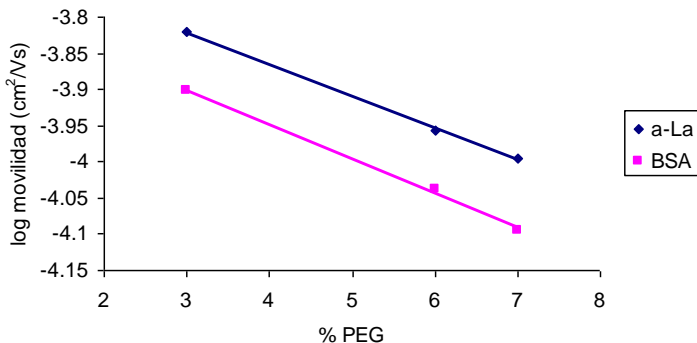


Figura 17. Variación de la movilidad de las proteínas α -lactoalbúmina $5 \cdot 10^{-5}$ M y BSA a $5 \cdot 10^{-6}$ M en función del porcentaje de PEG 35 kDa (3, 6, 7 % (m/v)) añadido al tampón de separación para los microchips de SU-8. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 10 % (v/v) EOTrol a pH 8.5. Inyección tipo *gated*: 3s. Voltajes aplicados durante la separación: -875 BR, -750 SR y resto de pocillos conectados a tierra. Longitud del canal de separación: 3.5 cm. Fuente de excitación: lámpara de mercurio.

A continuación, se repitieron estos estudios utilizando el PEO 100000 g/mol como polímero de cribado. Las concentraciones que se probaron en este caso fueron 1, 2, 3 y 4 % (m/v) en el tampón de separación. Se excluyeron los datos correspondientes al 4 % de PEO ya que no se obtuvieron resultados reproducibles, seguramente debido a la dificultad al llenar los canales por la alta viscosidad de esta disolución. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18. Las pendientes de las rectas fueron -0.060 para la α -lactoalbúmina y -0.071 para la BSA y las ordenadas en el origen fueron -3.580 y -3.639 respectivamente. Al igual que con el PEG, al aumentar la concentración de polímero mejora ligeramente la selectividad de la separación de ambas proteínas.

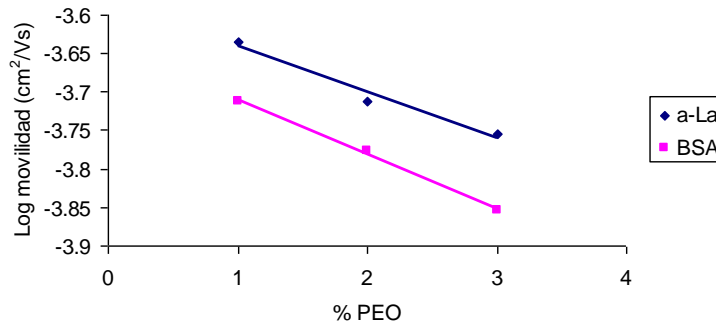


Figura 18. Variación de la movilidad de las proteínas α -lactoalbúmina $5 \cdot 10^{-5}$ M y BSA a $5 \cdot 10^{-6}$ M en función del porcentaje de PEO 100 kDa (1, 2 y 3 % (m/v)) añadido al tampón de separación. Resto de condiciones como en figura 17.

En ambos casos se observó que la separación se ajustaba al modelo de separación tipo Ogston. Este modelo asume que la movilidad de una partícula (por ejemplo, una proteína) es proporcional a la fracción disponible de volumen para sí misma dentro de un gel, de esta forma al aumentar la concentración del polímero de cribado en la disolución, aumenta su capacidad de separación [188]. En estas condiciones la representación de Ferguson que se obtuvo era lineal y la ordenada en el origen tenía un valor casi igual para las dos proteínas, en cada una de las condiciones probadas, lo cual se ajusta a este modelo de separación. Ese dato de la ordenada en el origen debe ser prácticamente el mismo, al corresponderse con la concentración cero de polímero de cribado en el tampón de separación y tener todas las proteínas la misma movilidad electroforética al encontrarse saturadas de SDS [190]. Además, tanto para PEG 35 kDa como para PEO 100 kDa, las pendientes de α -LA y BSA, aunque diferentes, no

Resultados y discusión

fueron muy distintas, lo que indica un bajo poder discriminatorio o baja selectividad de estos polímeros hacia dichas proteínas.

A continuación, se estudió la influencia de la longitud de separación (medida desde la cruz de inyección) sobre la resolución de las dos proteínas. Para ello se continuaron los experimentos usando el tampón de separación que contenía el 7 % (m/v) de PEG 35 kDa. Se eligió este tampón ya que fue el que permitió obtener una mejor separación entre las proteínas. Para calcular la resolución se utilizaron los datos de anchura de pico en la semialtura. Los valores encontrados se recogieron en la tabla 5.

Tabla 5. Resolución de la separación a diferentes longitudes de separación.

		Longitud de separación (cm).		
		1.5	2.5	3.5
Resolución		1.07	1.7	1.06

Se observó que la mejor resolución se obtenía a la distancia de 2.5 cm y que al aumentar la longitud de separación decrecía la resolución debido al ensanchamiento de las bandas que se ocasionaba. Este resultado parece extraño a primera vista, ya que la resolución entre dos proteínas (R_s) en una separación electroforética viene dada por:

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ap}}{\mu_m} N^{1/2}$$

donde $\Delta\mu_{ap}$ es la diferencia de movilidad aparente de las proteínas, μ_m es la movilidad media de ambas y N es la eficacia de la separación expresada como platos teóricos. Aunque en estos experimentos no se ha controlado la temperatura de los microchips, ya que los voltajes aplicados en las separaciones no eran muy elevados, en ausencia de efectos de la temperatura sobre la estructura del entramado polimérico creado en el interior del canal, el valor de N debe de permanecer casi constante al variar tan poco la longitud del canal de separación [199]. En estas condiciones el valor de R_s viene controlado por la diferencia de movilidad aparente de las proteínas, que debe de aumentar con la longitud del canal de separación. Este efecto se observa al comparar los valores obtenidos para la resolución al pasar de una longitud de separación de 1.5 cm a 2.5 cm. La disminución de resolución observada al pasar de 2.5 cm a 3.5 cm es probablemente debida a la irreproducibilidad del ensanchamiento de la banda durante la inyección; de hecho, en la tabla 4 se muestra un valor de % RSD del orden del 50 % entre análisis para las áreas de los picos de las proteínas separadas en un microchip de SU-8.

4.2.3.3. Optimización de la separación de proteínas empleando PEG 35 kDa como polímero de cribado

Partiendo de los resultados anteriores, se decidió continuar con el tampón de separación que contenía un 7 % (m/v) PEG 35 kDa para lograr la separación de los patrones de las tres proteínas mayoritarias del suero lácteo y poder aplicar la metodología a

Resultados y discusión

muestras naturales de leche. En este punto, se introdujo la β -lactoglobulina B en la mezcla de proteínas a analizar, en una concentración de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Las condiciones electroforéticas fueron las mismas que en los experimentos anteriores salvo por la distancia de separación que fue 2.5 cm, la cual se seleccionó para disminuir el ensanchamiento de la anchura de los picos y conseguir mayor resolución. En estas condiciones, el electroferograma que se obtuvo (figura 19) mostraba los picos de las tres proteínas bastante solapados entre sí, de hecho la α -lactoalbúmina se correspondía con un hombro del pico de la β -lactoglobulina. Esto es debido en parte a que la anchura de los picos era muy elevada y a que la diferencia entre los pesos moleculares de estas dos proteínas no es muy grande, la α -lactoalbúmina tiene un peso molecular de 14178 Da y la β -lactoglobulina de 18276 Da.

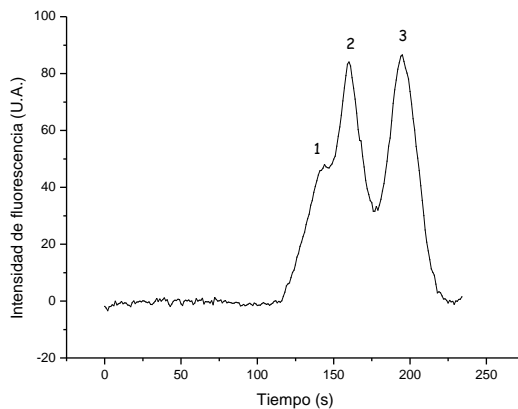


Figura 19. Electroferograma de la mezcla de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % SDS, 7 % PEG 35000 g/mol, 10 % EOTrol a pH 8.5. Inyección tipo *gated*: 5 s. Voltajes aplicados durante la separación: -875 V BR, -750 V SR y resto de pocillos conectados a tierra. Longitud del canal de separación: 2.5 cm. Fuente de excitación: lámpara de mercurio. Picos: (1) α -lactoalbúmina 50 μ M, (2) β -lactoglobulina 50 μ M y (3) BSA 5 μ M.

El problema de la baja resolución en la separación de la mezcla de proteínas lograda hasta este punto, se abordó de dos maneras diferentes.

En primer lugar, se exploró la posibilidad de hacer una preconcentración o *stacking* en el propio microchip. Con ello, se intentó ganar eficacia en la separación y aumentar la resolución. La preconcentración se realizó por diferencia de viscosidad entre la muestra, que no contenía polímero de cribado y que llenaba el canal de inyección de muestra (desde el pocillo de muestra al de desecho de muestra) y el tampón de separación, que contenía polímero de cribado, el cual llenaba el canal de separación (el procedimiento está descrito en el apartado 3.3.1. de Material y métodos). De esta forma, en la cruz de inyección, se producía el cambio de viscosidad y no en la entrada de la muestra al canal de muestra como en el caso anterior. Este procedimiento previo a la aplicación de voltaje al microchip es totalmente compatible con la inyección tipo *gated* que se ha estado utilizando, resultando ya formada la puerta por succión.

La introducción de esta etapa de preconcentración mejoró la separación entre las proteínas (ver figura 20), sobre todo entre las dos primeras, que en la figura 19 aparecían completamente solapados.

Resultados y discusión

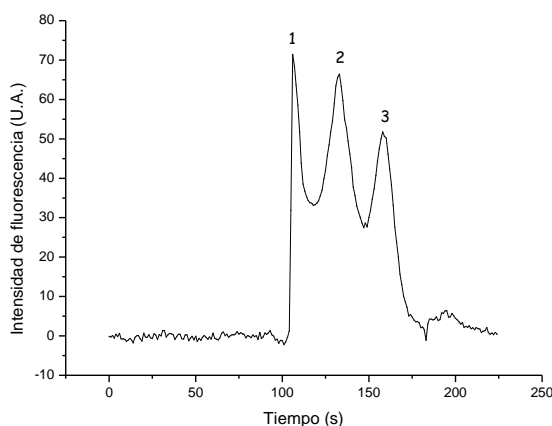


Figura 20. Electroferograma de la mezcla de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA con preconcentración de la muestra por stacking. Condiciones electroforéticas como en figura 19. Picos: (1) α -lactoalbúmina 50 μ M, (2) β -lactoglobulina 50 μ M y (3) BSA 5 μ M.

La proteína que más sufrió el cambio de viscosidad fue la de mayor movilidad electroforética, α -lactoalbúmina, siendo la que más se frenaba al introducirse dentro del canal de separación lleno del entramado polimérico. En base a la mejora en los resultados obtenidos, se decidió incluir este paso adicional en el protocolo de acondicionamiento del microchip.

A pesar de esta etapa añadida, la resolución entre los picos de las tres proteínas alcanzadas era baja, por lo que se estudió a continuación, otro de los parámetros que controlan la separación, el voltaje de separación. Esta prueba se realizó en las condiciones electroforéticas anteriores, con la mezcla de las 3 proteínas disminuyendo el voltaje de separación aplicado a -625 V. De esta manera, se intentó mejorar la separación de los analitos, al aumentar el tiempo de residencia dentro del canal. El resultado no fue el

esperado, ya que no sólo no se mejoró la resolución con respecto a la separación realizada a -875 V, sino que incluso los picos se ensancharon más incrementando su solapamiento (figura 21).

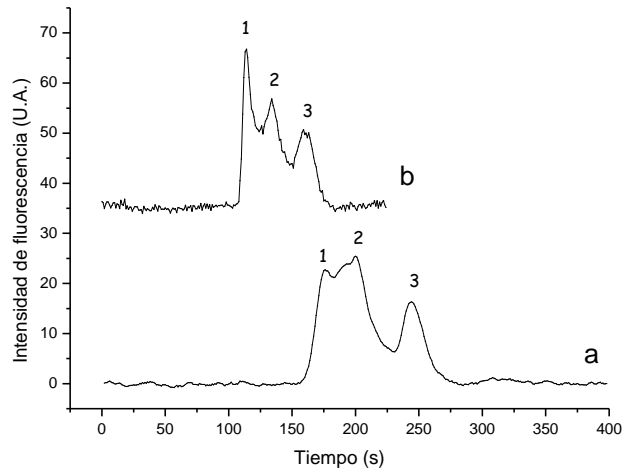


Figura 21. Electroferograma de la mezcla de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA con preconcentración de la muestra por *stacking*. Voltajes aplicados durante la separación: a) -625 V BR, -500 V SR y b) -875 V BR, -750 V SR, resto de pocillos conectados a tierra. Resto de condiciones electroforéticas como en figura 19. Picos: (1) α -lactoalbúmina $50 \mu\text{M}$, (2) β -lactoglobulina $50 \mu\text{M}$ y (3) BSA $5 \mu\text{M}$.

De estos experimentos se puede extraer que las mejores condiciones obtenidas para realizar la separación de las 3 proteínas en microchips de SU-8 usando geles de PEG 35 kDa son empleando una concentración de polímero en el tampón de separación del 7 % (m/v), haciendo *stacking* de la muestra por diferencia de viscosidad y a un voltaje de separación de -875 V aplicado en el pocillo del tampón de separación.

A continuación, se estudió la precisión del método en las mejores condiciones de análisis, calculándose la repetibilidad inter-día de los resultados. El RSD de los tiempos de migración y áreas se

Resultados y discusión

muestran en la tabla 6. La repetibilidad intra-día no se pudo calcular debido a que la suma de los tiempos de acondicionamiento de los microchips, tiempos de análisis y preparación de muestra, hacían que no fuera posible realizar 3 grupos de análisis diferentes en un mismo día. Los datos de RSD inter-día, tanto en tiempos de migración como en área de pico, también fueron muy altos, mostrando el método una falta de repetibilidad. Este hecho hace que el método desarrollado no sea útil para su aplicación analítica tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.

Tabla 6. Repetibilidad inter-día usando PEG 35000 en las condiciones optimizadas.

Proteínas	Repetibilidad (n=3)			
	Tiempo de migración		Área	
	t_m (s) \pm SD	RSD (%)	Área (U.A.) \pm SD	RSD (%)
α -LA	130 \pm 22	16	590 \pm 110	19
β -LG	170 \pm 29	18	660 \pm 198	30
BSA	190 \pm 28	15	500 \pm 106	18

El análisis conjunto de todos los resultados obtenidos de los estudios con PEG (diferentes pesos moleculares, en distintas concentraciones en el tampón de separación, a diferentes voltajes y distancias) puso de manifiesto que el polímero de cribado empleado no era el adecuado para la separación de estas proteínas, ya que no conseguía la separación de éstas con buena resolución. Se propuso, entonces, abordar el estudio de otro polímero de cribado, como es el dextrano, y evaluar su capacidad para separar las proteínas lácteas seleccionadas.

4.2.4. Estudio del dextrano como polímero de cribado

El dextrano es un polímero de anhidroglucosa, de origen natural, que presenta multitud de ramificaciones [200]. Es producido por diferentes tipos de microorganismos, en concreto el usado en este trabajo estaba producido por la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. Este polímero se ha usado para separar analitos por tamaño, al crear una estructura de entramado polimérico en el interior de los canales de los microchips debido a la interacción entre sus cadenas. Esta estructura formada no está unida químicamente al canal, de manera que se reemplaza después de cada análisis.

Las características principales por las que se eligió este polímero son su baja viscosidad en disolución y su gran capacidad de separación de mezclas complejas [201]. El poder de separación del dextrano es similar al que presenta la poli(acrilamida) polímero de cribado estático que es muy empleado [185].

El primer parámetro que se estudió para el dextrano fue su concentración el tampón de separación. La composición del tampón de separación fue la misma que anteriormente, pero se sustituyó el PEG por el dextrano. Se optimizó entonces la concentración de este nuevo polímero de cribado con la finalidad de obtener una buena separación de la mezcla de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA. Se empezó con una concentración de dextrano del 5 % (m/v) que era la usada en un trabajo de Dovichi y colaboradores donde empleaban este mismo polímero [202], aunque su c^* era de 1,1 %. El resultado que se obtuvo no mostraba ningún tipo de separación en estas

Resultados y discusión

condiciones de análisis, incluso a la mayor distancia de detección y a menor voltaje de separación, aparecía un solo pico. A continuación, se incrementó la concentración del polímero en el tampón de separación y se estudiaron los porcentajes del 8, 10 y 12 % (m/v) de dextrano. Las condiciones electroforéticas fueron iguales a las anteriores. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 22.

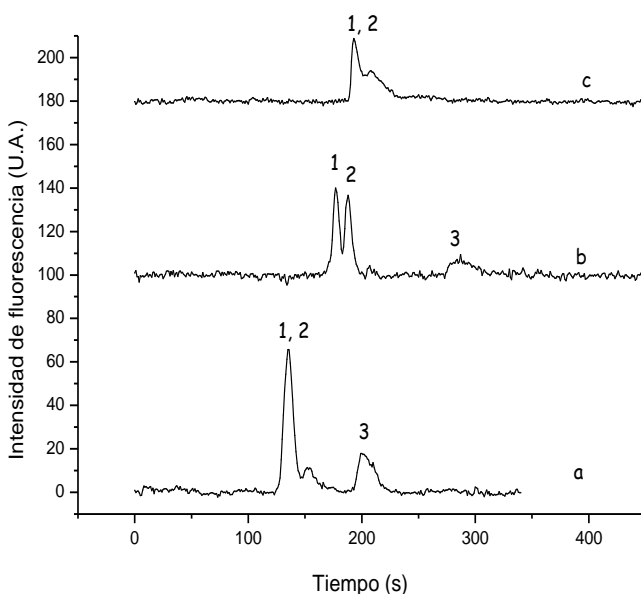


Figura 22. Electroferogramas del estudio de la concentración del polímero de cribado dextrano 500 kDa en el tampón de separación. Concentración dextrano: a) 8 %, b) 10 % y c) 12 %.(m/v) Resto del tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 10 % (v/v) EOTrol a pH 8.5. Inyección tipo *gated*: 2 s. Voltajes aplicados durante la separación: -625 V BR, -500 SR, resto de pocillos conectados a tierra. Longitud del canal de separación: 2.5 cm. Fuente de excitación: lámpara de mercurio. Picos: (1) α -lactoalbúmina 50 μ M, (2) β -lactoglobulina 50 μ M y (3) BSA 10 μ M.

De este estudio se extrajo que la concentración óptima de dextrano en el tampón de separación era el 10 % (m/v). Se observó que a concentración inferior (8 % (m/v)) no se conseguía la separación

entre los picos 1 (α -LA) y 2 (β -LG) y a concentración superior (12 % (m/v)) se producía la disminución de la resolución entre la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina y la pérdida del pico correspondiente a la BSA, posiblemente debido al aumento en la anchura de pico y al retraso observado en los tiempos de migración. Estos resultados concordaban con lo esperado, ya que al aumentar la concentración de dextrano en el tampón de separación por encima de su concentración c^* (*entanglement concentration*) [55], el tamaño de poro de esta red disminuye haciendo que el paso de las proteínas de mayor tamaño a través de la misma se vea dificultado o incluso impedido [182].

Después, se comprobó si al aumentar la distancia de separación mejoraba la resolución de la mezcla. Para ello, se modificó el punto de medición de 2.5 a 3 cm empleando la disolución con 10 % (m/v) de dextrano, concentración que proporcionaba una separación parcial entre los analitos (resultados no mostrados). El efecto de esta variación tuvo su repercusión en la resolución y en los tiempos de análisis. Por un lado, la resolución entre los picos 1 y 2 mejoró de 0.6 a 1 pero, por otro lado, el tiempo de análisis se incrementó con la consecuente disminución de señal de la BSA. Finalmente, se escogió como longitud de separación óptima 3 cm, ya que se lograba una mayor resolución entre las dos primeras proteínas.

Resultados y discusión

A continuación, se optimizó el voltaje de separación. Se estudiaron diferentes voltajes, -625 V, -750 V y -875 V, y se evaluó su influencia en la resolución entre los picos de las dos proteínas que aparecían más solapadas y en la disminución del pico de la BSA (figura 23).

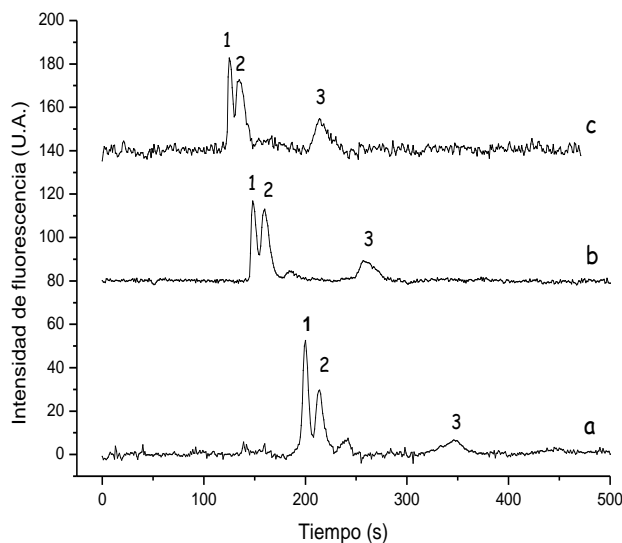


Figura 23. Electroferogramas de la optimización del voltaje de separación. Voltaje aplicado en el pocillo con el tampón de separación: a) -625 V, b) -750 V y c) -875 V. 10 % (m/v) dextrano en el tampón de separación. Longitud del canal de separación: 3 cm. Resto de condiciones electroforéticas como en la figura 22. Picos: (1) α -lactoalbúmina 50 μ M, (2) β -lactoglobulina 50 μ M y (3) BSA 10 μ M.

El resultado fue que al aumentar el voltaje aplicado de -625 V a -875 V, la resolución entre los picos 1 y 2 empeoraba de 1.0 a 0.6, sin embargo, como contrapartida el tiempo de análisis disminuía de 400 s a 250 s. A su vez, en estas condiciones el tamaño del pico de la BSA aumentaba debido a que no se producía tanta difusión. Buscando un equilibrio entre resolución entre picos, tiempo de análisis y la sensibilidad de BSA, se adoptó una solución de compromiso y se eligió

-750 V como voltaje de separación. En estas condiciones, se alcanzó una resolución de 0.9 en menos de 300 s de tiempo de análisis y sin un significativo detrimento de la señal de BSA.

En las condiciones optimizadas, el número de platos teóricos por metro que se obtuvo para la α -lactoalbúmina fue de $1.04 \times 10^5 \text{ m}^{-1}$ y un valor un orden de magnitud inferior para la β -lactoglobulina y la BSA (ver tabla 7). La comparación de las eficacias obtenidas con los datos publicados en la bibliografía no resulta sencilla por varias razones. En primer lugar, no se han realizado muchas separaciones de proteínas por tamaño en microchips de SU-8. En segundo lugar, el modo de inyección que se use es otra variable que controla la eficacia obtenida en las separaciones en microchips. A modo de ejemplo, mejores eficacias obtuvo Agirregabiria y colaboradores en la separación de proteínas por tamaño en microchips de SU-8 [203]. En concreto, en ese trabajo se separaron la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y el inhibidor de la tripsina con una eficacia de $2 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$ para la primera proteína. Sin embargo, este valor de eficacia se obtuvo al utilizar un gel estático de poli(acrilamida), polimerizado en el interior del canal, siendo este método mucho más laborioso y menos reproducible que el desarrollado en este trabajo. Obubuafo y colaboradores [179] obtuvieron eficacias de $4.5 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$ para las separaciones de trombina por tamaño en microchips de PMMA, usando también un gel de poli(acrilamida) lineal. Y el grupo de Okada [182] consiguió valores de eficacias que variaban en el rango de $0.2 \times 10^5 - 2.6 \times 10^5 \text{ m}^{-1}$ para la separación de estándares de proteínas por tamaño utilizando, como en este trabajo, geles de dextrano, pero

Resultados y discusión

en microchips de PMMA recubiertos con hidroxipropil metil celulosa inmovilizada térmicamente en la superficie del canal.

Tabla 7. Eficacia en la separación y repetibilidad inter-día, con 3 microchips diferentes, del método optimizado utilizando dextrano como polímero de cribado.

Proteínas	Eficacia	Repetibilidad (n=3)			
		Tiempo de migración		Área	
	N (m ⁻¹)*	t _m (s) ± SD	RSD (%)	Área (U.A.) ± SD	RSD (%)
α-LA	104686	150 ± 13	8	270 ± 176	65
β-LG	47275	160 ± 16	10	330 ± 101	30
BSA	25792	260 ± 24	9	360 ± 283	79

* Número teórico de platos (N) por unidad de longitud de separación, calculado por la fórmula, $N=5.54(t_m/t_{1/2})^2$, donde t_m, tiempo de migración de cada proteína, t_{1/2}, anchura de pico (expresada en unidades de tiempo) a la semialtura.

Se evaluó, asimismo, la repetibilidad obtenida entre análisis en términos de tiempo de migración en un mismo microchip. Se observó que los valores de RSD se encontraban entre 1 y 4 % (n=3) para las proteínas estudiadas, los cuales están en concordancia con los obtenidos en la separación de dos proteínas estándar en microchips de SU-8 por el grupo de Agirregabiria (RSD 5 %) [203] y con el 8 % obtenido para el análisis de α-lactoalbúmina en microchips de vidrio usando poliacrilamida lineal como medio de separación [204]. Sin embargo, los valores de RSD para los tiempos de migración inter-día en 3 microchips diferentes del método desarrollado obtenidos oscilaron entre el 8 y 10 % para las proteínas estudiadas (ver la tabla 7). Estos valores fueron inferiores a los obtenidos al utilizar el PEG 35 kDa y, además, se obtuvo una mejor resolución en la separación de la

mezcla. Los valores de RSD para las áreas fueron malos y del mismo orden a los obtenidos con PEG 35 kDa. Dichas variaciones pueden ser debidas a la variabilidad de la superficie de los microchips, como ya se ha descrito anteriormente.

Aunque la baja repetibilidad de las áreas de pico no permite llevar a cabo un análisis cuantitativo (se estudiará el origen de esta baja repetibilidad en el apartado 4.3.5.), los valores de RSD para los tiempos de migración fueron aceptables para un análisis cualitativo.

4.2.5. Aplicación de la metodología al análisis de muestras naturales

En último lugar, se evaluó la capacidad del método desarrollado para el análisis de muestras naturales. Este estudio permitió, en última instancia, determinar si los microchips de SU-8 eran apropiados para el análisis de muestras naturales, hecho que hasta donde se ha estudiado en esta Memoria de tesis no se había comprobado.

Las muestras que se estudiaron fueron dos tipos de leche; leche de vaca UHT y leche de vaca cruda. Los sueros de las muestras de leche en los que se determinaron las proteínas, se obtuvieron según el procedimiento descrito en el apartado de Material y métodos (apartado 3.3.6.). A continuación, éstos se analizaron empleando el método optimizado previamente y un ejemplo de los resultados que se consiguieron se recoge en la figura 24.

Resultados y discusión

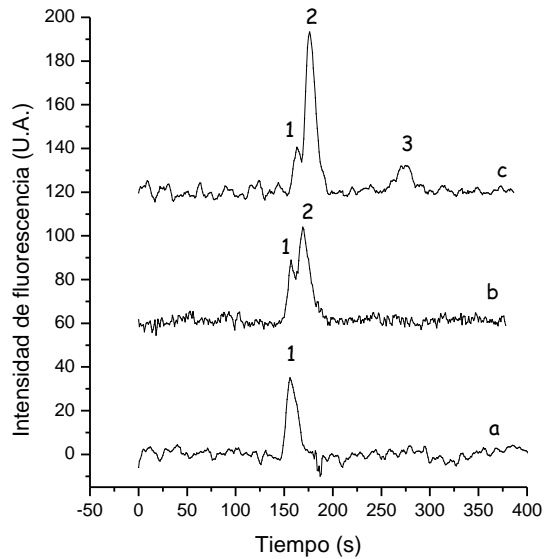


Figura 24. Electroferogramas de muestras naturales. a) suero de leche UHT, b) suero de leche cruda y c) suero de leche UHT adicionado con β -lactoglobulina 50 μ M y BSA 25 μ M. Voltajes aplicados durante la separación: -750 V BR, -625 V SR, resto de picillos conectados a tierra. Resto de condiciones electroforéticas como en la figura 23. Picos: (1) α -lactoalbúmina, (2) β -lactoglobulina y (3) BSA.

En el electroferograma 24a se muestra el resultado de analizar una muestra de suero de leche UHT. En esta muestra se obtuvo un solo pico que se corresponde con la α -lactoalbúmina. Los electroferogramas de esta muestra no presentaron picos para las proteínas β -lactoglobulina, ni BSA. Esto se debe a que estas dos proteínas durante el tratamiento térmico al que se somete la leche para su uperización (UHT), se desnaturalizan, pierden su estructura tridimensional y reaccionan con las κ -caseínas. En esta reacción se forman agregados que precipitan junto con las caseínas cuando se

disminuye el pH a 4.6, reduciéndose entonces, de forma drástica, su concentración en el suero de la leche UHT [157].

El electroferograma 24b corresponde al análisis del suero de la leche cruda, que no ha sido sometida a ningún tipo de tratamiento térmico. En dicho electroferograma aparecen los picos correspondientes a la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina. Esta última proteína, se detectaba en esta muestra ya que no había sido degradada por un tratamiento térmico. Su diferencia de altura respecto a la α -lactoalbúmina coincide cualitativamente con lo descrito en la bibliografía, donde se menciona que la leche es más rica en β -lactoglobulina que en α -lactoalbúmina. Sin embargo, no se observó el pico de la BSA, posiblemente debido a que esta proteína es un componente minoritario del suero lácteo y a que la sensibilidad del método utilizado no permite detectarla [205].

Por último, el electroferograma 24c demostró que la metodología desarrollada tenía la capacidad adecuada para separar las tres proteínas en una matriz compleja si tuviera la sensibilidad suficiente. Este estudio se realizó mediante la adición de una cantidad de patrón de β -lactoglobulina y BSA a una muestra de suero de leche UHT, hasta alcanzar una concentración de 50 μ M y 25 μ M, respectivamente. En estas condiciones, se obtuvieron los picos correspondientes a las tres proteínas dentro de una muestra natural.

En último lugar, se analizó la repetibilidad inter-día del método para el análisis de muestras naturales de leche UHT. El valor de RSD que se obtuvo en el tiempo de migración de la α -lactoalbúmina fue del 14 % valor superior al obtenido para el análisis de los patrones de

Resultados y discusión

estas proteínas. Este resultado era previsible ya que al tratarse de una muestra natural, con una matriz más compleja que la de los patrones preparados en agua, algún componente de la misma puede alterar el EOF.

Los resultados obtenidos con el método desarrollado se compararon con los obtenidos en el artículo de Anema y colaboradores [206], con el equipo comercial *Bioanalyzer* Agilent 2100. Esta instrumentación permitió realizar análisis de muestras de leche con una mayor eficacia en la separación y en menos tiempo (40 s frente a 300 s) que nuestro método. Sin embargo, el método desarrollado en esta Memoria de tesis presenta como ventaja que ha utilizado microchips poliméricos, de precio más asequible que los de vidrio empleados en el equipo comercial y, por tanto, con un coste de análisis inferior.

4.3. MODIFICACIONES DE LA METODOLOGÍA E INSTRUMENTACIÓN PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD DE DETECCIÓN

Los microchips de electroforesis capilar poseen un problema de falta de sensibilidad de detección, especialmente cuando se utilizan detectores basados en espectroscopía UV-Vis. Las causas de esta limitación son por un lado, que el camino óptico que atraviesa la luz es muy corto (25 – 50 μm), y por el otro, que la cantidad de muestra que se introduce en los microchips para el análisis es muy pequeña (del orden de pL) [207]. Estas razones justifican que el detector espectroscópico más empleado para los análisis por electroforesis en microchips sea el de fluorescencia. La baja sensibilidad ha propiciado una gran investigación en esta área, aplicándose mejoras en los sistemas de detección, preferentemente utilizando sistemas de fluorescencia inducida por láser, o también introduciendo etapas de preconcentración de la muestra que permitan aumentar la sensibilidad [208, 209].

El método que se ha desarrollado hasta este punto en la presente Memoria tenía poca sensibilidad. En efecto, los límites de detección teóricos a los que se llegaba eran para la α -lactoalbúmina 7.5 μM , para la β -lactoglobulina 9.7 μM y para la BSA 6 μM . Este problema, igualmente se ponía de manifiesto al analizar la muestra de leche cruda, la cual posee una baja concentración de BSA y que, quizás por la falta de sensibilidad, no se conseguía detectar. Como fuente de excitación de fluorescencia, se utilizó una lámpara de vapor de

Resultados y discusión

mercurio, que venía de serie en el microscopio de epifluorescencia empleado para realizar los ensayos.

Este apartado, describe la mejora de la sensibilidad obtenida en nuestro método a través de dos etapas. En la primera, se caracterizó espectroscópicamente el material SU-8 para localizar la longitud de onda más adecuada para trabajar en fluorescencia y se eligió un nuevo agente de derivatización fluorescente para las proteínas que fuera compatible con las características espectroscópicas del SU-8. En la segunda, se realizó una modificación del sistema de detección mediante el uso de un láser como fuente de excitación para la fluorescencia.

4.3.1. Análisis espectroscópico del SU-8

Los resultados presentados en esta Memoria hasta el momento, ponen de manifiesto que el material del microchip, SU-8, emite fluorescencia cuando se excita en la región azul del espectro visible. Este hecho origina una señal de fondo, la cual puede ser responsable de la falta de sensibilidad del método. Lo anterior, concuerda con lo observado por Sikanen y colaboradores [198], que midieron la emisión de fluoresceína excitándola con radiación de 450 - 490 nm y se obtuvo una relación señal/ruido 4 veces menor para la fluoresceína medida en microchips de SU-8, que en microchips de vidrio.

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad del método, se estudió la longitud de onda de la radiación de excitación que se debería usar para que la fluorescencia de fondo del SU-8 fuera menor. Para ello, primero se determinó el espectro de absorción en el visible del SU-8 (Material y métodos, apartado 3.3.7.). El resultado que se obtuvo fue que el SU-8 absorbe mayoritariamente en la región del ultravioleta, no habiendo apenas absorción en la zona visible del espectro (figura 25 1).

Para cuantificar la disminución de la fluorescencia de fondo del SU-8 que se obtendría si se usara una radiación de excitación de mayor longitud de onda, se midieron los espectros de emisión de fluorescencia para las longitudes de onda de excitación de 480 nm (con el cubo de filtros MB-1, utilizado en todos los experimentos anteriores) y 535 nm (cubo de filtros MG-1) (figura 25).

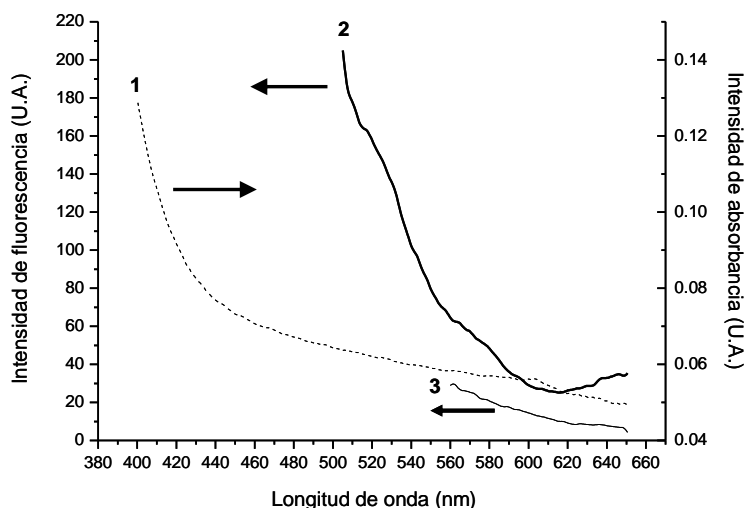


Figura 25. Caracterización espectroscópica de los microchips de SU-8 en las longitudes de onda de trabajo. 1) Espectro de absorción. 2) Espectro de emisión, longitud de onda de excitación 480 nm. 3) Espectro de emisión, longitud de onda de excitación 532 nm. Para el resto de las condiciones experimentales, ver apartado 3.3.7. de Material y métodos.

Resultados y discusión

Los resultados indicaron que la absorción del SU-8 disminuía débilmente al aumentar la longitud de onda de excitación (67 mUA a 480 nm y 60 mUA a 532 nm). Por el contrario, se observó un cambio significativo al comparar los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos al excitar con radiación de 480 nm y 532 nm. En el primer caso, donde se usó como radiación de excitación 480 nm (la misma longitud de onda que se obtenía mediante el cubo de filtros azul MB-1 del microscopio usado en los análisis anteriores), el valor de fluorescencia obtenida a 535 nm fue de 135 UA, por el contrario, cuando se excitó a 532 nm (longitud de onda que se obtendría mediante el cubo de filtros verde MG-1 disponible) se determinó que la fluorescencia a 600 nm era sólo de 17 UA. Esto demostró, que el cambio de la longitud de onda de excitación se traduce en una disminución de la señal de fluorescencia de fondo en 8 veces, con la consecuente repercusión que esto supone en la mejoría de los límites de detección.

4.3.2. Influencia del cambio de sonda fluorescente en el límite de detección

Teniendo en cuenta el estudio espectroscópico llevado a cabo sobre los microchips de SU-8, se procedió a cambiar la longitud de onda de excitación del azul (480 nm) al verde (535 nm) usando el cubo de filtros MG-1 del microscopio. De esta manera, se esperaba un descenso de la señal de fondo y, potencialmente, un aumento de la relación señal/ruido.

En primer lugar, es necesario hacer notar que el cambio en la longitud de onda de la radiación de excitación conlleva el utilizar un nuevo agente de derivatización fluorescente. La finalidad de este cambio es originar una elevada fluorescencia de las proteínas al excitarlas con una longitud de onda entorno a los 530 nm, puesto que el FQ apenas genera fluorescencia a estas longitudes de onda ($\lambda_{\text{excitación}}$ FQ = 480 nm).

Se eligió como agente derivatizante un fluoróforo comercial Chromeo P540TM, un derivado del pirilio comercializado por *Active Motif*, que presenta su máximo de excitación a 533 nm y el de emisión a 627 nm. Con este tipo de agentes derivatizantes, había experiencia previa en el grupo de investigación y con otros compuestos de la misma familia se habían obtenido buenos resultados [174].

Con el objetivo de evaluar la mejora en el límite de detección, se realizó el análisis de las proteínas de suero lácteo (α -lactoalbúmina 50 μ M, β -lactoglobulina 50 μ M y BSA 10 μ M) usando el método desarrollado, pero esta vez se derivatizaron con el Chromeo P540TM (cuyo protocolo de derivatización está descrito en el apartado 3.3.5. de Material y métodos). Se utilizó como fuente de excitación la lámpara de vapor de mercurio, igual que antes, pero con el cubo de filtros verde MG-1. Estos resultados se compararon con los obtenidos para las proteínas derivatizadas con FQ (ver figura 26).

Resultados y discusión

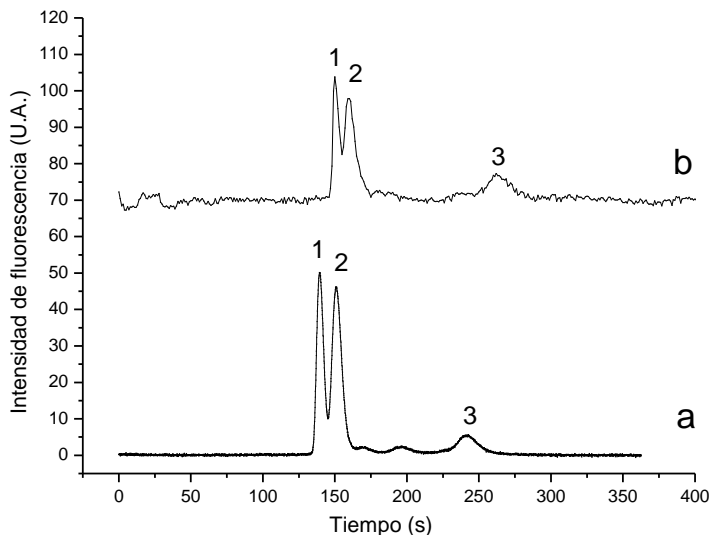


Figura 26. Electroferogramas de los patrones de proteínas lácteas derivatizados con diferentes agentes de derivatización: (a) Chromeo P540, cubo de filtros MG-1. (b) FQ, cubo de filtros MB-1. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 10 % (m/v) dextrano y 10 % (v/v) EOTrol, pH 8.5. Inyección tipo *gated*: 2 s. Voltajes aplicados durante la separación: -750 V BR, -625 V SR y resto de pocillos conectados a tierra. Longitud del canal de separación: 3 cm. Fuente de excitación: lámpara de mercurio. Picos: (1) α -lactoalbúmina 50 μ M, (2) β -lactoglobulina 50 μ M y (3) BSA 10 μ M.

Los valores de límite de detección obtenidos con Chromeo P540TM fueron 2.4 μ M para la α -lactoalbúmina, 3 μ M para la β -lactoglobulina y 8 μ M para la BSA. Estos resultados pusieron de manifiesto que apenas se mejoraban los LODs respecto al FQ (límite de detección con FQ y cubo de filtros azul MB-1 para la α -lactoalbúmina 7.5 μ M, para la β -lactoglobulina 9.7 μ M y para la BSA 6 μ M). A pesar del descenso de la señal de fondo no se había conseguido mejorar la sensibilidad del método, sin embargo, también hay que tener en cuenta el cambio de la sonda fluorescente. Este cambio podía haber afectado de forma negativa a la sensibilidad, contrarrestando el efecto de la disminución del ruido de fondo (que

disminuye claramente al utilizar Chromeo P540TM, tal como se observa en la figura 26), debido a factores tales como el menor número de sondas fluorescentes en cada proteína y/o el menor rendimiento cuántico del fluoróforo. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Dovichi y colaboradores [210]. Dichos autores observaron que a temperatura ambiente, la reacción de la α -lactoalbúmina con los reactivos Chromeo P465 y P503, similares al usado en esta Memoria, era un orden de magnitud más rápida que con el FQ, sin embargo, la eficacia de la reacción era 2 veces más alta para el FQ que para el Chromeo. La explicación sugerida a esta diferencia es que no todos los puntos de reacción se encuentran igualmente accesibles para el Chromeo, en estas condiciones.

4.3.3. Evaluación del efecto del láser sobre el SU-8

Como medidas para mejorar el límite de detección del método, se propusieron anteriormente dos: excitar la fluorescencia con luz en la región verde del espectro y el empleo de una fuente de excitación con mayor irradiancia que la lámpara de mercurio. En este sentido, es conocido que los láseres pueden alcanzar valores mayores de irradiancia, que las lámpara de mercurio, y en especial cuando la ventana de detección tiene tan sólo unas cuantas micras cuadradas [211]. En relación a los resultados anteriores, donde se observó que el cambio de longitud de onda de excitación no producía una mejora sustancial en el límite de detección, se resolvió abordar la segunda propuesta. Se decidió acoplar un láser con emisión en el verde (532

Resultados y discusión

nm) de 20 mW de potencia. La manera de acoplar el láser al microscopio se encuentra descrita en el apartado de Material y métodos 3.2.6.

El acoplamiento del láser al microscopio permitió obtener a la salida del objetivo una radiación de 12 mW de potencia. Esta radiación era demasiado intensa, y provocaba una deriva y oscilaciones de la línea de base en los electroferogramas obtenidos (ver ejemplo en figura 27c).

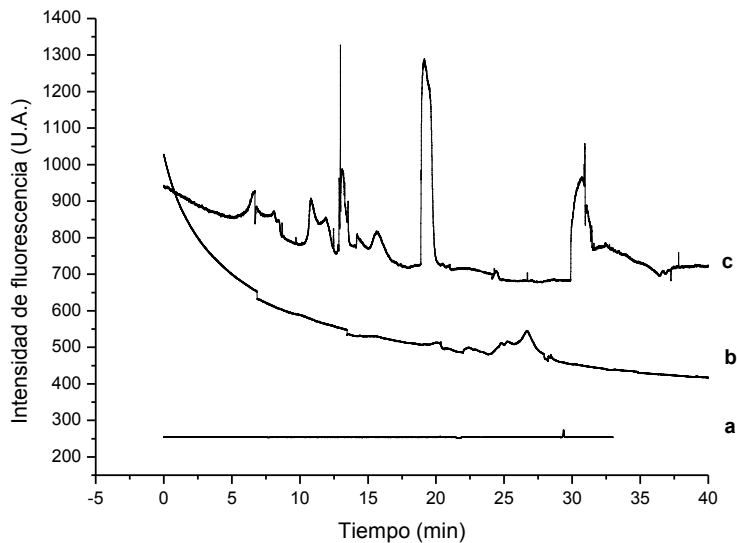


Figura 27. Registro de la línea de base del microchip de SU-8 y vidrio llenos de tampón de separación, voltaje aplicado 187 V/cm (a) microchip de vidrio irradiado con un haz de 12 mW de potencia. (b) microchip de SU-8 irradiado con un haz de 1.5 mW y (c) microchip de SU-8 irradiado con un haz de 12 mW.

Para disminuir la intensidad de la radiación que le llegaba al microchip se utilizaron filtros de densidad neutra con diferente densidad óptica (OD). La inserción de estos filtros en el camino óptico

del láser hizo que fuera necesaria la modificación de la instrumentación, tal y como se describe en el apartado de Material y métodos 3.2.6.

Se estudió el efecto de la potencia del láser obtenida a la salida del objetivo del microscopio para distintos filtros de densidad neutra (OD 0.1, 0.5 y 1) sobre la emisión del microchips a lo largo del tiempo. Para ello se irradió cada vez un punto distinto del canal del microchip lleno de tampón de separación con radiaciones de diferente potencia. Durante estos experimentos no se aplicó voltaje en los extremos del canal. La potencia del haz en el objetivo para cada filtro fue de 9.8 mW para el filtro de densidad óptica 0.1, 6.1 mW para el de 0.5 y, por último, 1.5 mW para el filtro de densidad óptica 1. La variación de la señal de emisión del microchip con el tiempo se muestra en la figura 28.

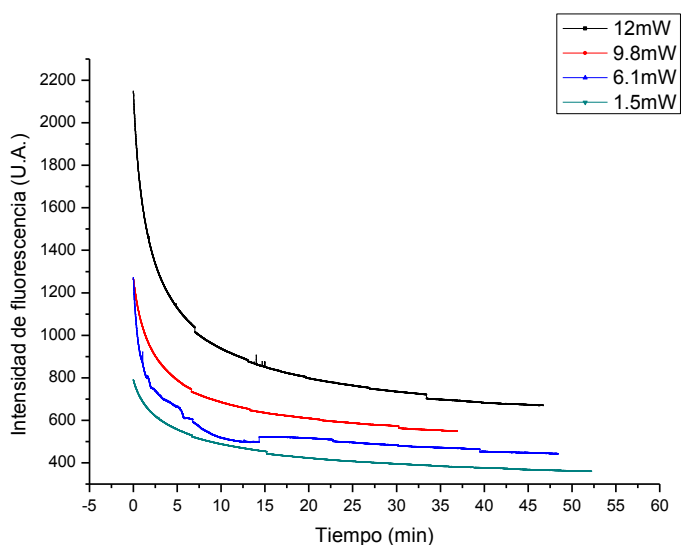


Figura 28. Emisión del canal microchip de SU-8, lleno de tampón de separación irradiado a diferentes potencias del láser. En este experimento no se ha aplicado voltaje en los extremos del canal.

Resultados y discusión

En todos los registros se observó que al empezar a irradiar un punto del microchip se producía una caída drástica de la fluorescencia que emitía el material y después con el paso del tiempo la pendiente de esa caída se suavizaba. Como era de esperar, al disminuir la potencia del haz, el material emitía una menor fluorescencia.

Para esclarecer si el origen de la fluorescencia de fondo era el material del que estaba hecho el microchip o el tampón de separación (5 mM bórax, 0,1 % (m/v) SDS, 10 % (m/v) dextrano, 10 % (v/v) EOTrol LN® pH 8.5) que llenaba los canales, se compararon los resultados previos (potencia de irradiación 12 mW) con los obtenidos en las mismas condiciones para un microchip de vidrio. El registro de fluorescencia emitida por el microchip de vidrio con los canales llenos de tampón, dio como resultado una línea de base sin deriva y con menor intensidad de fluorescencia (250 U.A.) que la del SU-8 (800 U.A.). Este estudio permitió determinar que es el material del microchip de SU-8 el que emite fluorescencia y no el tampón de separación que rellena los canales.

A continuación, se estudió si este comportamiento de los microchips de SU-8 experimentaba algún cambio al aplicar voltaje. Para ello se utilizó un voltaje de 187 V/cm, mientras se irradiaron los microchips de vidrio y SU-8, con una potencia del haz del láser de 12 mW. El resultado se muestra en la figura 27. Mientras que con el microchip de vidrio se obtuvo una línea de base sin deriva (figura 27a), para el microchip de SU-8, por el contrario, se obtenía una línea de base inestable con una gran deriva (figura 27c). Cuando se disminuyó la potencia del láser a 1,5 mW (filtro de OD1) se observó una suave

deriva de la línea de base, siendo estable en su mayor parte, sólo con unas pequeñas perturbaciones que aparecían después de irradiar el mismo punto del canal durante mucho tiempo (25 min) (figura 27b).

Es posible que con la irradiación continuada en un punto determinado del microchip vayan agotándose los compuestos que emitan fluorescencia (*photobleaching*). En este sentido, resulta interesante resaltar que en el proceso de fabricación de los microchips de SU-8, además de la resina de SU-8 se utiliza un fotocatalizador (hexafluoroantimoniato de triarilsulfonio), cuya presencia queda siempre en exceso tras la polimerización con UV de la resina y el templado del microchip [212]. Según los datos de la bibliografía [197], tanto la resina de SU-8 como el catalizador son los responsables de la fluorescencia de que emiten los chips de SU-8, debido a la compleja estructura de anillos que poseen ambos, y aunque la fluorescencia producida a λ_{exc} 520 nm es menor que a 488 nm, todavía es apreciable sobre todo cuando la irradiancia sobre el microchip es alta (uso del láser). Por otra parte, puesto que tanto el triarilsulfonio (el resto orgánico del catalizador), como la resina SU-8 son fotodegradables, cuando se irradia una región muy pequeña del microchip de SU-8 (un punto de 1-2 mm de diámetro) con una potencia de 1,5 - 12 mW (es decir, 0,3 - 3 kW/m²) semejante energía puede producir la fotodegradación del material del microchip de SU-8 que se va consumiendo en el punto del chip irradiado a medida que aumenta el tiempo de exposición. Dicho efecto de disminución de la fluorescencia conforme aumenta el tiempo de irradiación y la longitud de onda de excitación han sido observados por Greiner y del Campo [213] y se

Resultados y discusión

hace especialmente patente al utilizar fuentes de mayor irradiancia ya que no se observó ni en los experimentos previos en este trabajo, ni aparece descrito en el artículo de Sikanen y colaboradores [198] donde también se utilizó una fuente de excitación UV.

A raíz de los resultados previos se escogió 1.5 mW como potencia del haz del láser, que a su vez era la que producía menos fluorescencia de fondo.

Como corolario se desprende que a pesar de la fluorescencia de fondo se han hallado unas condiciones que permiten obtener una línea de base estable apta para realizar separaciones electroforéticas.

4.3.4. Medida de la sensibilidad de detección utilizando el láser como fuente de excitación.

La mejora de la sensibilidad de detección del método desarrollado al utilizar láser como fuente luminosa fue el siguiente punto estudiado. La relación directa entre la potencia de la fuente de excitación, con una mejora en la sensibilidad es un hecho que aparece ampliamente descrito en la bibliografía [80, 81].

En este trabajo, su evaluación se realizó mediante un estudio comparativo de los patrones de las proteínas lácteas derivatizadas con Chromeo P540TM, en las condiciones experimentales optimizadas empleando las diferentes fuentes de excitación (lámpara de mercurio y láser). Las concentraciones de proteínas que se utilizaron en los ensayos con láser fueron inferiores a las empleadas cuando se utilizó

la lámpara de mercurio. Esto fue debido a que la cámara se saturaba cuando se utilizaban las elevadas concentraciones de proteínas anteriores, con el láser como fuente de luz. Las concentraciones fueron $1\ \mu\text{M}$ para α -lactoalbúmina, $1\ \mu\text{M}$ para β -lactoglobulina y $2.5\ \mu\text{M}$ para BSA en los experimentos con el láser.

La sustitución de la lámpara de mercurio por el láser produjo una mejora en la sensibilidad del método como puede verse en la figura 29.

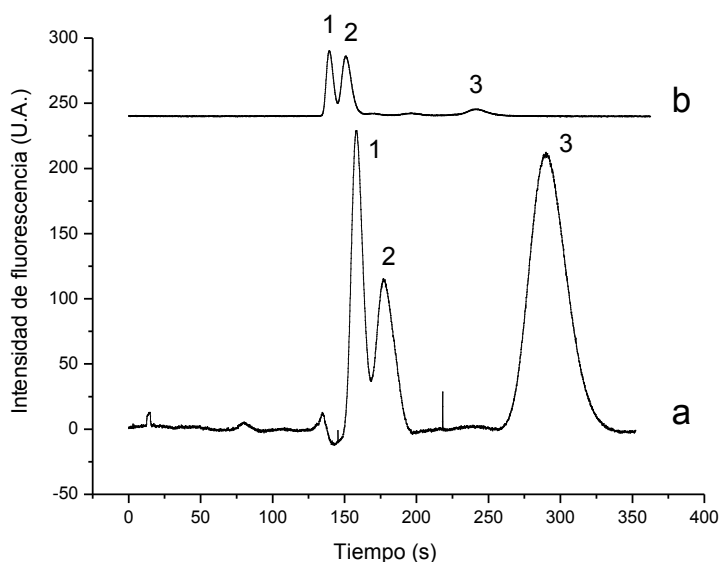


Figura 29. Electroferogramas de los patrones de proteínas lácteas en diferentes condiciones: (a) Proteínas derivatizadas con Chromeo P540, fuente de excitación: láser, potencia del haz $1.5\ \text{mW}$ y concentración de las proteínas: (1) α -lactoalbúmina $1\ \mu\text{M}$, (2) β -lactoglobulina $1\ \mu\text{M}$ y (3) BSA $2.5\ \mu\text{M}$. (b) Proteínas derivatizadas con Chromeo P540, fuente de excitación: lámpara de mercurio y concentración de las proteínas: (1) α -lactoalbúmina $50\ \mu\text{M}$, (2) β -lactoglobulina $50\ \mu\text{M}$ y (3) BSA $10\ \mu\text{M}$. Tampón de separación: $5\ \text{mM}$ bórax, $0.1\ \%$ (m/v) SDS, $10\ \%$ (m/v) dextrano y $10\ \%$ (v/v) EOTrol, pH 8.5. Resto de condiciones electroforéticas como en la figura 26.

Utilizando el láser como fuente de excitación, los límites de detección (relación señal/ruido = 3) calculados que se alcanzaron

Resultados y discusión

fueron para la α -lactoalbúmina 17 nM, para la β -lactoglobulina 30 nM y para la BSA 70 nM. Estos valores son dos órdenes de magnitud inferiores a los obtenidos con la lámpara de mercurio, con lo cual se demostró una mejora significativa en la sensibilidad (límite de detección con FQ y cubo de filtros azul MB-1 para la α -lactoalbúmina 7.5 μ M, para la β -lactoglobulina 9.7 μ M y para la BSA 6 μ M).

También se estudió la repetibilidad del método por si el cambio de sonda fluorescente pudiera afectar negativamente a dicho parámetro. La repetibilidad inter-chip del nuevo método (derivatización de proteínas con el nuevo agente fluoróforo y detección utilizando láser), está recogida en la tabla 8.

Tabla 8. Repetibilidad para el análisis de los patrones de proteínas derivatizados con Chromeo P540TM utilizando el láser como fuente de excitación.

Proteínas	Repetibilidad (n=3)			
	Tiempo de migración		Área	
	t_m (s) \pm SD	RSD (%)	Área (U.A.) \pm SD	RSD (%)
α -LA	160 \pm 19	12	1400 \pm 1034	75
β -LG	170 \pm 23	14	1500 \pm 529	35
BSA	270 \pm 48	18	3400 \pm 2746	79

Aunque los valores de RSD para los tiempos de migración fueron aceptables, los de área fueron elevados, alcanzándose valores de hasta el 79 %, como ya ocurriera en el método que usa la lámpara de mercurio como fuente de excitación (apartado 4.2.4). Valores similares de repetibilidad para las áreas también se mantuvieron en el caso de los análisis intrachip, mientras que lo que se observó como era

de esperar, que los valores de RSD para los tiempos de migración mejoraron siendo 11 % para α -lactoalbúmina, 8 % para la β -lactoglobulina y 10 % para la BSA.

Entre las posibles razones de esta falta de repetibilidad en las áreas, se encuentran la falta de reproducibilidad del EOF entre microchips (debido a la baja repetibilidad de las cargas en la superficie), la falta de repetibilidad en el lavado del microchip y también la etapa de *stacking*, la cual requiere la manipulación de las conexiones de líquido del microchip cuando la muestra está dentro y ya se ha formado la puerta por succión, con el consiguiente movimiento de los fluidos. En este sentido, se decidió investigar el proceso de *stacking* en nuestro método de análisis con un mayor detalle.

4.3.5. Influencia del stacking en la repetibilidad.

Como se indicó anteriormente, la etapa de *stacking* es la que conlleva mayor manipulación por parte del analista y potencialmente puede ser la que cause mayor irreproducibilidad de los resultados obtenidos (Material y métodos, apartado 3.3.1.). En nuestro caso, esta etapa requiere desconectar manualmente la conexión que está en el pocillo de desecho de muestra y desde la que se hace succión, para que de esta forma se produzca un cambio de viscosidad en la cruz de inyección, entre el canal de muestra que no posee polímero de cribado y el canal de separación lleno de polímero.

Resultados y discusión

Para comprobar cómo afecta esta etapa a la repetibilidad del método, se realizaron una serie de experimentos en las mismas condiciones anteriores, salvo que se eliminó la última etapa de succión que sirve para realizar el *stacking* (*stacking* descrito en Material y métodos, apartado 3.3.1.). Se utilizaron también los patrones de las proteínas lácteas, en las mismas concentraciones anteriores (α -lactoalbúmina 1 μM , β -lactoglobulina 1 μM y BSA 2.5 μM). La consecuencia de esta modificación del protocolo de acondicionamiento fue que no se obtuvo una señal de fluorescencia significativa para las proteínas. En estas circunstancias, los picos apenas se distinguían del ruido de fondo, de manera que hacía imposible su detección y su medida.

Como alternativa, se aumentó la concentración de todas las proteínas a 5 μM . En estas condiciones, se consiguió una señal detectable para las proteínas. Se comprobó que al no realizar el *stacking*, se mejoraban significativamente los datos de repetibilidades en las áreas, obteniéndose unos valores de RSD del 14 % para la α -lactoalbúmina, 12 % para la β -lactoglobulina y 32 % para la BSA, mientras que antes esos valores eran 35 - 79 % cuando había *stacking*. La irreproducibilidad introducida por la etapa de *stacking* se explicó debido a que después de la succión por el pocillo de desecho de muestra, se desconectó la conexión que realizaba el vacío creándose una sobrepresión en los canales y una mezcla de la disolución que contiene polímero con la que no lo contiene, como se puede comprobar en la secuencia de imágenes de la figura 30.



Figura 30. Secuencia de imágenes que recogen la destrucción del *stacking* formado por succión al desconectar el tornillo por el que se realiza la succión. 1) Formación de la puerta mediante la succión que se lleva a cabo por el pocillo de desecho de muestra. 2) Interrupción de la succión y comienzo de la difusión de muestra. 3) Progreso de la difusión de muestra hacia el resto de canales. 4) Rellenado del pocillo de desecho de muestra con tampón de separación. 5) Formación de la puerta por voltaje.

El resultado fue la modificación de la distancia a la que se encuentra el frente de la muestra disuelta en tampón de separación con el polímero de cribado donde se produce el *stacking*, haciendo que la cantidad de muestra que se inyecte sea poco reproducible.

A continuación, se calculó del límite de detección sin *stacking*. Los valores fueron, para la α -lactoalbúmina 40 nM, para la β -lactoglobulina 59 nM y para la BSA 65 nM. Los valores obtenidos para las dos primeras proteínas, son dos veces peores a los obtenidos al realizar la etapa de *stacking*. Este hecho demuestra las ventajas del *stacking* sobre la sensibilidad del método. La preconcentración obtenida con el *stacking* por viscosidad se ilustra en la figura 31.

Resultados y discusión

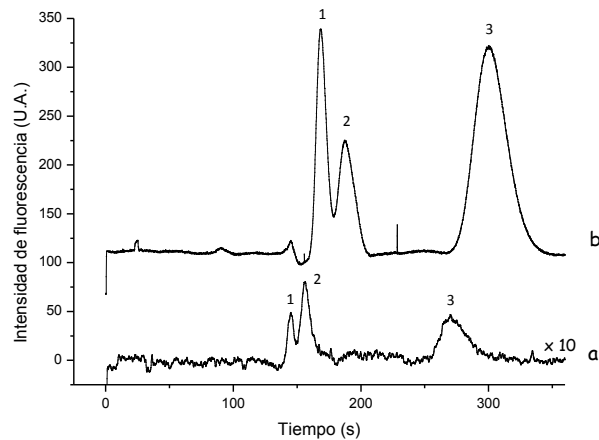


Figura 31. Electroferogramas de los patrones de proteínas lácteas con y sin *stacking*. (a) Sin *stacking*, concentración de proteínas derivatizadas con Chromeo P540: (1) α -lactoalbúmina 5 μM , (2) β -lactoglobulina 5 μM y (3) BSA 5 μM ($\times 10$ significa que la señal de fluorescencia está multiplicada por un factor de 10). (b) Con *stacking*, concentración de proteínas derivatizadas con Chromeo P540: (1) α -lactoalbúmina 1 μM , (2) β -lactoglobulina 1 μM y (3) BSA 2.5 μM . Resto de condiciones electroforéticas como en la figura 29.

A tenor de los resultados anteriores, se decidió seguir incluyendo la etapa adicional del *stacking*. Las razones son que, primero, se mejoraba el límite de detección teórico (calculado por extrapolación para una señal/ruido = 3) y, lo que es más importante, el límite de detección experimental, ya que sin esta etapa no se conseguía inyectar concentraciones de muestra tan bajas; y, segundo, se permitió conseguir una resolución de 0.84 entre α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, mientras que sin *stacking* la resolución se redujo a 0.79. Dado que el objetivo de esta parte del trabajo era obtener un método lo más sensible posible para aumentar el éxito en la detección de las proteínas lácteas en muestra naturales, se decidió continuar con el protocolo de *stacking*.

4.3.6. Aplicación del método de análisis con detección por fluorescencia inducida por láser al análisis de las muestras naturales

Teniendo en cuenta la mejora en sensibilidad que supone el uso del láser como fuente de excitación para el análisis de proteínas lácteas en microchips de SU-8, se volvieron a analizar los sueros de las muestras de leche UHT y cruda estudiados anteriormente usando la lámpara de mercurio.

Los análisis se realizaron siguiendo la metodología desarrollada para las proteínas patrón derivatizadas con Chromeo P540TM, utilizando también este mismo fluoróforo. El método de purificación y tratamiento de las muestras de leche fue descrito en la parte de Material y métodos (apartado 3.3.6.).

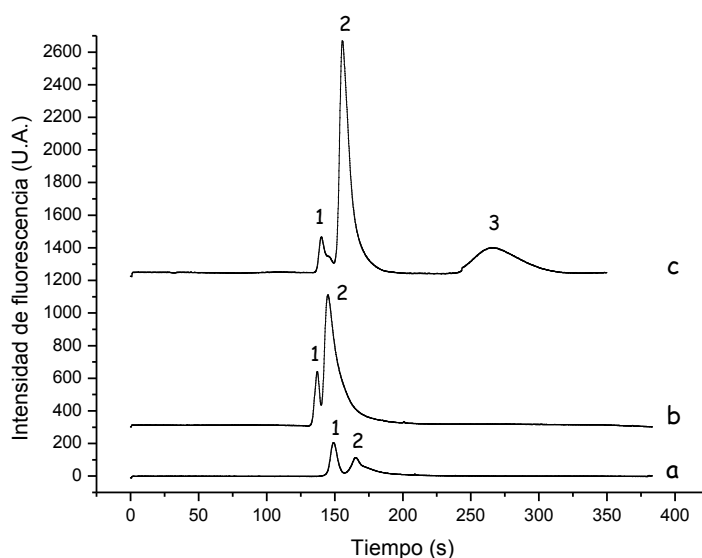


Figura 32. Electroferogramas de las muestras naturales de suero lácteo. a) Suero de leche UHT. (b) Suero de leche cruda. (c) Suero de leche UHT adicionada con β -lactoglobulina 5 μ M y BSA 2.5 μ M. Resto de condiciones electroforéticas como en la figura 30.

Resultados y discusión

El electroferograma de la muestra de suero de leche UHT (figura 32a) presenta además del pico de la α -lactoalbúmina, el pico correspondiente a la β -lactoglobulina. Esta última proteína está en baja concentración en la muestra, ya que, como se comentó anteriormente (apartado 4.2.5), durante la precipitación de las caseínas se pierde parte de la misma junto con la BSA. De manera que al mejorar el límite de detección con el láser como fuente de luz de excitación, se consiguió detectar la presencia de β -lactoglobulina en esta muestra natural.

Al analizar el suero de la leche cruda, se esperaba detectar la presencia de BSA. El electroferograma correspondiente a esta muestra (figura 32b) muestra los picos correspondientes a la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, al igual que sucedía cuando se usó la lámpara de mercurio. Sin embargo, no se detectó ningún pico correspondiente a la BSA a pesar de haber mejorado el límite de detección. Una posible explicación a este hecho es que, como ya se comentó en el apartado 4.2.5, esta proteína es un componente minoritario de la leche [214], estando su concentración en el orden de 0,2-1,5 μ M. Aunque esta concentración se halla por encima del LOD del método, una baja concentración de BSA hace que la reacción de derivatización con el Chromeo P540TM se encuentre bastante limitada cinéticamente y, por tanto, se dificulte su derivatización con reactivos fluorescente [82]. Este hecho ha sido descrito por Wolfbeis y colaboradores [215], quienes analizaban la fluorescencia obtenida al derivatizar con otro fluoróforo derivado de pirilio (Py-1), semejante al utilizado en esta Tesis, diferentes concentraciones de BSA, mostrando que cuando su

concentración se encuentra entre 0.1 y 1.5 μM la fluorescencia obtenida a 610 nm era del orden de 10000 U.A., mientras que si la concentración era de 5 μM la fluorescencia era 4 veces mayor. Por lo tanto, la unión del hecho de la baja concentración de esta proteína en la leche, junto con la fluorescencia de fondo del microchip, explicaría que no fuera posible su detección. Este hecho también fue descrito por Anema [206] en el trabajo que analizaba muestras de leche usando el *Bioanalyzer* 2100 y en el que describía que no era posible cuantificar las proteínas minoritarias del suero lácteo (BSA, lactoferrina e inmunoglobulina G) debido a que la baja intensidad de estas bandas hacía que no fuera posible distinguirlas del ruido de fondo.

Por último, se analizó el suero de leche UHT adicionado con β -lactoglobulina y BSA (figura 32c). Se comprobó que, al igual que al utilizar la lámpara de mercurio como fuente de excitación, el método permite separar las tres proteínas lácteas en una muestra natural.

Estos estudios permiten determinar de forma clara que se ha conseguido una mejora significativa en el límite de detección del método desarrollado de dos órdenes de magnitud respecto al obtenido con la lámpara de mercurio, mediante la implementación de un láser como fuente de excitación. En estas condiciones y a diferencia de lo obtenido con la lámpara de mercurio, se ha conseguido determinar la presencia de β -lactoglobulina en la muestra de leche UHT, aunque no así la de BSA en la leche cruda, al igual que sucedía en las condiciones anteriores de excitación, probablemente debido a dos factores: su baja concentración en la muestra natural que dificulta la

Resultados y discusión

reacción de derivatización y el ruido producido por la fluorescencia de fondo del SU-8.

4.4. APLICACIÓN DE LOS MICROCHIPS DE SU-8 AL ANÁLISIS DE FORMAS GLICOSILADAS Y DESGLICOSILADAS DE PROTEÍNAS

Partiendo de la necesidad de desarrollar métodos de análisis para el control de biofármacos que sean eficaces y rápidos, en este apartado se pretende explorar el potencial que tendrían los microchips de SU-8 en este tipo de examen. Más concretamente, se establecerá una metodología que permita distinguir la forma glicosilada de la no glicosilada de la α -1-glicoproteína ácida (AGP) como proteína modelo, ya que algunos biofármacos, en concreto los anticuerpos monoclonales, poseen cadenas de glicanos unidas a su cadena polipeptídica.

La α -1-glicoproteína ácida (AGP), tiene varias cadenas de glicanos unidas a su cadena polipeptídica por enlaces N-glicosídicos. Debido a esta analogía entre la AGP y los biofármacos basados en anticuerpos monoclonales, sumada a la dificultad para adquirir muestras de este tipo de biofármacos, se escogió la glicoproteína AGP como proteína modelo.

El modo de separación elegido fue la electroforesis capilar en gel, método descrito en la bibliografía para la separación de estas dos fracciones [164] y en el cual existe experiencia previa, mediante el empleo de polímeros de cribado. En este modo de separación, como ya se ha descrito, se busca que todas las proteínas presenten igual relación carga/masa y, por tanto, igual movilidad electroforética para que el único criterio de separación sea su tamaño. Sin embargo, esta

Resultados y discusión

igualdad de relación carga/masa se altera cuando la proteína tiene unidos glicanos, ya que éstos no adsorben SDS haciendo que dicha relación sea menor y que, por tanto, se sobreestime su peso molecular [164]. Este efecto es el que permite separar la fracción de proteína que contiene glicanos de la que no los contiene.

4.4.1. Estudio de la desglicosilación de la proteína AGP

La α -1-glicoproteína ácida (AGP) posee el 45 % de su masa en forma de glicanos unidos a su estructura proteica [216]. La obtención de su fracción desglicosilada se realizó siguiendo el método previamente descrito en la bibliografía [177, 217]. Dicho procedimiento explicado brevemente consistió en: primero desnaturalizar la proteína mediante una disolución desnaturalizante que contiene octyl β -D glucopiranosido y mercaptoetanol junto con un tratamiento térmico, como se describió en el apartado de Material y métodos 3.3.8. A continuación, a esta disolución se le adicionó la enzima PNGasa F, para romper el enlace N-glicosídico existente entre los OH en posición 1 β del carbohidrato N-acetilglucosamina del glicano y el grupo imida del aminoácido asparragina de la proteína, de forma que se obtuvo la cadena polipeptídica de AGP sin glicanos unidos.

El procedimiento anterior permitió conseguir una muestra de AGP desglicosilada sin impurezas de la fracción con glicanos. La comprobación de que no quedaban restos de AGP glicosilada en la

fracción desglucosilada se hizo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Material y métodos, apartado 3.3.9.) y los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura 33.

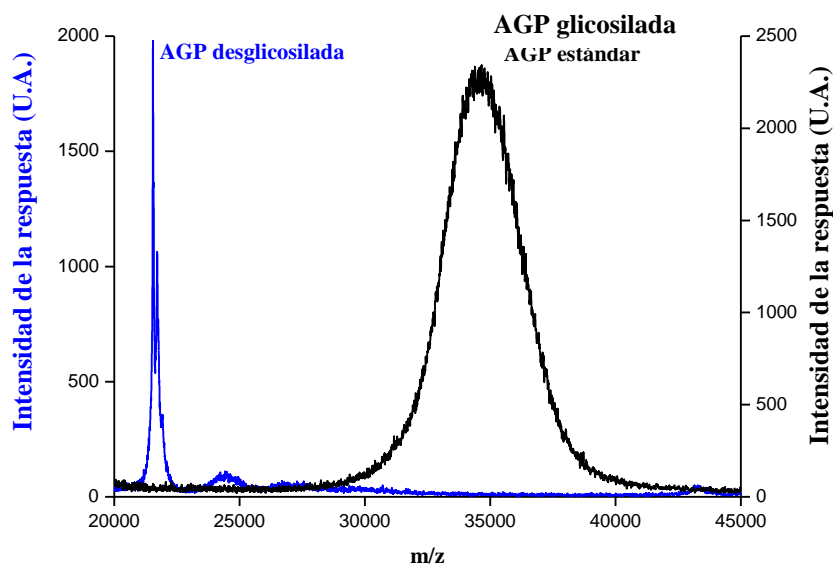


Figura 33. Espectro de masas MALDI-TOF de las proteínas AGP glicosilada y AGP desglucosilada en las mismas condiciones experimentales

La representación anterior, a su vez mostró que el pico correspondiente a la AGP desglucosilada al haber perdido los glicanos tenía una masa en torno a 22 kDa, cifra aproximadamente un 40 % inferior a la de la AGP glicosilada que posee un peso molecular de 35 kDa según el espectro de masas, concordando con lo descrito en la bibliografía [216].

4.4.2. Separación en microchips de SU-8 de las fracciones glicosilada y desglicosilada de la proteína AGP

Una vez obtenidas las dos fracciones de AGP, glicosilada y desglicosilada se procedió a su análisis en los microchips de electroforesis capilar. Se empleó la metodología electroforética desarrollada para las proteínas lácteas usando detección LIF (ver apartado 4.3.6). En primer lugar, fue necesario realizar la derivatización fluorescente de las dos fracciones de AGP para poder detectarlas. La derivatización se hizo con el fluoróforo Chromeo P540TM siguiendo la metodología descrita para las proteínas del suero lácteo (ver Material y métodos, apartado 3.3.5.).

Para evaluar la capacidad del método para separar AGP glicosilada de la AGP desglicosilada, se creó una muestra artificial mezclando estas dos fracciones de AGP. El resultado de dicha separación, que se puede ver en la figura 34, muestra dos picos (picos 1 y 2) correspondientes a la AGP desglicosilada y la AGP glicosilada respectivamente, identificados por incremento de la concentración de dichos compuestos en la muestra. Aparecen además en el electroferograma una serie de picos minoritarios (3, 4 y 5) después del pico correspondiente a la AGP desglicosilada, solapados unos con otros.

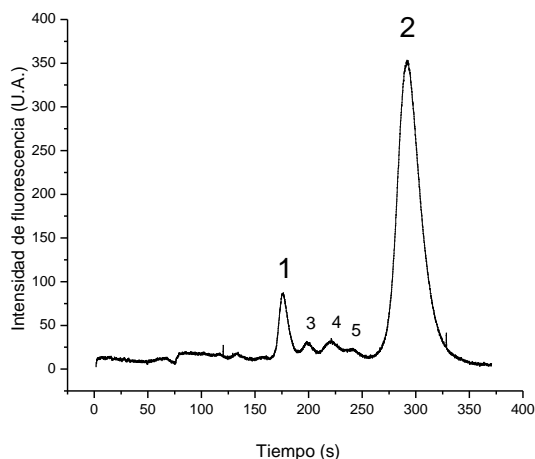


Figura 34. Electroferograma de una mezcla de AGP glicosilada y desglicosilada. Tampón de separación: 5 mM bórax, 0.1 % (m/v) SDS, 10 % (m/v) dextrano y 10 % (v/v) EOTrol, pH 8.5. Inyección tipo *gated*: 2 s, con *stacking* por viscosidad. Voltajes aplicados durante la separación: -750 V BR, -625 SR, resto de pocillos conectados a tierra. Longitud del canal de separación: 3 cm. Fuente de excitación: láser, potencia del haz 1.5 mW. Picos: (1) AGP desglicosilada 10 μ M, (2) a AGP glicosilada 5 μ M y (3), (4) y (5) compuestos minoritarios asociados a la AGP desglicosilada.

Para dilucidar el origen de esas señales minoritarias, se decidió analizar por separado las dos fracciones. El primero de los análisis, correspondiente a AGP desglicosilada, dio como resultado la figura 35.

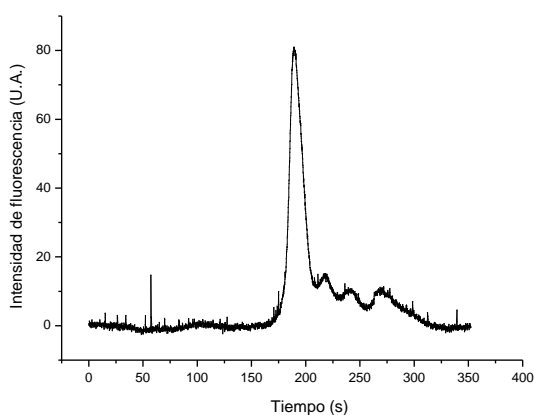


Figura 35. Electroferograma de la muestra de AGP desglicosilada 10 μ M. Restantes condiciones electroforéticas como en la figura 34.

Resultados y discusión

En la figura anterior se mostraba además del pico correspondiente a la AGP, los otros picos minoritarios observados. La figura 35 demostró que los picos minoritarios que aparecían son compuestos minoritarios de la fracción de la AGP desglicosilada, que probablemente se formen en el proceso de desglicosilación y que también se derivatizan con el Chromeo P540TM.

Por el contrario, en el electroferograma de la muestra de AGP glicosilada (figura 36) aparecía, tan sólo la señal correspondiente al pico la proteína, sin señales minoritarias.

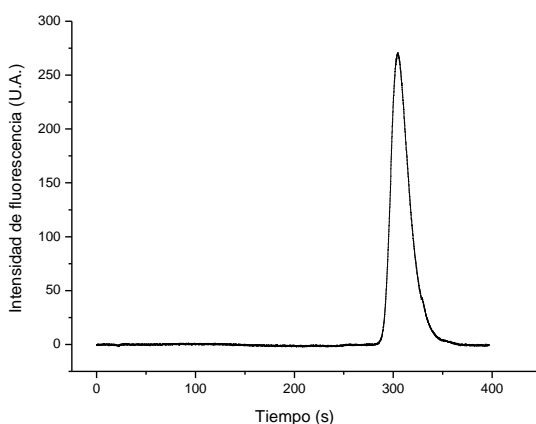


Figura 36. Electroferograma correspondiente al análisis de la muestra de AGP glicosilada 5 μ M. Restantes condiciones electroforéticas como en la figura 34.

La presencia de impurezas en el electroferograma de la AGP sometida a desglicosilación, concuerda a su vez, con el espectro de masas que se hizo de esta muestra (figura 33). En ese espectro, se observaba además del pico mayoritario de la AGP sin glicanos, la presencia de otros componentes minoritarios, que en ningún caso eran restos de AGP glicosilada intacta, como ya se comprobó.

Estos análisis han permitido poner de manifiesto que el método propuesto tiene la suficiente selectividad y eficacia como para separar la fracción glicosilada de la desglucosilada de la AGP de una forma sencilla.

Los datos obtenidos son coherentes con el fundamento de este tipo de separación, que sobre las cadenas de glicanos de la proteína se adsorbe menos SDS y que, por tanto, ésta adquiere menos carga haciendo que su peso molecular parezca aumentado. Esto se comprobó mediante una recta de calibrado estándar de pesos moleculares donde se relacionó el peso molecular de una proteína con su tiempo de migración [218]. Los valores que se utilizaron para calcularla fueron los obtenidos para los patrones de las tres proteínas lácteas (tabla 8 del apartado 4.3.4). La recta que se obtuvo tenía un coeficiente de correlación de 0.99 y la ecuación era la siguiente.

$$y = 5.7623 - 251.69x$$

donde “y” es el logaritmo de la masa molecular del analito analizado en estas condiciones, y “x” es la inversa del tiempo de migración del analito.

Empleando dicha ecuación se calculó la masa molecular que le correspondería a la AGP desglucosilada y el resultado fue 26 kDa (tiempo de migración medio de la AGP desglucosilada, para $n = 3$, 187 ± 24 s), valor similar al obtenido en el espectro de masas que fue del orden de 22 kDa. De esta manera, se demostró una buena correlación entre el valor de masa molecular obtenido mediante nuestro método y el valor obtenido mediante espectrometría de masas.

Resultados y discusión

Se calculó a continuación el valor de la masa molecular para la AGP glicosilada usando la misma recta de calibrado, obteniéndose un valor de 86 kDa, ya que el pico presenta un tiempo de migración medio de 305 ± 34 s ($n = 3$). Este valor es más alto que el peso molecular de 35 kDa obtenido por MALDI-TOF, como era de espera. Este hecho se explica precisamente por la presencia de glicanos, que al adsorber menos SDS, hace que la proteína tenga menos carga negativa y se comporte electroforéticamente como una proteína de mayor tamaño que el que tiene en realidad.

Por último, se estudió la precisión del método para estos compuestos mediante el estudio de la repetibilidad inter-día. Los valores de RSD ($n = 3$) para los tiempos de migración que se obtuvieron fueron para la AGP desglicosilada del 13 % (valores medios $t_m \pm SD$: 187 ± 24) y para la AGP glicosilada 12 % (valores medios $t_m \pm SD$: 305 ± 34), mientras que los valores de RSD que se obtuvieron para las áreas de los picos eran bastante peores del 61 % y 55 % respectivamente (valores medios respectivos área $\pm SD$: 4000 ± 2374 y 20000 ± 11747), valores del mismo orden que los obtenidos para las proteínas lácteas.

Por lo tanto, se ha comprobado como el método desarrollado consigue la resolución completa de la mezcla de las fracciones glicosiladas y no glicosiladas de la AGP en menos de 400 s, planteando la posibilidad de que los microchips de SU-8 de electroforesis capilar sean adecuados para aplicaciones en el campo del control de calidad de biofármacos.

Conclusiones

- 1) Del estudio llevado a cabo para el uso de los microchips de PMMA en la separación de proteínas por tamaño empleando las proteínas de suero lácteo como sistema modelo, se concluye que:
 - 1.1) Los microchips comerciales utilizados este estudio son hidrófobos y requieren el empleo de un recubrimiento dinámico o estático para hacer que las proteínas no queden adsorbidas a las paredes de los canales de separación. Los diferentes polímeros hidrófilos empleados, solos o en combinación con EOTrol LN® (como recubrimiento dinámico), no han permitido obtener con estos microchips un método de separación reproducible para las proteínas de suero lácteo.
 - 1.2) En las diferentes condiciones de limpieza de los microchips ensayadas, resulta difícil desadsorber las proteínas adsorbidas sobre la superficie de los canales. Esto hace que, aparentemente, estos microchips sean de un solo uso, lo cual puede suponer un inconveniente a la hora de desarrollar en ellos un método de separación de proteínas.

- 2) Del empleo de microchips de SU-8 para la puesta a punto de una separación de proteínas por tamaño utilizando el mismo sistema modelo anterior, se deduce que:

Conclusiones

- 2.1) El EOTrol LN[®], agente de recubrimiento dinámico desarrollado para capilares de sílice fundida, es efectivo en estos microchips tanto para suprimir el flujo electroosmótico como para evitar la adsorción de proteínas sobre la superficie de los canales.
- 2.2) Estos microchips de SU-8 permiten llevar a cabo la separación de las proteínas de suero lácteo utilizando un medio de separación de baja viscosidad consistente en 10 % (m/v) de dextrano como agente de cribado, disuelto en un medio de separación que contiene 10 % (v/v) de EOTrol LN[®], 5 mM bórax y 0.1 % (m/v) SDS en unos tiempos de análisis inferiores a 400 s y con límites de detección del orden de 10^{-6} M, cuando las proteínas están derivatizadas con el reactivo fluorogénico FQ y se emplea una lámpara de mercurio de baja presión como fuente luminosa para la detección por fluorescencia.
- 2.3) La baja viscosidad de este medio de separación permite renovarlo fácilmente después de cada inyección obteniéndose una repetibilidad aceptable (valores de RSD para el tiempo de migración de 1 - 4 % intra-chip y 8 - 10 % inter-chip). Sin embargo, la repetibilidad en los valores de las áreas fue elevada (valores de RSD de 10 - 25 % para el mismo microchip y de 30 - 80 % para diferentes microchips).
- 2.4) El uso de los microchips de SU-8, junto con las condiciones electroforéticas desarrolladas en este trabajo, permiten

la separación de las proteínas mayoritarias del suero lácteo en muestras de leche UHT y leche cruda. Sin embargo, la sensibilidad de la detección obtenida no ha permitido detectar algunas de estas proteínas que se encuentran a baja concentración en la leche cruda y en las muestras de leche tratadas térmicamente (UHT).

- 3) Cuando se utiliza el método de separación desarrollado para los microchips de SU-8 y se sustituye la lámpara de mercurio a baja presión por un láser que emite a 532 nm y las proteínas se derivatizan con un reactivo fluorocromo adecuado para la longitud de emisión del láser (Chromeo P540TM) se concluye que:
 - 3.1) Este método también permite la separación de las tres proteínas de suero lácteo en unos tiempos de análisis inferiores a 360 s, una buena repetibilidad en los tiempos de migración (valores de RSD 8 – 11 % para el mismo chip y de 12 – 18 % para diferentes chips). Sin embargo, la repetibilidad en áreas fue mala (valores de RSD 35 – 79 % para diferentes microchips), debido al modo de pre-concentración de la muestra (*stacking*) utilizado en el procedimiento de inyección.
 - 3.2) El límite de detección de las tres proteínas mayoritarias de suero lácteo mejora en 2 órdenes de magnitud y los límites de detección para estas proteínas están comprendidos en el intervalo 17 - 70 nM.

Conclusiones

- 3.3) En estas condiciones no se ha podido detectar la BSA en las muestras de leche cruda probablemente debido a la fluorescencia de fondo que presenta el SU-8 al utilizar un láser como fuente de excitación y a que la baja concentración de BSA en este tipo de leche dificulta la reacción con el Chromeo P540TM.

- 4) El método de separación desarrollado para microchips de SU-8 permite separar la AGP glicosilada de su forma desglicosilada cuando estas proteínas están derivatizadas con Chromeo P540TM. Aunque esta posibilidad puede ser prometedora en el estudio de glicoproteínas naturales o recombinantes, son necesarios más estudios con glicoproteínas que tengan un menor grado de glicosilación que la AGP para confirmar las posibilidades del método en el extenso campo de las glicoproteínas.

Bibliografía

1. Manz A., Graber N., Widmer H. M., *Miniaturized total chemical-analysis systems - A novel concept for chemical sensing*. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 1 (1990) 244-248.
2. Manz A., Eijkel J.C.T., *Miniaturization and chip technology. What can we expect?* *Pure Appl. Chem.*, 73 (2001) 1555-1561.
3. Daw R., Finkelstein J., *Lab on a chip*. *Nature*, 442 (2006) 368-373.
4. Arora A., Simone G., Salieb-Beugelaar G.B., Kim J.T., Manz A., *Latest developments in micro total analysis systems*. *Anal. Chem.*, 82 (2010) 4830-4847.
5. Oita I., Halewyck H., Thys B., Rombaut B., Vander Heyden Y., Mangelings D., *Microfluidics in macro-biomolecules analysis: Macro inside in a nano world*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 398 (2010) 239-264.
6. Nuchtavorn N., Suntornsuk W., Lunte S.M., Suntornsuk L., *Recent applications of microchip electrophoresis to biomedical analysis*. *J. Pharma. Biomed. Analysis*, 113 (2015) 72-96.
7. Cong H., Xu X., Yu B., Yuan H., Peng Q., Tian C., *Recent progress in preparation and application of microfluidic chip electrophoresis*. *J. Micromech. Microeng.*, 25 (2015) 053001 (11 pp).
8. Ohno K., Tachikawa K., Manz A., *Microfluidics: Applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry*. *Electrophoresis*, 29 (2008) 4443-4453.
9. Rosen Y., Gurman P., *MEMS and Microfluidics for diagnostics devices*. *Current Pharma. Biotech.*, 11 (2010) 366-375.
10. Chudy M., Grabowska I., Ciosek P., Filipowicz-Szymanska A., Stadnik D., Wyzkiewicz I., Jedrych E., Juchniewicz M., Skolimowski M., Ziolkowska K., Kwapiszewski R., *Miniaturized tools and devices for bioanalytical applications: An overview*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395 (2009) 647-668.
11. Shimizu H., Mawatari K., Kitamori T., *Femtoliter-scale separation and sensitive detection of nonfluorescent samples in an extended-nano fluidic device*. *Analyst*, 139 (2014) 2154-2157.
12. Guihen E., *Recent advances in miniaturization - The role of microchip electrophoresis in clinical analysis*. *Electrophoresis*, 35 (2014) 138-146.

Bibliografía

13. Shang F., Guihen E., Glennon J.D., *Recent advances in miniaturisation - The role of microchip electrophoresis in clinical analysis*. *Electrophoresis*, 33 (2012) 105-116.
14. Hung L.Y., Wu H.W., Hsieh K., Lee G.B., *Microfluidics platforms for discovery and detection of molecular biomarkers*. *Microfluid Nanofluid*, 16 (2014) 941-963.
15. Whitesides G.M., *The origins and the future of microfluidics*. *Nature*, 442 (2006) 368-373.
16. Glawdel T., Elbuken C., Lee L.E.J., Ren C.L., *Microfluidic system with integrated electroosmotic pumps, concentration gradient generator and fish cell line (RTgill-W1) - Towards water toxicity testing*. *Lab Chip*, 9 (2009) 3243-3250.
17. Do J., Lee S., Han J.Y., Kai J.H., Hong C.C., Gao C.A., Nevin J.H., Beaucage G., Ahn C.H., *Development of functional lab-on-a-chip on polymer for point-of-care testing of metabolic parameters*. *Lab Chip*, 8 (2008) 2113-2120.
18. Liu C.C., Qiu X.B., Ongagna S., Chen D.F., Chen Z.Y., Abrams W.R., Malamud D., Corstjens P., Bau H.H., *A timer-actuated immunoassay cassette for detecting molecular markers in oral fluids*. *Lab Chip*, 9 (2009) 768-776.
19. Fredlake C.P., Hert D.G., Kan C.W., Chiesl T.N., Root B.E., Forster R.E., Barron A.E., *Ultrafast DNA sequencing on a microchip by a hybrid separation mechanism that gives 600 bases in 6.5 minutes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (2008) 476-481.
20. Suarez G., Jin Y.H., Auerswald J., Berchtold S., Knapp H.F., Diserens J.M., Leterrier Y., Manson J.A.E., Voirin G., *Lab-on-a-chip for multiplexed biosensing of residual antibiotics in milk*. *Lab Chip*, 9 (2009) 1625-1630.
21. Benhabib M., Chiesl T.N., Stockton A.M., Scherer J.R., Mathies R.A., *Multichannel capillary electrophoresis microdevice and instrumentation for in situ planetary analysis of organic molecules and biomarkers*. *Anal. Chem.*, 82 (2010) 2372-2379.
22. Crevillen A.G., Hervas M., Lopez M.A., Gonzalez M.C., Escarpa A., *Real sample analysis on microfluidic devices*. *Talanta*, 74 (2007) 342-357.
23. Yeung S.H.I., Liu P., Del Bueno N., Greenspoon S.A., Mathies R.A., *Integrated sample cleanup-capillary electrophoresis microchip for high-performance short tandem repeat genetic analysis*. *Anal. Chem.*, 81 (2009) 210-217.

24. Castell O.K., Allender C.J., Barrow D.A., *Continuous molecular enrichment in microfluidic systems*. Lab Chip, 8 (2008) 1031-1033.
25. Hagan K.A., Bienvenue J.M., Moskaluk C.A., Landers J.P., *Microchip-based solid-phase purification of RNA from biological samples*. Anal. Chem., 80 (2008) 8453-8460.
26. Hwang K.Y., Lim H.K., Jung S.Y., Namkoong K., Kim J.H., Huh N., Ko C., Park J.C., *Bacterial DNA sample preparation from whole blood using surface-modified Si pillar arrays*. Anal. Chem., 80 (2008) 7786-7791.
27. Beyor N., Yi L.N., Seo T.S., Mathies R.A., *Integrated capture, concentration, polymerase chain reaction, and capillary electrophoretic analysis of pathogens on a chip*. Anal. Chem., 81 (2009) 3523-3528.
28. Stenirri S., Cretich M., Rech I., Restelli A., Ghioni M., Cova S., Ferrari M., Cremonesi L., Chiari M., *Dual-color microchip electrophoresis with single-photon avalanche diodes: Application to mutation detection*. Electrophoresis, 29 (2008) 4972-4975.
29. Kong J., Jiang L., Su X.O., Qin J.H., Du Y.G., Lin B.C., *Integrated microfluidic immunoassay for the rapid determination of clenbuterol*. Lab Chip, 9 (2009) 1541-1547.
30. Gao X.H., Jiang L., Su X.O., Qin J.H., Lin B.C., *Microvalves actuated sandwich immunoassay on an integrated microfluidic system*. Electrophoresis, 30 (2009) 2481-2487.
31. Lin W.Y., Wang Y.J., Wang S.T., Tseng H.R., *Integrated microfluidic reactors*. Nano Today, 4 (2009) 470-481.
32. Boyd D.A., Adleman J.R., Goodwin D.G., Psaltis D., *Chemical separations by bubble-assisted interphase mass-transfer*. Anal. Chem., 80 (2008) 2452-2456.
33. Harrison D.J., Manz A., Fan Z.H., Ludi H., Widmer H.M., *Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip*. Anal. Chem., 64 (1992) 1926-1932.
34. Wu D.P., Qin J.H., Lin B.C., *Electrophoretic separations on microfluidic chips*. J. Chromatogr. A, 1184 (2008) 542-559.
35. vonHeeren F., Verpoorte E., Manz A., Thormann W., *Micellar electrokinetic chromatography separations and analyses of biological samples on a cyclic planar microstructure*. Anal. Chem., 68 (1996) 2044-2053.

Bibliografía

36. Manz A., Fettinger J.C., Verpoorte E., Ludi H., Widmer H.M., Harrison D.J., *Micromachining of monocrystalline silicon and glass for chemical-analysis systems - A look into next century technology or just a fashionable craze*. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 10 (1991) 144-149.
37. Dolnik V., Liu S.R., Jovanovich S., *Capillary electrophoresis on microchip*. *Electrophoresis*, 21 (2000) 41-54.
38. Zhou J.W., Ellis A.V., Voelcker N.H., *Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices*. *Electrophoresis*, 31 (2010) 2-16.
39. Chen Y., Zhang L., Chen G., *Fabrication, modification, and application of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips*. *Electrophoresis*, 29 (2008) 1801-1814.
40. Shadpour H., Hupert M.L., Patterson D., Liu C.G., Galloway M., Stryjewski W., Goettert J., Soper S.A., *Multichannel microchip electrophoresis device fabricated in polycarbonate with an integrated contact conductivity sensor array*. *Anal. Chem.*, 79 (2007) 870-878.
41. Nunes P.S., Ohlsson P.D., Ordeig O., Kutter J.P., *Cyclic olefin polymers: emerging materials for lab-on-a-chip applications*. *Microfluid. Nanofluid.*, 9 (2010) 145-161.
42. Kuo J.S., Chiu D.T., *Disposable microfluidic substrates: Transitioning from the research laboratory into the clinic*. *Lab Chip*, 11 (2011) 2656-2665.
43. de Mello A., *Plastic fantastic?* *Lab Chip*, 2 (2002) 31N-36N.
44. Salim M., McArthur S.L., Vaidyanathan S., Wright P.C., *Towards proteomics-on-chip: The role of the surface*. *Mol. Biosyst.*, 7 (2011) 101-115.
45. Ren X.Q., Bachman M., Sims C., Li G.P., Allbritton N., *Electroosmotic properties of microfluidic channels composed of poly(dimethylsiloxane)*. *J. Chromatogr. B*, 762 (2001) 117-125.
46. Sikanen T., Tuomikoski S., Ketola R.A., Kostianen R., Franssila S., Kotiaho T., *Characterization of SU-8 for electrokinetic microfluidic applications*. *Lab Chip*, 5 (2005) 888-896.
47. Beattie J.K., *The intrinsic charge on hydrophobic microfluidic substrates*. *Lab Chip*, 6 (2006) 1409-1411.
48. Graciaa A., Creux P., Dicharry C., Lachaise J., *Measurement of the zeta potential of oil drops with the spinning tube zetameter*. *J. Dispersion Sci. Technol.*, 23 (2002) 301-307.

49. Kirby B.J., Hasselbrink E.F., *Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers*. *Electrophoresis*, 25 (2004) 203-213.
50. Geschke O., Klank H., Tellesmann P., ed. *Microsystem engineering of lab-on-a-chip devices*. (2004), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA: Weinheim, Alemania.
51. Becker H., Gartner C., *Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008) 89-111.
52. Tuomikoski S., Franssila S., *Free-standing SU-8 microfluidic chips by adhesive bonding and release etching*. *Sens. Actuators A-Physical*, 120 (2005) 408-415.
53. Fiorini G.S., Chiu D.T., *Disposable microfluidic devices: Fabrication, function, and application*. *Biotechniques*, 38 (2005) 429-446.
54. Chia-Wen T., Don L.D., *Bonding techniques for thermosplastic microfluidics*, in *Lab-on-a-chip technology (volumen 1): Fabrication and microfluidics*, R.A. Herold K., Editor. (2009), Caister Academic Press: Norfolk, Inglaterra. 45-63 (Cap. 5).
55. Grossman P.D., *Factors affecting the performance of capillary electrophoresis separations: Joule heating, electroosmosis, and zone dispersion in Capillary electrophoresis: Theory and practice*, C.J.C. Grossman P.D., Editor. (1992), Academic press San Diego, California, Estados Unidos. 3-43 (Cap. 1).
56. Yang S., Liu J.K., Lee C.S., Devoe D.L., *Microfluidic 2-D PAGE using multifunctional in situ polyacrylamide gels and discontinuous buffers*. *Lab Chip*, 9 (2009) 592-599.
57. Makamba H., Huang J.W., Chen H.H., Chen S.H., *Photopatterning of tough single-walled carbon nanotube composites in microfluidic channels and their application in gel-free separations*. *Electrophoresis*, 29 (2008) 2458-2465.
58. Nagata H., Tabuchi M., Hirano K., Baba Y., *High-speed separation of proteins by microchip electrophoresis using a polyethylene glycol-coated plastic chip with a sodium dodecyl sulfate-linear polyacrylamide solution*. *Electrophoresis*, 26 (2005) 2687-2691.
59. Shieh P., Hoang D., Guttman A., Cooke N., *Capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of proteins I. Reproducibility and stability*. *J Chromatogr. A*, 676 (1994) 219-226.

Bibliografía

60. Kitagawa F., Otsuka K., *Micellar electrokinetic chromatography on microchips*. J. Sep. Sci, 31 (2008) 794-802.
61. Liu Q., Wang L., Zhou Z., Wang Q., Yan L., Zhang B., *Toward rapid preparation of capillary columns for electrochromatography use*. Electrophoresis, 35 (2014) 836-839.
62. Smejkal P., Bottenus D., Breadmore M.C., Guijt R.M., Ivory C.F., Foret F., Macka M., *Microfluidic isotachopheresis: A review*. Electrophoresis, 34 (2013) 1493-1509.
63. Bruin G.J.M., *Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices*. Electrophoresis, 21 (2000) 3931-3951.
64. Lacher N.A., Garrison K.E., Martin R.S., Lunte S.M., *Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry*. Electrophoresis, 22 (2001) 2526-2536.
65. Wang J., Tian B.M., Sahlin E., *Integrated electrophoresis chips/amperometric detection with sputtered gold working electrodes*. Anal. Chem., 71 (1999) 3901-3904.
66. Wang J., Tian B.M., Sahlin E., *Micromachined electrophoresis chips with thick-film electrochemical detectors*. Anal. Chem., 71 (1999) 5436-5440.
67. Martin R.S., Gawron A.J., Lunte S.M., Henry C.S., *Dual-electrode electrochemical detection for poly(dimethylsiloxane)-fabricated capillary electrophoresis microchips*. Anal. Chem., 72 (2000) 3196-3202.
68. Woolley A.T., Lao K.Q., Glazer A.N., Mathies R.A., *Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection*. Anal. Chem., 70 (1998) 684-688.
69. Liu Y., Fanguy J.C., Bledsoe J.M., Henry C.S., *Dynamic coating using polyelectrolyte multilayers for chemical control of electroosmotic flow in capillary electrophoresis microchips*. Anal. Chem., 72 (2000) 5939-5944.
70. Naik A.K., Hanay M.S., Hiebert W.K., Feng X.L., Roukes M.L., *Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry*. Nat. Nanotechnol., 4 (2009) 445-450.
71. Wang X., Yi L., Mukhitov N., Schrell A.M., Dhumpa R., Roper M.G., *Microfluidics-to-mass spectrometry: A review of coupling methods and applications*. J. Chromatogr. A, 1382 (2015) 98-116.

72. Fernández-la-Villa A., Pozo-Ayuso D.F., Castaño-Álvarez M., *New analytical portable instrument for ME with electrochemical detection*. *Electrophoresis*, 31 (2010) 2641-2649.
73. Li X., Chen Z., Yang F., Pan J., Li Y., *Development of a microchip-pulsed electro-chemical method for rapid determination of L-DOPA and tyrosine in mucunapruriens*. *J. Sep. Sci.*, 36 (2013) 1590-1596.
74. Wang S., Chen Z., Tang X., Shi L., Zhang L., Yao M., *Rapid determination of partition coefficients of pharmaceuticals by phase distribution and microchipcapillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. *J. Sep. Sci.*, 36 (2013) 3615-3622.
75. Tanyanyiwa J., Leuthardt S., Hauser P.C., *Conductimetric and potentiometric detection in conventional and microchip capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 23 (2002) 3659-3666.
76. Matysik F.M., *Advances in amperometric and conductometric detection in capillary and chip-based electrophoresis*. *Microchim. Acta*, 160 (2008) 1-14.
77. Nyholm L., *Electrochemical techniques for lab-on-a-chip applications*. *Analyst*, 130 (2005) 599-605.
78. Ghanim M.H., Abdullah M.Z., *Integrating amperometric detection with electrophoresis microchip devices for biochemical assays: Recent developments*. *Talanta*, 85 (2011) 28-34.
79. Batalla P., Martin A., López M.A., González M.C., Escarpa A., *Enzyme-based microfluidic chip coupled to graphene electrodes for the detection of D-amino acid enantiomer-biomarkers*. *Anal. Chem.*, 87 (2015) 5074-5078.
80. Verpoorte E., *Chip vision - optics for microchips*. *Lab. Chip.*, 3 (2003) 42N-52N.
81. Lacroix M., Poinot V., Fournier C., Couderc F., *Laser-induced fluorescence detection schemes for the analysis of proteins and peptides using capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 26 (2005) 2608-2621.
82. Garcia-Campana A.M., Taverna M., Fabre H., *LIF detection of peptides and proteins in CE*. *Electrophoresis*, 28 (2007) 208-232.
83. Xiao D., Zhao S.L., Yuan H.Y., Yang X.P., *CE detector based on light-emitting diodes*. *Electrophoresis*, 28 (2007) 233-242.

Bibliografía

84. Xiao D., Yan L., Yuan H.Y., Zhao S.L., Yang X.P., Choi M.M.F., *CE with LED-based detection: An update*. *Electrophoresis*, 30 (2009) 189-202.
85. Lee T., Yeung E.S., *High-sensitivity laser-induced fluorescence detection of native proteins in capillary electrophoresis*. *J. Chromatogr.*, 595 (1992) 319-325.
86. Hu L., Xu G., *Applications and trends in electrochemiluminescence*. *Chem. Soc. Rev.*, 39 (2010) 3275-3304.
87. Niskanen A.J., Ylinen-Hinkka T., Kulmala S., Franssila S., *Integrated micro-electrode hot electron electrochemiluminescent sensor for microfluidic applications*. *Sens. Actuators B*, 152 (2011) 56-62.
88. Hoffmann P., Hausig U., Schulze P., Belder D., *Microfluidic glass chips with an integrated nanospray emitter for coupling to a mass spectrometer*. *Angew. Chem. Int.*, 46 (2007) 4913-4916.
89. Tachibana Y., Otsuka K., Terabe S., Arai A., Suzuki K., Nakamura S., *Effects of the length and modification of the separation channel on ME-mass spectrometry for analysis of bioactive compounds*. *J. Chromatogr. A*, 1025 (2004) 287-296.
90. Tachibana Y., Otsuka K., Terabe S., Arai A., Suzuki K., Nakamura S., *Robust and simple interface for ME-mass spectrometry*. *J. Chromatogr. A*, 1011 (2003) 181-192.
91. Li X., Xiao D., Sanders T., Tchounwou P., Liu Y.-M., *Fast quantification of aminoacids by ME-mass spectrometry*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 8131-8136.
92. Tran N.T., Ayed I., Pallandre A., Taverna M., *Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods: An update*. *Electrophoresis*, 31 (2010) 147-173.
93. Shadpour H., Soper S.A., *Two-dimensional electrophoretic separation of proteins using poly(methyl methacrylate) microchips*. *Anal. Chem.*, 78 (2006) 3519-3527.
94. Peng Y., Pallandre A., Tran N.T., Taverna M., *Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods*. *Electrophoresis*, 29 (2008) 157-178.
95. Muck A., Svatos A., *Chemical modification of polymeric microchip devices*. *Talanta*, 74 (2007) 333-341.
96. Abad-Villar E.M., Kuban P., Hauser P.C., *Determination of biochemical species on electrophoresis chips with an external*

- contactless conductivity detector*. *Electrophoresis*, 26 (2005) 3609-3614.
97. Yu M., Wang H.Y., Woolley A.T., *Polymer microchip CE of proteins either off- or on-chip labeled with chameleon dye for simplified analysis*. *Electrophoresis*, 30 (2009) 4230-4236.
 98. Nii K., Sueyoshi K., Otsuka K., Takai M., *Zone electrophoresis of proteins in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchip coated with physically adsorbed amphiphilic phospholipid polymer*. *Microfluid. Nanofluid.*, 14 (2013) 951-959.
 99. Sun X., Liu J., Lee M.L., *Surface modification of polymer microfluidic devices using in-channel atom transfer radical polymerization*. *Electrophoresis*, 29 (2008) 2760-2767.
 100. Sun X., Liu J., Lee M.L., *Surface modification of glycidyl-containing poly(methyl methacrylate) microchips using surface-initiated atom-transfer radical polymerization*. *Anal. Chem.*, 80 (2008) 856-863.
 101. Liu J., Sun X., Lee M.L., *Adsorption-resistant acrylic copolymer for prototyping of microfluidic devices for proteins and peptides*. *Anal. Chem.*, 79 (2007) 1926-1931.
 102. Sun X., Li D., Lee M.L., *Poly(ethylene glycol)-functionalized polymeric microchips for capillary electrophoresis*. *Anal. Chem.*, 81 (2009) 6278-6284.
 103. Pan T., Fiorin G.S., Chiu D.T., Woolley A.T., *In-channel atom-transfer radical polymerization of thermoset polyester microfluidic devices for bioanalytical applications*. *Electrophoresis*, 28 (2007) 2904-2911.
 104. Wang H., Wang H.-M., Jin Q.-H., Cong H., Zhuang G.-S., Zhao J.-L., Sun C.-L., Song H.-W., Wang W., *Microchip-based small, dense low-density lipoproteins assay for coronary heart disease risk assessment*. *Electrophoresis*, 29 (2008) 1932-1941.
 105. Fruetel J.A., Renzi R.F., VanderNoot V.A., Stamps J., Horn B.A., West J.A.A., Ferko S., Crocker R., Bailey C.G., Arnold D., Wiedenman B., Choi W.Y., Yee D., Shokair I., Hasselbrink E., Paul P., Rakestraw D., Padgen D., *Microchip separations of protein biotoxins using an integrated hand-held device*. *Electrophoresis*, 26 (2005) 1144-1154.
 106. Schulze P., Ludwig M., Kohler F., Belder D., *Deep UV laser-induced fluorescence detection of unlabeled drugs and proteins in microchip electrophoresis*. *Anal. Chem.*, 77 (2005) 1325-1329.

Bibliografía

107. Wheeler T.D., Sun J.L., Pleiner S., Geier H., Dobberthien P., Studts J., Singh R., Fathollahi B., *Microchip zone electrophoresis for high-throughput analysis of monoclonal antibody charge variants*. *Anal. Chem.*, 86 (2014) 5416-5424.
108. Roman G.T., Carroll S., McDaniel K., Culbertson C.T., *Micellar electrokinetic chromatography of fluorescently labeled proteins on poly(dimethylsiloxane)-based microchips*. *Electrophoresis*, 27 (2006) 2933-2939.
109. Xu Y., Li J., Wang E., *Microchip micellar electrokinetic chromatography based on one functionalized ionic liquid and its excellent performance on proteins separation*. *J. Chromatograph. A*, 1207 (2008) 175-180.
110. Osiri J.K., Shadpour H., Soper S.A., *Ultra-fast two-dimensional microchip electrophoresis using SDS mu-CGE and microemulsion electrokinetic chromatography for protein separations*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 398 (2010) 489-498.
111. Tan W., Fan Z.H., Qiu C.X., Ricco A.J., Gibbons I., *Miniaturized capillary isoelectric focusing in plastic microfluidic devices*. *Electrophoresis*, 23 (2002) 3638-3645.
112. Ren K.N., Liang Q.L., Yao B., Luo G.O., Wang L.D., Gao Y., Wang Y.M., Qiu Y., *Whole column fluorescence imaging on a microchip by using a programmed organic light emitting diode array as a spatial-scanning light source and a single photomultiplier tube as detector*. *Lab Chip*, 7 (2007) 1574-1580.
113. Yao B., Yang H.H., Liang Q.L., Luo G., Wang L.D., Ren K.N., Gao Y.D., Wang Y.M., Qiu Y., *High-speed, whole-column fluorescence imaging detection for isoelectric focusing on a microchip using an organic light emitting diode as light source*. *Anal. Chem.*, 78 (2006) 5845-5850.
114. Zhang J., Das C., Fan Z.H., *Dynamic coating for protein separation in cyclic olefin copolymer microfluidic devices*. *Microfluid. Nanofluid.*, 5 (2008) 327-335.
115. Cui H.C., Horiuchi K., Dutta P., Ivory C.F., *Isoelectric focusing in a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip*. *Anal. Chem.*, 77 (2005) 1303-1309.
116. Cui H.C., Horiuchi K., Dutta P., Ivory C.F., *Multistage isoelectric focusing in a polymeric microfluidic chip*. *Anal. Chem.*, 77 (2005) 7878-7886.
117. Ou J.J., Glawdel T., Samy R., Wang S.W., Liu Z., Ren C.L., Pawliszyn J., *Integration of dialysis membranes into a*

- poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip for isoelectric focusing of proteins using whole-channel imaging detection.* Anal. Chem., 80 (2008) 7401-7407.
118. Kinoshita M., Nakatsuji Y., Suzuki S., Hayakawa T., Kakehi K., *Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method.* J. Chromatogr. A, 1309 (2013) 76-83.
119. Vlckova M., Kalman F., Schwarz M.A., *Pharmaceutical applications of isoelectric focusing on microchip with imaged UV detection.* J. Chromatogr. A, 1181 (2008) 145-152.
120. Lin C.C., Hsu B.K., Chen S.H., *Integrated isotachophoretic stacking and gel electrophoresis on a plastic substrate and variations in detection dynamic range.* Electrophoresis, 29 (2008) 1228-1236.
121. Wang J., Zhang Y., Mohamadi M.R., Kaji N., Tokeshi M., Baba Y., *Exceeding 20 000-fold concentration of protein by the on-line isotachopheresis concentration in poly(methyl methacrylate) microchip.* Electrophoresis, 30 (2009) 3250-3256.
122. Mohamadi M.R., Mahmoudian L., Kaji N., Tokeshi M., Baba Y., *Dynamic coating using methylcellulose and polysorbate 20 for nondenaturing electrophoresis of proteins on plastic microchips.* Electrophoresis, 28 (2007) 830-836.
123. Mohamadi M.R., Kaji N., Tokeshi M., Baba Y., *Dynamic cross-linking effect of Mg²⁺ to enhance sieving properties of low-viscosity poly(vinylpyrrolidone) solutions for microchip electrophoresis of proteins.* Anal. Chem., 80 (2008) 312-316.
124. Okada H., Kaji N., Tokeshi M., Baba Y., *Poly(methyl methacrylate) microchip electrophoresis of proteins using linear-poly(acrylamide) solutions as separation matrix.* Anal. Sci., 24 (2008) 321-325.
125. Okada H., Kaji N., Tokeshi M., Baba Y., *Rinse and evaporation coating of poly(methyl methacrylate) microchip for separation of sodium dodecyl sulfate-protein complex.* J. Chromatogr. A, 1192 (2008) 289-293.
126. Osiri J.K., Shadpour H., Park S., Snowden B.C., Chen Z.Y., Soper S.A., *Generating high peak capacity 2-D maps of complex proteomes using PMMA microchip electrophoresis.* Electrophoresis, 29 (2008) 4984-4992.

Bibliografía

127. Lin X., Chen Q., Liu W., Yi L., Li H., Wang Z., Lin J.-M., *Assay of multiplex proteins from cell metabolism based on tunable aptamer and ME*. Biosens. Bioelectron., 63 (2015) 105-111.
128. Han J., Singh A.K., *Rapid protein separations in ultra-short microchannels: Microchip sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing*. J. Chromatogr. A, 1049 (2004) 205-209.
129. Hatch A.V., Herr A.E., Throckmorton D.J., Brennan J.S., Singh A.K., *Integrated preconcentration SDS-PAGE of proteins in microchips using photopatterned cross-linked polyacrylamide gels*. Anal. Chem., 78 (2006) 4976-4984.
130. Root B.E., Zhang B., Barron A.E., *Size-based protein separations by microchip electrophoresis using an acid-labile surfactant as a replacement for SDS*. Electrophoresis, 30 (2009) 2117-2122.
131. Huang H.Q., Xu F., Dai Z.P., Lin B.C., *On-line isotachophoretic preconcentration and gel electrophoretic separation of sodium dodecyl sulfate-proteins on a microchip*. Electrophoresis, 26 (2005) 2254-2260.
132. Foote R.S., Khandurina J., Jacobson S.C., Ramsey J.M., *Preconcentration of proteins on microfluidic devices using porous silica membranes*. Anal. Chem., 77 (2005) 57-63.
133. Ohashi R., Otero J.M., Chwistek A., Hamel J.F.P., *Determination of monoclonal antibody production in cell culture using novel microfluidic and traditional assays*. Electrophoresis, 23 (2002) 3623-3629.
134. Vasilyeva E., Woodard J., Taylor F.R., Kretschmer M., Fajardo H., Lyubarskaya Y., Kobayashi K., Dingley A., Mhatre R., *Development of a chip-based capillary gel electrophoresis method for quantification of a half-antibody in immunoglobulin G(4) samples*. Electrophoresis, 25 (2004) 3890-3896.
135. Herwig E., Marchetti-Deschmann M., Wenz C., Rüfer A., Redl H., Bahrami S., Allmaier G., *Sensitive detection of C-reactive protein in serum by immunoprecipitation-microchip capillary gel electrophoresis*. Anal. Biochem., 478 (2015) 102-106.
136. Werling J., Kocsis B., Dean D., Kustos I., *Characterisation of protein composition and detection of IgA in cervicovaginal fluid by microchip technology*. J. Chromatogr. B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 869 (2008) 54-58.

137. Pandey S., Lu C.M., Herold D.A., *Measurement of microalbuminuria using protein chip electrophoresis*. Am. J. Clin. Pathol., 129 (2008) 432-438.
138. Schmut O., Horwath-Winter J., Zenker A., Trummer G., *The effect of sample treatment on separation profiles of tear fluid proteins: Qualitative and semi-quantitative protein determination by an automated analysis system*. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 240 (2002) 900-905.
139. Kim H.R., Andrieux K., Delomenie C., Chacun H., Appel M., Desmaele D., Taran F., Georgin D., Couvreur P., Taverna M., *Analysis of plasma protein adsorption onto PEGylated nanoparticles by complementary methods: 2-DE, CE and protein Lab-on-chip((R)) system*. Electrophoresis, 28 (2007) 2252-2261.
140. Grunert T., Marchetti-Deschmann M., Miller I., Mueller M., Allmaier G., *Comparing the applicability of CGE-on-the-chip and SDS-PAGE for fast pre-screening of mouse serum samples prior to proteomics analysis*. Electrophoresis, 29 (2008) 4332-4340.
141. Chen X., Tang K., Lee M., Flynn G., *Microchip assays for screening monoclonal antibody product quality*. Electrophoresis, 29 (2008) 4993-5002.
142. El Rassi Z., *Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: An update covering 2007-2009*. Electrophoresis, 31 (2010) 174-191.
143. Yang W., Yu M., Sun X., Woolley A.T., *Microdevices integrating affinity columns and capillary electrophoresis for multi-biomarker analysis in human serum*. Lab. Chip., 10 (2010) 2527-2533.
144. Nge P.N., Pagaduan J.V., Yu M., Woolley A.T., *Microfluidics chips with reversed-phase monoliths for solid phase extraction and on-chip labeling*. J. Chromatogr. A, 1261 (2012) 120-135.
145. Jemere A.B., Martinez D., Finot M., Harrison D.J., *Capillary electrochromatography with packed bead beds in microfluidic devices*. Electrophoresis, 30 (2009) 4237-4244.
146. Tsukagoshi K., Jinno N., Nakajima R., *Development of a micro total analysis system incorporating chemiluminescence detection and application to detection of cancer markers*. Anal. Chem., 77 (2005) 1684-1688.

Bibliografía

147. Kaigala G.V., Bercovici M., Behnam M., Elliott D., Santiago J.G., Back-house C.J., *Miniaturized system for isotachopheresis assays*. Lab. Chip, 10 (2010) 2242-2250.
148. Jacroux T., Bottenus D., Rieck B., Ivory C.F., Dong W.-J., *Cationic isotachopheresis separation of the biomarker cardiac troponin from a high-abundance contaminant, serum albumin*. Electrophoresis 35 (2014) 2029-2038.
149. Wu R., Wang Z., Zhao W., Yeung W.S.B., Fung Y.S., *Multi-dimension microchip-capillary electrophoresis device for determination of functional proteins in infant milk formula*. J. Chromatogr. A, 1304 (2013) 220-226.
150. Wu R., Yeung W.S.B., Fung Y.-S., *2-D t-ITP/CZE determination of clinical urinary proteins using a microfluidic-chip capillary electrophoresis device*. Electrophoresis, 32 (2011) 3406-3414.
151. Cui H., Dutta P., Ivory C.F., *Isotachopheresis of proteins in a networked microfluidic chip: Experiment and 2-D simulation*. Electrophoresis, 28 (2007) 1138-1145.
152. Wal J.M., *Cow's milk proteins/allergens*. Aim. Allergy Asthma Immunol., 89 (2002) 3-10.
153. Veledo M.T., de Frutos M., Diez-Masa J.C., *Analysis of trace amounts of bovine β -lactoglobulin in infant formulas by capillary electrophoresis with on-capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection*. J. Sep. Sci., 28 (2005) 941-947.
154. Exl B.M., *A review of recent developments in the use of moderately hydrolyzed whey formulae in infant nutrition*. Nutr. Res., 21 (2001) 355-79.
155. Pelaez-Lorenzo C., Diez-Masa J.C., Vasallo I., de Frutos M., *A new sample preparation method compatible with capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence for improving detection of low levels of β -lactoglobulin in infant foods*. Anal. Chim. Acta 649 (2009) 202-210.
156. Veledo M.T., de Frutos M., Diez-Masa J.C., *Development of a method for quantitative analysis of the major whey proteins by capillary electrophoresis with on-capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection*. J. Sep. Sci., 28 (2005) 935-940.
157. Buetikofer U., Meyer J., Rehberger B., *Determination of the percentage of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin of*

- total milk protein in raw and heat treated skim milk.* Milchwissenschaft, 61 (2006) 263-266.
158. Selo I., Clement G., Bernard H., Chatel J., Creminon C., Peltre G., Wal J. , *Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides.* Clin. Exp. Allergy, 29 (1997) 1055-1063.
159. Logtenberg T., *Antibody cocktails: Next-generation biopharmaceuticals with improved potency.* Trends Biotech., 25 (2007) 390-394.
160. Walsh G., *Biopharmaceutical benchmarks 2014.* Nature Biotech., 32 (2014) 992-1000.
161. Brekke O.H., Sandlie I., *Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century.* Nat. Rev. Drug Discov., 2 (2003) 52-62.
162. Little M.J., Paquette D.M., Roos P.K., *Electrophoresis of pharmaceutical proteins: Status quo.* Electrophoresis, 27 (2006) 2477-2485.
163. Kaschak T., Boyd D., Yan B.X., *Characterization of glycation in an IgG1 by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate and mass spectrometry.* Anal. Biochem., 417 (2011) 256-263.
164. Rustandi R.R., Washabaugh M.W., Wang Y., *Applications of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products.* Electrophoresis, 29 (2008) 3612-3620.
165. Creamer J.S., Oborny N.J., Lunte S.M., *Recent advances in the analysis of therapeutic proteins by capillary and microchip electrophoresis.* Anal. Methods, 6 (2014) 5427-5449.
166. Kamoda S., Kakehi K., *Evaluation of glycosylation for quality assurance of antibody pharmaceuticals by capillary electrophoresis.* Electrophoresis, 29 (2008) 3595-3604.
167. Kamoda S., Ishikawa R., Kakehi K., *Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for detailed studies on N-linked oligosaccharide profile of therapeutic recombinant monoclonal antibodies.* J. Chromatogr. A, 1133 (2006) 332-339.
168. Ma S., Nashbeh W., *Carbohydrate analysis of a chimeric recombinant monoclonal antibody by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.* Anal. Chem., 71 (1999) 5185-5192.
169. Antes B., Oberkleiner P., Nechansky A., Szoar O., *Qualification of a microfluidics-based electrophoretic method for impurity*

Bibliografía

- testing of monoclonal antibodies*. J. Pharm. Biomed. Anal., 51 (2010) 743-749.
170. Duffy D.C., McDonald J.C., Schueller O.J., Whitesides G.M., *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. Anal. Chem., 70 (1998) 4974-4984.
171. Shakalisava Y., Poitevin M., Viovy J.L., Descroix S., *Versatile method for electroosmotic flow measurements in microchip electrophoresis*. J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 1030-1033.
172. Veledo M.T., de Frutos M., Diez-Masa J.C., *Amino acids determination using capillary electrophoresis with on-capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection*. J. Chromatogr. A, 1079 (2005) 335-343.
173. Veledo M.T., de Frutos M., Diez-Masa J.C., *On-capillary derivatization and analysis of amino acids in human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: Application to diagnosis of aminoacidopathies*. Electrophoresis, 27 (2006) 3101-3107.
174. Garrido-Medina R., Diez-Masa J.C., de Frutos M., *CE methods for analysis of isoforms of prostate-specific antigen compatible with online derivatization for LIF detection*. Electrophoresis, 32 (2011) 2036-2043.
175. Probes, M., *tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp02333.pdf*. 2001.
176. Motif, A. www.activemotif.com/documents/1642.pdf. Consultada por última vez 25/11/2015.
177. Ongay S., Neuss C., *Isoform differentiation of intact AGP from human serum by capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Anal. Bioanal. Chem., 398 (2010) 845-855.
178. Liu K., Fan Z.H., *Thermoplastic microfluidic devices and their applications in protein and DNA analysis*. Analyst, 136 (2011) 1288-1297.
179. Obubuafo A., Balamurugan S., Shadpour H., Spivak D., McCarley R.L., Soper S.A., *Poly(methyl methacrylate) microchip affinity capillary gel electrophoresis of aptamer-protein complexes for the analysis of thrombin in plasma*. Electrophoresis, 29 (2008) 3436-3445.
180. Dolnik V., *Wall coating for capillary electrophoresis on microchips*. Electrophoresis, 25 (2004) 3589-3601.

181. Heller C., *Capillary electrophoresis of proteins and nucleic-acids in gels and entangled polymer-solutions*. J. Chromatogr. A, 698 (1995) 19-31.
182. Okada H., Kaji N., Tokeshi M., Baba Y., *Channel wall coating on a poly(methyl methacrylate) CE microchip by thermal immobilization of a cellulose derivative for size-based protein separation*. Electrophoresis, 28 (2007) 4582-4589.
183. Ross D., Johnson T.J., Locascio L.E., *Imaging of electroosmotic flow in plastic microchannels*. Anal. Chem., 73 (2001) 2509-2515.
184. Discovery, T., [http://www.targetdiscovery.com/~tdidocs/EOTrolUserManual RevD.pdf](http://www.targetdiscovery.com/~tdidocs/EOTrolUserManualRevD.pdf). Consultada por última vez 23/11/2015.
185. Ganzler K., Greve K.S., Cohen A.S., Karger B.L., Guttman A., Cooke N.C., *High-performance capillary electrophoresis of SDS protein complexes using UV-transparent polymer networks*. Anal. Chem., 64 (1992) 2665-2671.
186. Hu S., Jiang J., Cook L.M., Richards D.P., Horlick L., Wong B., Dovichi N.J., *Capillary sodium dodecyl sulfate-DALT electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for size-based analysis of proteins in human colon cancer cells*. Electrophoresis, 23 (2002) 3136-3142.
187. Kaneta T., Yamamoto D., Imasaka T., *Postcolumn derivatization of proteins in capillary sieving electrophoresis/laser-induced fluorescence detection*. Electrophoresis, 30 (2009) 3780-3785.
188. Viovy J.L., Heller C., ed. *Principles of size-based separations in polymer solutions*. Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, ed. P.G. Righetti. (1996). 477–508 (Cap. 11).
189. *Polymer Handbook*. (1999): Oxford University Press, Inc.
190. Grossman P.D., Soane D.S., *Experimental and theoretical studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer-solutions*. Biopolymers, 31 (1991) 1221-1228.
191. Peters T., *Serum Albumin*. Adv. Protein Chem., 37 (1985) 161-245.
192. Shadpour H., Musyimi H., Chen J.F., Soper S.A., *Physicochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance*. J. Chromatogr. A, 1111 (2006) 238-251.

Bibliografía

193. Hjerten S., Kubo K., *A new-type of pH-stable and detergent-stable coating for elimination of electroendosmosis and adsorption in (capillary) electrophoresis*. *Electrophoresis*, 14 (1993) 390-395.
194. Lorenz H., Despont M., Fahrni N., LaBianca N., Renaud P., Vettiger P., *SU-8: a low-cost negative resist for MEMS J*. *Micromech. Microeng.*, 7 (1997) 121-124.
195. Yang D.L., Sauvageot R., Pentony Jr. S.L., ed. *DNA sequencing by capillary electrophoresis*. *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated techniques*, ed. Landers J.P. (2008), CRC Press, Taylor & Francis group, Boca Raton: FL. USA.
196. Sikanen T., Wiedmer S.K., Heikkila L., Franssila S., Kostianen R., Kotiaho T., *Dynamic coating of SU-8 microfluidic chips with phospholipid disks*. *Electrophoresis*, 31 (2010) 2566-2574.
197. Pai J.H., Wang Y., Salazar G.T., Sims C.E., Bachman M., Li G.P., Allbritton N.L., *Photoresist with low fluorescence for bioanalytical applications*. *Anal. Chem.*, 79 (2007) 8774-8780.
198. Sikanen T., Heikkila L., Tuornikoski S., Ketola R.A., Kostianen R., Franssila S., Kotiaho T., *Performance of SU-8 microchips as separation devices and comparison with glass microchips*. *Anal. Chem.*, 79 (2007) 6255-6263.
199. Roper M.G., Guillo C., Venton J., *Ultrafast electrophoretic separations*, in *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*, Landers J.P., Editor. (2008), CRC Press Inc: Florida.
200. Sigma-Aldrich Co. LLC.,
[www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product Information Sheet/d1037pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product%20Information%20Sheet/d1037pis.pdf).
Consultada por última vez 25/11/2015.
201. Zhu C.R., He X.Y., Kraly J.R., Jones M.R., Whitmore C.D., Gomez D.G., Eggertson M., Quigley W., Boardman A., Dovichi N.J., *Instrumentation for medium-throughput two-dimensional capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. *Anal. Chem.*, 79 (2007) 765-768.
202. Pugsley H.R., Swearingen K.E., Dovichi N.J., *Fluorescein thiocarbamyl amino acids as internal standards for migration time correction in capillary sieving electrophoresis*. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3418-3420.

203. Agirregabiria M., Blanco F.J., Berganzo J., Fullaondo A., Zubiaga A.M., Mayora K., Ruano-Lopez J.M., *SDS-CGE of proteins in microchannels made of SU-8 films*. *Electrophoresis*, 27 (2006) 3627-3634.
204. Herr A.E., Singh A.K., *Photopolymerized cross-linked polyacrylamide gels for on-chip protein sizing*. *Anal. Chem.*, 76 (2004) 4727-4733.
205. Anema S.G., *Effect of milk solids concentration on whey protein denaturation, particle size changes and solubilization of casein in high-pressure-treated skim milk*. *Int. Dairy J.*, 18 (2008) 228-235.
206. Anema S.G., *The use of "lab-on-a-chip" microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins*. *Int. Dairy J.*, 19 (2009) 198-204.
207. Sueyoshi K., Kitagawa F., Otsuka K., *Recent progress of online sample preconcentration techniques in microchip electrophoresis*. *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 2650-2666.
208. Breadmore M.C., Dawod M., Quirino J.P., *Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2008-2010)*. *Electrophoresis*, 32 (2011) 127-148.
209. Castro E.R., Manz A., *Present state of microchip electrophoresis: state of the art and routine applications*. *J. Chromatogr. A*, 1382 (2015) 66-85.
210. Wojcik R., Swearingen K.E., Dickerson J.A., Turner E.H., Ramsay L.M., Dovichi N.J., *Reaction of fluorogenic reagents with proteins I. Mass spectrometric characterization of the reaction with 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde, Chromeo P465, and Chromeo P503*. *J. Chromatogr. A*, 1194 (2008) 243-248.
211. Veledo M.T., Lara-Quintanr P., de Frutos M., Diez-Masa J.C., in Marina M.L., Rios A., Valcarcel M., *Fluorescence detection in capillary electrophoresis*, in *Analysis and detection by capillary electrophoresis*, Elsevier, Editor. (2005): Amsterdam. 305-374 (Cap. 6).
212. Wang Y., Bachman M., Sims C.E., Li G.P., Allbritton N.L., *Simple photografting method to chemically modify and micropattern the surface of SU-8 photoresist*. *Langmuir*, 22 (2006) 2719-2725.

Bibliografía

213. del Campo A., Greiner C., *SU-8: A photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography*. J. Micromech. Microeng., 17 (2007) R81-R95.
214. Grappin R., Ribadeau-Dumas B., *Advanced dairy chemistry*. Vol. 1: Proteins. (1992): Elsevier, Oxford.
215. Meier R.J., Steiner M.S., Duerkop A., Wolfbeis O.S., *SDS-PAGE of proteins using a chameleon-type of fluorescent prestain*. Anal. Chem., 80 (2008) 6274-6279.
216. Fournier T., Medjoubi-N N., Porquet D., *Alpha-1-acid glycoprotein*. Biochim. Biophys. Acta 1482 (2000) 157-171.
217. Balaguer E., Neuss C., *Glycoprotein characterization combining intact protein and glycan analysis by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry*. Anal. Chem., 78 (2006) 5384-5393.
218. Guttman A., Nolan J., *Comparison of the separation of proteins by sodium dodecyl-sulfate slab gel-electrophoresis and capillary sodium dodecyl-sulfate gel-electrophoresis*. Anal. Biochem. , 221 (1994) 285-289.

Anexo

