

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Monterrey

**“Bioensayos basados en la evaporación de gotas sobre un pilar
de Poli-metilmetacrilato”**

Tesis que Presenta:

Ruth Hernández Pérez

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias en:

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Dr. José Luis García Cordero

Apodaca, Nevo León, Octubre 2019.

Agradecimientos

Este proyecto fue realizado con el apoyo que CONACYT brinda a estudiantes de posgrado mediante su programa de becas nacionales.

Hoy que se cumple esta travesía llamada doctorado, a pesar de tropiezos y dificultades, agradezco a Dios por cumplirme el deseo, por acompañarnos en todo momento a mi hijo y a mí y poner en nuestro camino a las personas indicadas en el momento indicado.

A mi asesor por la oportunidad no solo de trabajar en su laboratorio, sino las oportunidades de interactuar en el ambiente profesional, mediante charlas, lecturas, estancias, congresos, siempre mirando por el crecimiento integral de sus estudiantes.

Encontré una nueva familia entre personas provenientes de diferentes partes, con diferentes gustos y formas de pensar, pero con quienes compartí la mesa de trabajo y también la de comida. Las conversaciones de temas científicos relacionados con los proyectos, pero también las anécdotas graciosas. Fueron seis años, parecían largos cuando le notifiqué a mi familia mi decisión. Hoy que se cumplen, es tiempo de volver con los míos, pero tengo el corazón dividido por los que dejo aquí, sé que en algún momento en este universo nos volveremos a encontrar, que cada uno tomará su camino y será de excelencia; Manolo y su contagiosa alegría, Roberto y su especial carisma, Alan mi compañero de inicio a fin, Oriana una gran amiga, Diana de carácter siempre sobrio, Rocío y su prudencia, Toño y su carisma, Missael y sus divertidas preguntas, y a todos aquellos que pasaron por el laboratorio. Samuel gracias por tu aportación en la parte electrónica de mi trabajo, Manolo y Roberto gracias por el entrenamiento en la parte biológica. A mis amigos Jorge Gaxiola, Ángel N., Dr. Jorge y Jautzi.

Agradezco a mi hijo por ser parte de la aventura en todo momento, mi motivación y compañía incondicional, al profesor Zambrano por ser mi mentor; a Teté, Beth, mi madre y abuela quienes son una inspiración y mi apoyo moral, a mi novio Óscar por su presencia aun en la distancia y por siempre creer en mí, todos ellos mi tesoro y mi familia.

Tabla de contenido

Agradecimientos	I
<u>Tabla de contenido</u>	<u>III</u>
Resumen	9
Abstract.....	11
1. Introducción	13
2. Marco teórico	17
2.1 Microfluídica abierta y energía de superficie	17
2.2 Tensión superficial en la Interfaz.....	17
2.2.1 Efectos de la temperatura en la tensión superficial	18
2.2.2 El efecto de surfactantes en la tensión superficial	19
2.3 Ángulo de contacto como indicador de la energía de superficie	20
2.4 La forma esférica como principio de mínima energía.	21
2.4.1 Forma de las gotas sobre una superficie de acuerdo con su volumen ...	21
2.4.2 Ley de Laplace en un campo de gravedad.....	23
2.4.3 Radio de curvatura de una gota	24
2.5 Ángulo de contacto de histéresis (ACH).....	24
2.6 Evaporación de gotas sésiles.....	24
2.6.1 Modos de evaporación; ángulo de contacto constante (ACC) y radio de contacto constante (RCC).....	25
3. Caracterización de gotas sobre un pilar de PMMA con borde rugoso.	29
3.1 Introducción	29
3.2 Objetivo.....	30
3.3 Marco teórico	30
3.3.1 Modificación de superficies para su uso en ensayos biomédicos.	30
3.3.2 Efecto de la rugosidad en el borde	31

3.3.3	Ángulos de contacto de avance, de recesión y de histéresis.....	31
3.4	Objetivo.....	32
3.5	Materiales y métodos.....	32
3.5.1	Fabricación de pilares.....	32
3.5.2	Medición del ángulo de contacto.....	32
3.5.3	Ángulo de contacto de histéresis en pilares.....	33
3.5.4	Tratamientos hidrofóbico e hidrofílico a la superficie.....	34
3.6	Resultados.....	34
3.6.1	Efectos de los parámetros de fabricación sobre la rugosidad de los pilares	34
3.6.2	Efecto de la superficie del pilar.....	35
3.6.3	Relación volumen vs diámetro del pilar.....	36
3.6.4	Efecto de la rugosidad del borde en el incremento de histéresis.....	38
3.6.5	Efecto de tratamientos hidrofóbico e hidrofílico al PMMA.....	38
3.7	Discusión de resultados.....	39
3.8	Conclusiones y perspectivas.....	40
4.	Evaporación de una gota sobre un pilar con borde rugoso.....	43
4.1	Introducción.....	43
4.2	Antecedentes.....	43
4.3	Justificación.....	45
4.4	Objetivos.....	46
4.5	Metodología.....	46
4.5.1	Arreglo experimental.....	46
4.5.2	Evaporación de soluciones.....	47
4.5.3	Análisis de imágenes.....	48
4.6	Resultados.....	49
4.6.1	Evaporación de gotas de diferentes volúmenes.....	49

4.6.2 Comparación del tiempo de vida de gotas bajo dos regímenes de evaporación	49
4.6.3 Evaporación limitada por difusión de diferentes sustancias.....	50
4.6.4 Modelo de evaporación de gotas ancladas a un pilar	53
4.7 Conclusiones y perspectivas.....	54
5. Desarrollo de una reacción enzimática con mezclado por corrientes de Marangoni bajo un régimen de evaporación limitado por transferencia.....	55
5.1 Introducción	55
5.2 Justificación	56
5.3 Objetivos.....	57
5.4 Antecedentes.....	57
5.4.1.....	58
Corrientes de Marangoni.....	58
5.4.2 Supresión de corrientes de Marangoni	59
5.4.3 Reacción química de glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano en la detección de glucosa	59
5.5 Materiales y métodos	60
5.5.1 Visualización de corrientes y efecto del ángulo de contacto	60
5.5.2 Visualización de corrientes y efecto de los regímenes de evaporación: limitado por difusión y limitado por transferencia.....	60
5.5.3 Reacción enzimática facilitada por corrientes de Marangoni	60
5.6 Resultados y discusión	61
5.6.1 Visualización de corrientes con perlas fluorescentes en gotas de diferente ángulo de contacto.....	61
5.6.2 Visualización de líneas de corriente dentro de la gota bajo dos regímenes de evaporación, limitado por tasa de transferencia y limitado por difusión, a diferentes ángulos de contacto.	63
5.6.3 Reacción enzimática facilitada por corrientes de Marangoni	65
5.7 Conclusiones y perspectivas.....	69

6. Desarrollo de una reacción de conjugación de BSA-BPB para la detección de albúmina mediante evaporación limitada por difusión.....	71
6.1 Introducción	71
6.1.1 Ensayo de detección de albúmina.....	71
6.2 Marco teórico	72
6.2.1 Gota en evaporación limitada por difusión y su uso en ensayos	73
6.3 Justificación	73
6.4 Objetivo.....	74
6.5 Metodología	74
6.5.1 Prueba de detección de albúmina en papel.....	74
6.5.2 Prueba de detección de albúmina en gotas.....	75
6.5.3 Medición de curva de calibración y cinética de reacción	75
6.6 Resultados.....	75
6.6.1 Detección de albúmina.....	75
6.6.2 Curva de calibración y cinética de reacción.....	77
6.7 Discusión	79
6.8 Conclusiones y perspectivas.....	81
7. Cultivo de células en gotas sobre pilares mediante la inhibición de la evaporación.	83
7.1 Introducción	83
7.2 Marco teórico	84
7.2.1 Separación mínima entre dos gotas para no ser afectadas por la evaporación de la gota vecina.....	84
7.2.2 Dinámica de evaporación de una gota en confinamiento	85
7.2.3 Adhesión celular en cultivos <i>in vitro</i>	87
7.3 Justificación	87
7.4 Objetivo.....	88
7.5 Métodos.....	88

7.5.1 Prueba de inhibición de evaporación.....	88
7.5.2 Fabricación del dispositivo con pilares para el cultivo celular en gotas...	89
7.5.3 Tratamientos físicos para mejorar la adhesión celular.....	90
7.5.4 Tratamientos químicos para mejorar la adhesión celular.....	90
7.5.5 Cultivo celular con método convencional.....	91
7.5.6 Obtención de células primarias	92
7.5.7 Siembra de células en pilar	92
7.6 Discusión de Resultados.....	93
7.6.1 Prueba de inhibición de evaporación.....	93
7.6.2 Dispositivo con pilares para el cultivo celular en gotas	95
7.6.3 Efectos de los tratamientos físicos (rugosidad) y químicos (plasma).....	96
7.6.4 Procedimiento para el cultivo de células en gotas sobre pilares de PMMA	98
7.6.5 Cultivo de células CHO-GFP en pilares de PMMA tratados con plasma y flujo de Aire.....	98
7.6.6 Cultivo de células THP-1, en pilares de PMMA sin tratamiento a superficie	99
7.6.7 Compatibilidad del pilar de PMMA con otras células	101
7.7 Discusión	102
7.8 Conclusiones y perspectivas.....	103
9. Conclusiones	105
10. Apéndices.....	109
Apéndice A	109
I. Área superficial de un casquete esférico	109
II. Modelo teórico de evaporación de gotas y corrientes de Marangoni ...	109
III. Métodos para calcular la tensión superficial	110
IV. Película precursora	111
V. Pipeteo; Dificultades en la succión de un líquido.....	111

VI. Trabajo de cohesión y adhesión; ecuación de Young-Dupre.....	112
VII. Evaporación de un líquido en un micropozo.....	113
Apéndice B	114
I. Efecto de rugosidad explicado por los Modelos de Cassie-Baxter y Wenzel.	
114	
Apéndice C	116
I. Efecto del tamaño del pilar (diámetro) en el tiempo de evaporación de la gota.....	116
Apéndice D	118
I. Reacción de conjugación de BSA a cromógeno en gotas.....	118
II. Prueba de detección de BSA en papel y en superficie plana de PMMA	
119	
Apéndice E	121
I. Desplazamiento de células muertas hacia el centro del pilar	121
11. Bibliografía.....	123

Resumen

Este proyecto se basa en el desarrollo de ensayos de interés biológico y clínico a partir de los fenómenos físicos que ocurren en las gotas, su interacción con el sustrato y su evaporación. Poniendo especial interés en el ángulo de contacto y la fuerza de anclaje de una gota a un pilar de poli-metilmetacrilato (PMMA) de borde rugoso fabricado mediante micromaquinado.

Se describen dos regímenes de evaporación de gotas sobre estos pilares: 1) limitado por la transferencia de moléculas de agua de la fase líquida a la fase vapor y, 2) añadiendo a este paso el de la difusión de estas moléculas. Posteriormente se realizan pruebas de detección de interés clínico. Al introducir un gradiente térmico y un flujo de aire direccionado se aumentan la tasa de evaporación y las corrientes facilitando una reacción enzimática para un ensayo de detección de glucosa por colorimetría. El movimiento es detenido más adelante por la alta viscosidad del fluido que contiene los productos de la reacción. También se realizó un ensayo de detección de albúmina mediante una reacción de conjugación que produce un cambio de color usando un mecanismo de evaporación limitado por difusión. La reducción del volumen por la evaporación favorece el encuentro de moléculas y la correspondiente concentración de color. Posteriormente se desarrolla una metodología para inhibir la evaporación con la finalidad de llevar a cabo cultivos celulares en gotas de volúmenes de microlitros, comprobando que el material es compatible con varios tipos de células.

Abstract

This project concerns about the development of biological and clinical assays based on the physical phenomena occurring inside droplets, their interaction with substrate and evaporation. With special interest in the contact angle and the pinning force of a drop to a rough-border polymethylmethacrylate (PMMA) pillar manufactured by micromachining.

Two droplet evaporation regimes on these pillars are described; 1) limited by the transfer of molecules from the liquid phase to the vapor phase and, 2) adding the diffusion of these molecules. Subsequently, detection assays of clinical interest are performed. By introducing a thermal gradient and a directed air flow, the evaporation rate and the currents are increased by facilitating an enzymatic reaction in a colorimetry glucose detection assay. The movement is stopped later by the increased viscosity of the fluid containing the reaction products. An albumin detection assay was also performed by conjugation reaction that produces a color change using a diffusion-limited evaporation mechanism. The volume reduction by evaporation work out well for the match of molecules and the corresponding color concentration. Also, a methodology is developed to inhibit evaporation in order to carry out cell cultures in microliter volumes droplets, verifying that PMMA-pillars are compatible with several types of cells.

1. Introducción

Las gotas comenzaron a ser estudiadas desde hace más de dos siglos, cuando Thomas Young (1805) y Pierre-Simon Laplace (1806) demostraron experimentalmente la importancia del ángulo de contacto (AC) que forma un líquido al entrar en contacto con una superficie con su capacidad para mojar dicha superficie. Los principales estudios de gotas se han desarrollado en áreas de ingeniería química (1, 2), física (3), ingeniería mecánica (4, 5), bioingeniería (6), ciencias de materiales (7), y más recientemente, en áreas como la medicina (8, 9), bioquímica (10), farmacología (11), y ciencias ambientales.

En estudios del área de bioquímica, las gotas asentadas sobre un sustrato sólido abarcan rangos de volúmenes de nano a microlitros y ofrecen versatilidad, requieren de equipos menos sofisticados para su funcionamiento pues aprovechan fenómenos físicos que surgen naturalmente. La evaporación de gotas se ha empleado en la concentración de analitos, separación y clasificación de partículas, ensayos basados en células y amplificación de ácidos nucleicos (12). Como herramienta de diagnóstico clínico son una excelente opción para la miniaturización de ensayos biológicos, favoreciendo la reducción de consumo de reactivos y tiempo, y aprovechando propiedades físicas inherentes a las gotas.

Energéticamente la formación del ángulo de contacto (AC) de una gota sobre una superficie es un fenómeno complejo y éste adquiere un mayor grado de complejidad cuando agregamos variables físicas que lo modifican. Una de las variables más importantes que es tema de estudio actualmente de diversos grupos es la física de la evaporación de las gotas. Adicionalmente, características como el fluido o mezcla de fluidos que lo componen, la atmósfera que las rodea, la presencia de partículas y coloides, han impulsado a la comunidad científica al desarrollo de investigaciones que han permitido tener bases teóricas sólidas sobre las propiedades físicas que las rigen.

Hasta el momento se sabe que una gota en una superficie plana ya sea lisa o texturizada, puede adoptar diferentes configuraciones dependiendo de las características del líquido y el sustrato (7, 13). El ángulo que se forma entre las

interfases sólido-líquido y líquido-gas, así como la interacción de la línea de contacto se han encontrado con efecto en el modo de evaporación, y a su vez, esto se ha relacionado con movimientos dentro de la gota que arrastran partículas suspendidas formando patrones característicos durante la evaporación (14, 15).

Estudios desarrollados con gotas sobre diversos tipos de sustratos y con distintos fluidos, puros y complejos, han sido reportados (2–4, 6, 7, 13–15). Sin embargo, todos estos estudios se han realizado sobre superficies planas modificadas química o físicamente con diferentes tratamientos para lograr esos propósitos. Las metodologías reportadas en estos artículos tienen un grado de complejidad que puede ser simplificado mediante el uso de un pilar micro maquinado en polímero. Sin embargo, al cambiar las características del sustrato cambian otras variables físicas y por lo tanto es necesario conocer estos cambios. El movimiento de corrientes internas, la tasa de flujo de vapor alrededor de la gota, y la dinámica de deposición de partículas sobre un pilar, representan un área de oportunidad pues no se han encontrado reportes de estos fenómenos que los comparen con estudios similares en superficies planas.

En este proyecto se estudian algunas diferencias entre el uso de la superficie de un pilar frente a su correspondiente superficie plana infinita, así como los efectos de la rugosidad de los bordes de los pilares empleados. Las ventajas de esta física se aprovechan en la aplicación de diferentes técnicas para el diagnóstico y el desarrollo de ensayos biomédicos. Se realizan cuatro pruebas de concepto donde se aprovechan las diferentes formas de evaporación y las corrientes internas que éstas provocan. Finalmente se desarrolla una metodología para inhibir la evaporación con la finalidad de llevar a cabo cultivos celulares.

En todos los casos, la intención es aprovechar al máximo las características físicas implícitas en las gotas de volúmenes de microlitros, reduciendo el número y complejidad de pasos, tanto en la fabricación como en el desarrollo de los diferentes bioensayos, permitiendo así que estos métodos sean utilizados bajo condiciones que no requieren de una alta inversión. La tesis se encuentra estructurada de la siguiente manera; un marco teórico donde se definen los principales conceptos involucrados en el comportamiento de las gotas. Más adelante, las caracterizaciones de, el pilar, la evaporación y los tres diferentes ensayos, se presentan como capítulos independientes, cada uno con su introducción, objetivos

particulares, metodología, resultados y conclusiones. Algunos detalles adicionales son explicados al final en forma de apéndices.

2. Marco teórico

Los fenómenos físicos aprovechados para el desarrollo de bioensayos en este proyecto tienen su fundamento en aspectos moleculares que no se estudian directamente en el presente trabajo, pero que es necesario conocer para entender los fenómenos observados a nivel macroscópico. A continuación, se describen algunos conceptos físicos de importancia y sus correspondientes modelos.

2.1 Microfluídica abierta y energía de superficie

Nuevas formas de microfluídica han surgido a través del conocimiento de las fuerzas capilares al notar que no es indispensable confinar los líquidos entre paredes sólidas, sino que se puede hacer uso de la energía de superficie a través de rieles (16), postes (17), gotas suspendidas en alambres (18), puentes líquidos (19, 20), a lo que se ha llamado microfluídica abierta o microfluídica de paredes virtuales.

La energía de superficie se define como el trabajo requerido para construir una unidad de área de una superficie dada (21), existen diferentes teorías desarrolladas pero que difieren en cuanto a derivaciones y convenciones, así como al número de componentes o parámetros empleados para su análisis. La energía de superficie total de sólidos y líquidos depende de diferentes tipos de interacciones moleculares (Van der Waals, polar e interacciones ácido/base) y es considerada ser la suma de esos componentes independientes.

2.2 Tensión superficial en la Interfaz

La interfaz es la frontera entre dos fluidos, es más compleja que una línea ya que depende de las interacciones entre las moléculas de cada fluido así como de la difusión browniana o agitación térmica. Estas interacciones son principalmente de Van der Waals para líquidos orgánicos, y de puentes de hidrógeno para sustancias acuosas. En el bulto, una molécula está en contacto con otras 4 moléculas en el caso del agua o 12 en el caso de moléculas simples (22). En la interfaz este número está dividido por 2, además, debido a la baja densidad de los gases, hay una menor interacción entre ambas fases y la atracción entre moléculas es débil a diferencia de

aquellas que se encuentran en el bulto del líquido. Como resultado, en una interfaz hay una falta de simetría local en las interacciones, lo cual resulta en exceso de energía de superficie a la que se atribuye el fenómeno de tensión superficial. La tensión superficial del agua es de 72.8 mJ/m^2 (23).

2.2.1 Efectos de la temperatura en la tensión superficial

La tensión superficial es una función lineal de la temperatura (**Figura 2.1**) y se puede determinar a partir de la densidad, la masa molar y la temperatura crítica del líquido analizado. Esta aproximación se cumple para la mayoría de los líquidos conocidos (Ec. 1) (24).

$$\gamma = \gamma^* \left(1 - \frac{T}{T_c}\right)^n \quad (1)$$

Donde γ^* representa la tensión superficial característica de cada sustancia, T la temperatura y T_c la temperatura crítica, el exponente n para compuestos orgánicos es igual a $11/9$ (aproximadamente 1). Se puede calcular el cambio en la tensión superficial mediante la ecuación de Eötvös, donde se consideran una temperatura y tensión superficial de referencia indicada con el subíndice 0 (Ec. 2):

$$\gamma^* = \gamma_0 \frac{T_c - T_0}{T_0} \quad (2)$$

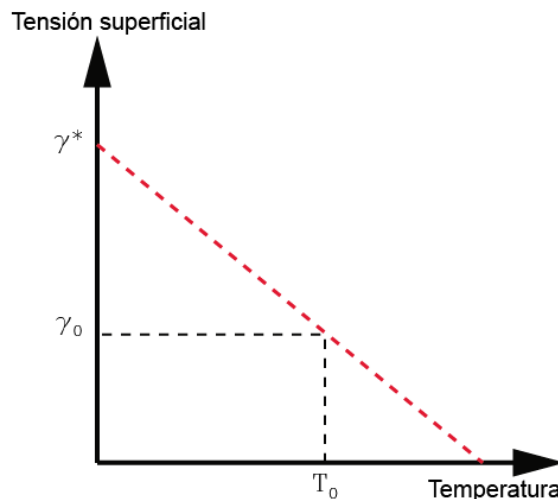


Figura 2.1: Representación de la relación entre tensión superficial y temperatura, de donde deriva la ecuación de Eötvös.

La relación entre temperatura y tensión superficial puede dar como producto lo que conocemos como convección de Marangoni por inestabilidad termocapilar. De esta manera, si una interfaz es localmente calentada se producirá un gradiente de tensión superficial y un desbalance de fuerzas tangenciales creando un movimiento del fluido, que va desde la región más cálida (de menor tensión superficial) hacia la región más fría (de mayor tensión superficial) como se esquematiza en la **Figura 2.2**. Este movimiento es propagado hacia el bulto, tendiendo a homogeneizar la temperatura. El movimiento gradualmente se detiene, pero si la diferencia de temperatura se mantiene también el movimiento será permanente (25).

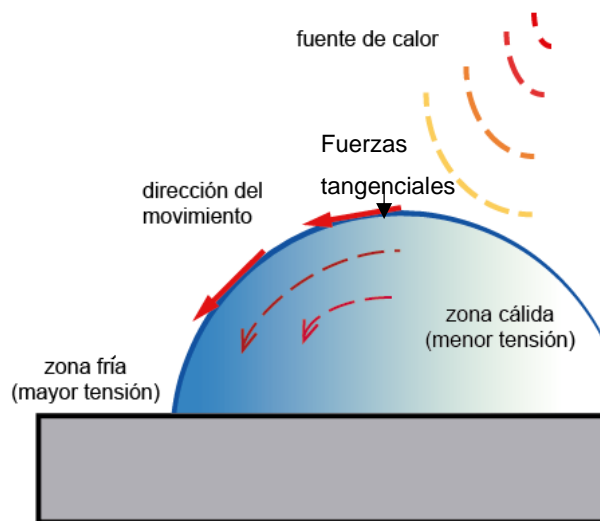


Figura 2.2: Movimientos de tipo Marangoni por efecto de gradiente termocapilar.

2.2.2 El efecto de surfactantes en la tensión superficial

Los surfactantes son frecuentemente utilizados en muestras biológicas con la finalidad de prevenir que se adhieran a las superficies o evitar la formación de agregados durante los ensayos biológicos. Cuando las moléculas de surfactante alcanzan la interfaz son capturados debido a su naturaleza anfifílica (cadenas hidrofóbicas con cabeza hidrofílica) previniendo que escapen fácilmente, como consecuencia se reduce la tensión superficial del líquido en función lineal de la concentración (26, 27). De la misma manera en que lo hace un gradiente de temperatura, un gradiente de concentración resulta en un flujo convectivo que se dirige hacia la parte de mayor tensión. Las diferencias en la tasa de evaporación

local de soluciones o mezclas también producen gradientes de concentración (**Figura 2.3**).

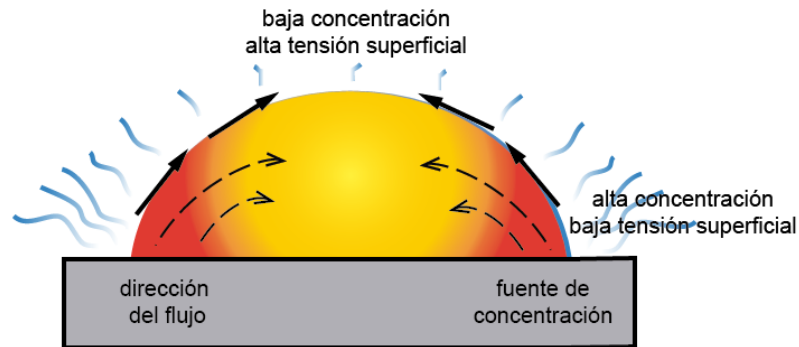


Figura 2.3: Movimiento de Marangoni por efecto de gradiente de soluto.

La presencia de micro o nano partículas, dependiendo de la concentración y naturaleza de éstas, puede modificar considerablemente la tensión superficial y al mismo tiempo el ángulo de contacto (AC) debido a las interacciones partícula-líquido y partícula-partícula de manera similar a la que lo hace la presencia de surfactantes u otros componentes en la solución (25).

2.3 Ángulo de contacto como indicador de la energía de superficie

El ángulo de contacto (AC) es una medida de la interacción entre un líquido y una superficie sólida, refleja el balance de fuerzas de cohesión (entre moléculas del líquido) y adhesión (entre moléculas del líquido y la superficie).

La energía de superficie es la cantidad de fuerza intermolecular creada en la superficie de un material y determina la cantidad de fuerza atractiva o repulsiva que una superficie puede ejecutar sobre otro material. Una superficie altamente mojable tiene una elevada energía de superficie que crea una fuerza lo suficientemente atractiva para provocar que el líquido se extienda sobre ella. Esta energía de superficie es mayor que la tensión superficial de las moléculas del líquido encargadas de mantener la forma esférica de la gota.

Un sólido no será mojado completamente si el valor de tensión superficial no está por arriba de un valor crítico. Zisman (26) estableció una conexión empírica

entre el coseno del ángulo de contacto y la tensión interfacial al medir el ángulo de contacto de diferentes líquidos, observando una aproximación lineal.

2.4 La forma esférica como principio de mínima energía.

Existen teoremas de la esfera los cuales describen el comportamiento de una gota con forma de casco esférico de acuerdo con la superficie con la que se encuentra en contacto, bien sea esta plana, cóncava o en un ángulo de intersección (28).

Si la gota es de tamaño menor a una longitud característica, la gota adoptará la forma de un casquete esférico en superficies hidrofóbicas e hidrofílicas. Si se encuentra entre dos planos para un ángulo de contacto (AC) dado hay solo una distancia de separación entre dos placas para que se cumpla la esfericidad (**Figura 2.4**) (29).

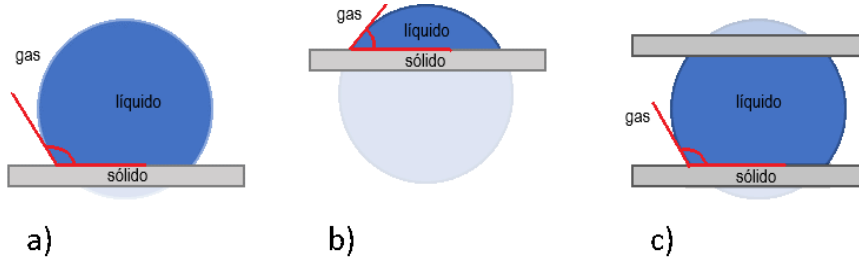


Figura 2.4: La gota tiende a adoptar la forma esférica independientemente de su posición respecto al sustrato, a) superficie hidrofóbica con forma semiesférica, b) superficie hidrofílica con forma semiesférica y c) gota constreñida entre dos superficies con forma semiesférica.

2.4.1 Forma de las gotas sobre una superficie de acuerdo con su volumen

El ángulo de contacto (AC) refleja el balance de fuerzas donde γ_{LG} representa la tensión en la interfaz líquido-gas, γ_{SL} la tensión en la interfaz sólido-líquido y γ_{SG} en la interfaz sólido-gas (Ec. 3).

$$\frac{1}{2} \Delta \rho g a^2 + \gamma_{LG} - (\gamma_{SL} + \gamma_{LG}) = 0 \quad (3)$$

Las gotas pequeñas (de volúmenes de pico, nano hasta unos cuantos microlitros) serán esféricas, pero si el mismo líquido sobre la misma superficie horizontal se presenta en gotas grandes (mililitros) éstas tendrán forma aplanada.

Debido al balance entre gravedad y tensión superficial, las gotas pequeñas son dominadas solo por la tensión superficial. El salto en esta escala es denominado “capillary length” o longitud característica, y representa la razón entre la presión de Laplace y la presión hidrostática (30),

$$\frac{\Delta P_{Laplace}}{\Delta P_{Hidrostatica}} = \frac{\gamma}{\Delta p g}, \quad (4)$$

Si las dos presiones son del mismo orden, entonces;

$$l = \sqrt{\frac{\gamma}{\Delta p g}} \quad (5)$$

Donde γ es la tensión superficial (N/m), l la longitud capilar (m), Δp la diferencia de presión (N/m²) y g la gravedad (m/s²). A partir de la ecuación anterior se puede derivar el número de Bond el cual nos indica si la gota será o no afectada por la gravedad:

$$B_0 = \frac{\Delta p g R^2}{\gamma} \quad (6)$$

Donde R es una dimensión característica, usualmente el radio o altura de la gota. Si $B_0 \ll 1$, la gota será esférica, en caso contrario las fuerzas gravitacionales la achatarán. La longitud capilar se encuentra alrededor de los 2 mm para la mayoría de los líquidos incluyendo el mercurio, mientras que la altura de gotas grandes es menor a los 4 mm (**Figura 2.5**) (29). Si se trata de una gota en forma de casquete esférico se simplifica el cálculo del volumen, ya que depende solamente de las variables radio de contacto a (m), radio de la gota R (m), altura h (m) y ángulo de contacto de Young θ , aplicando para cualquiera de los casos hidrofílico o hidrofóbico.

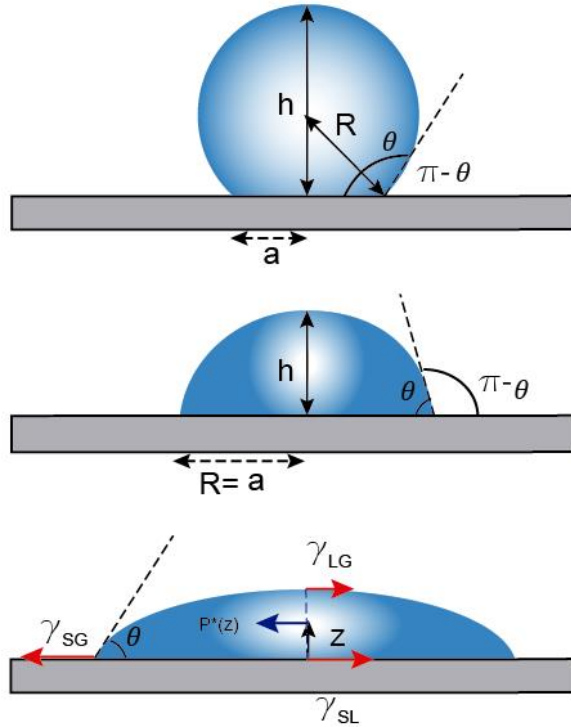


Figura 2.5: El ángulo de contacto refleja el balance de fuerzas, donde γ_{LG} representa la tensión en la interfaz líquido-gas, γ_{SL} la tensión en la interfaz sólido-líquido y γ_{SG} en la interfaz sólido-gas. El esquema representa gotas en superficies de diferente grado de mojabilidad, a mayor hidrofobicidad, mayor ángulo de contacto.

Caso hidrofóbico:

$$h = R + R \cos(\pi - \theta) = R(1 - \cos \theta) \quad (7)$$

Caso hidrofílico:

$$h = R + R \cos \theta = R(1 + \cos \theta) \quad (8)$$

2.4.2 Ley de Laplace en un campo de gravedad

La longitud capilar $l(m)$ es una altura característica de la capilaridad en presencia de gravedad, dada por la expresión

$$l = \sqrt{\frac{\gamma}{\rho g}} \quad (9)$$

Donde, γ es la tensión superficial líquido-vapor, ρ es la densidad del líquido y g la gravedad. Cuando una gota es lo suficientemente grande para ser deformada por la gravedad la presión hidrostática entra en consideración, $P_1 = P_2 - \rho g z$, donde la presión atmosférica fuera de la gota (P_2) se considera constante, z es la dirección

vertical orientada hacia arriba y g la fuerza gravitatoria. La ley de Laplace se expresa de acuerdo con la ecuación:

$$\gamma \left(\frac{2}{R} \right) = P_2 - \rho g z \quad (10)$$

2.4.3 Radio de curvatura de una gota

El radio de curvatura se considera positivo o negativo dependiendo de su orientación, si es convexo o cóncavo respectivamente. Este se refiere a la tasa de cambio de la dirección del ángulo del vector tangente con respecto a la longitud de arco. Para una esfera, la curvatura media es igual a $1/R$ mientras que para una superficie plana es igual a 0. La presión dentro de una gota pequeña es mayor a la de una gota de mayor tamaño (31).

En el caso de gotas deformadas por la gravedad existen dos radios de curvatura y el cálculo de la presión es más complejo, la curvatura en la parte alta de la gota es menor que en la base.

2.5 Ángulo de contacto de histéresis (ACH)

El ángulo de contacto de una microgota sobre una superficie puede abarcar un rango de valores debido a un anclaje de la línea de contacto que impide que las fuerzas capilares lo lleven a su ángulo de contacto de equilibrio. La diferencia entre el ángulo máximo y el mínimo de este rango se le conoce como ángulo de contacto de histéresis (ACH). Las fuerzas que previenen el movimiento de las gotas están relacionadas con el estado químico o geométrico de la superficie, como pueden ser la presencia de pequeñas partículas, defectos de superficie o residuos producto químicos.

2.6 Evaporación de gotas sésiles

Se conoce como gotas sésiles a las gotas asentadas sobre un sustrato sólido al aire libre donde esta se encuentra susceptible a evaporación. Durante la evaporación existen al menos tres eventos: 1) moléculas de agua líquida escapando de la superficie a la fase vapor, 2) difusión de estas moléculas lejos de la superficie de la gota y 3) el retorno de moléculas en fase vapor hacia la fase líquida (**Figura 2.6**). La evaporación de líquido se asocia fuertemente con la difusión de vapor lejos

de la interfaz líquido-gas (asumiendo que no existe convección de tipo Marangoni dentro de la gota ya que esta incrementa la tasa de evaporación) (32) y que el gas circundante se encuentra en reposo.

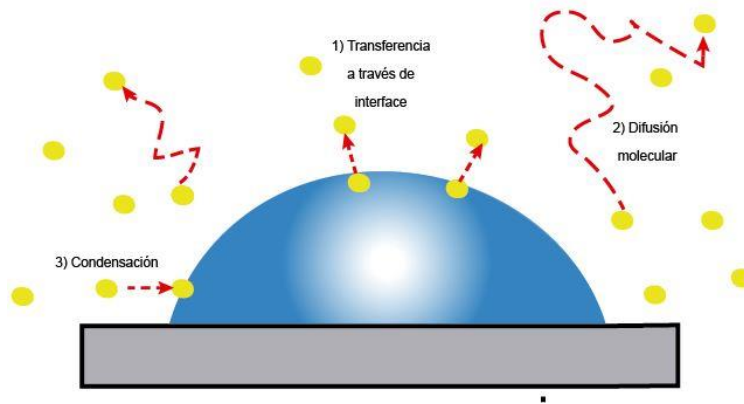


Figura 2.6: Eventos durante la evaporación.

La evaporación es la pérdida de masa de agua, la cual está dada por el flujo neto de moléculas en la gota que pasan a la fase vapor. Si el gas está saturado con vapor (en el punto de rocío del agua) la evaporación es detenida, debido a que se llega a un equilibrio donde el número de moléculas que escapan de la interfaz es el mismo que regresa a ella por condensación (33).

2.6.1 Modos de evaporación; ángulo de contacto constante (ACC) y radio de contacto constante (RCC).

Experimentalmente se ha observado que las gotas en superficies hidrofílicas ($AC < 90^\circ$) e hidrofóbicas ($AC > 90^\circ$) no se evaporan de la misma manera (34–37). En superficies hidrofóbicas lisas mantienen un ángulo constante (ACC) mientras su radio de contacto se reduce durante la evaporación. En superficies hidrofílicas el radio de contacto permanece constante (RCC), mientras el ángulo de contacto decrece gradualmente hasta un valor de recesión en la parte final del proceso (Figura 2.7).

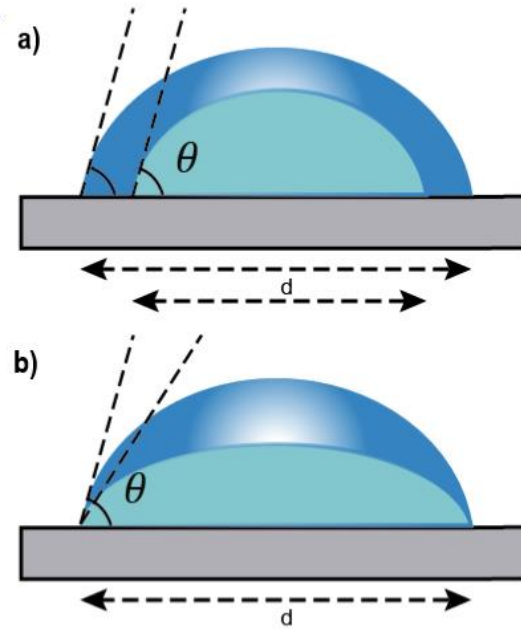


Figura 2.7: Modos de evaporación: a) En un modo ACC el radio de contacto decrece con el volumen mientras el ángulo permanece constante, b) en el modo RCC el ángulo de contacto decrece con la evaporación mientras el radio de contacto se mantiene.

En superficies hidrofóbicas la tasa de pérdida de masa es proporcional a la altura de la gota, mientras que en hidrofílicas, es proporcional al cuadrado del radio de contacto (32).

De acuerdo con Hu-Larson (38) se considera que el flujo de evaporación es radialmente uniforme excepto en la zona cerca de la triple línea. Este efecto causa un flujo Marangoni que crea una forma de toroide convectivo axisimétrico, donde los casos hidrofílico e hidrofóbico deben ser evaluados de manera diferente (**Figura 2.8**).

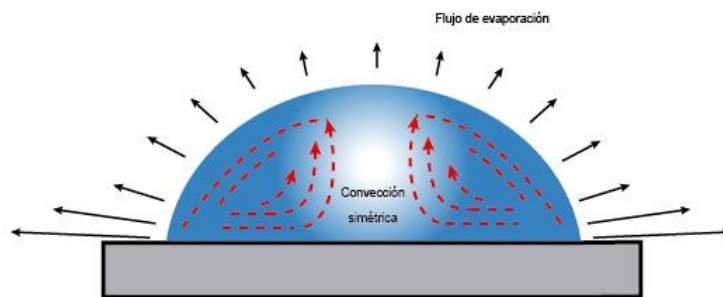


Figura 2.8: Flujo de evaporación a lo largo de la superficie de acuerdo con Hu.

La tasa de variación en el volumen puede estimarse al medir la variación de la altura de la gota h , o en su caso del radio de la gota r , a través el tiempo t (36). Usando el valor del coeficiente de difusión del vapor en el gas circundante λ (m^2/s), disponible en tablas, a las condiciones de presión y temperatura correspondientes (23).

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\delta V}{dt} \frac{dr}{dt} = -\lambda h \quad (14)$$

El anclaje de la línea de contacto previene el encogimiento de la gota, lo que implica una huella o radio constante (39).

2.7 Conclusiones

Bajo las condiciones correctas las gotas pueden servir como recipientes de reacción. Considerando los principios antes mencionados las gotas no deben ser demasiado grandes para no ser afectadas por la gravedad, de esta manera, al asumir una forma de casco esférico, el volumen de la gota y su superficie disponible para evaporación pueden ser fácilmente calculadas conociendo su altura y radio, a partir de imágenes del perfil. Al modular los gradientes de tensión superficial, se puede aprovechar el movimiento del fluido, proveyendo un mezclado convectivo.

Debido a los efectos de la interacción molecular se debe considerar la naturaleza de las soluciones y del sustrato sólido a emplear, pues de estos dependerá la forma de la gota y su evolución durante la evaporación. La evaporación puede ser acelerada o retrasada mediante la variación de la concentración de las moléculas de vapor alrededor de la gota. Los modos de evaporación se han estudiado categorizando superficies hidrofílicas e hidrofóbicas, ya que el confinamiento de vapor y encogimiento de la línea de contacto durante la evaporación de la gota tienen un efecto significativo.

Sin embargo, la adhesión de la línea de contacto de la gota puede aumentarse mediante el uso de rugosidad (si la naturaleza de éste es hidrofílica). Todas las características mencionadas pueden aprovecharse en el desarrollo de un modelo teórico reduciendo el número de variables respecto a modelos ya existentes para predecir la tasa de evaporación.

3. Caracterización de gotas sobre un pilar de PMMA con borde rugoso.

Se detallan las diferencias que se logran en cuanto a ángulo de contacto y volumen que se puede contener sobre la superficie de un pilar comparándola con una superficie infinita. Se prueban diferentes tipos de soluciones como agua, plasma, PBS, medio de cultivo celular. Además, se introduce la variable de temperatura y humedad controlada.

3.1 Introducción

Por convención el ángulo de contacto está definido por la ecuación de Young para una superficie idealmente lisa, químicamente homogénea, no reactiva, no deformable y horizontal, ya que cualquier inclinación puede ser susceptible a la gravedad y dar una desviación del ángulo de contacto de equilibrio. Las mediciones no son necesariamente reproducibles en una superficie plana cuando hay heterogeneidades físicas o químicas, y una sola medición puede fallar en proveer importante información de la interacción sólido-líquido (40, 41).

Por otro lado, las superficies pueden ser modificadas por diversos métodos con la finalidad de obtener elevados ángulos de contacto, haciéndolas más hidrofóbicas mediante la generación de rugosidad. Esto generalmente mejora el deslizamiento de la gota pues no hay anclaje (baja histéresis), característica que es usada para concentrar una solución al evaporar una gota. Por el contrario, si se consigue anclaje (alta histéresis), será con bajos ángulos de contacto, lo que favorecerá la formación de anillos (42).

Diversos polímeros y otros materiales han sido empleados para el estudio de gotas como poliestireno (PS), policarbonato (PC), PDMS, teflón (PTFE), vidrio, y otros. El poli-metilmacrilato (PMMA) también conocido como acrílico, es un material comúnmente utilizado en la fabricación de dispositivos microfluídicos, debido a sus propiedades ópticas y mecánicas principalmente (43). El PMMA es un polímero el cual posee excelentes propiedades para su uso en dispositivos biomédicos, incluyendo biocompatibilidad, transparencia óptica, resistencia a

ambientes húmedos, elevada razón fuerza/peso. Además, con prolongada exposición o inmersión en agua no se afectan sus propiedades ópticas o mecánicas. El PMMA no es afectado por la mayoría de las soluciones químicas usadas en el laboratorio, como detergentes, ácidos inorgánicos diluidos, álcalis e hidrocarburos alifáticos. Sin embargo, no deben emplearse hidrocarburos aromáticos o clorados, ésteres o cetonas (44). Es fácil de maquinar mediante serrado, trituración, fresado, grabado con herramientas de carburo de tungsteno (44).

3.2 Objetivo

Estudiar el efecto de la rugosidad en un pilar de PMMA en cuanto al ángulo de contacto e histéresis. Con esto se pretende posteriormente aprovechar ciertos fenómenos físicos que nos dan el alto ángulo de contacto que se presenta en superficies hidrofóbicas, y el radio de contacto constante presentado en superficies hidrofílicas combinados, reduciendo en lo posible el número y complejidad de pasos para la fabricación de dispositivos útiles en la realización de ensayos biológicos.

3.3 Marco teórico

3.3.1 Modificación de superficies para su uso en ensayos biomédicos.

Diversos grupos han trabajado en la modificación del PMMA para hacerlo un material hidrofóbico mediante la formación de micro y nano estructuras (45, 46), o mediante la reorientación de los grupos funcionales de las cadenas del polímero (47) aunque esto puede alterar otras características del material como la transparencia y la interacción con otras moléculas. Las superficies hidrofóbicas presentan en general una baja adhesión con los líquidos, por lo que las gotas se pueden desplazar de un sitio a otro a lo largo de la superficie (48). Una forma de evitar que las gotas se desplacen de su sitio es manteniendo la línea de contacto fija mediante la formación de patrones con zonas hidrofílicas en una superficie hidrofóbica. Aunque con esto se logra el anclaje de la gota, no permite ángulos de contacto muy altos, además de que el procedimiento de fabricación en sí es un tanto complejo (49).

3.3.2 Efecto de la rugosidad en el borde

Wang y Hu (50) estudiaron por dinámica molecular el anclaje y desanclaje de nanogotas en superficies texturizadas bajo dos modos de evaporación: radio de contacto constante (RCC) y ángulo de contacto constante (ACC). Demostraron que el anclaje tiene un origen de interacción molecular líquido-sólido localizada en la cercanía de la línea de contacto y que ésta domina el comportamiento de mojabilidad. Concluyendo que la rugosidad genera una interacción de fuerzas desbalanceada donde, si la heterogeneidad física tiene un ancho característico mayor a unos pocos diámetros de la molécula líquida, la línea de contacto será anclada en las primeras etapas de evaporación a una superficie hidrofílica. Cuando se tiene una superficie texturizada o con patrones de diferente hidrofobicidad, las características geométricas de estos determinarán la fuerza de anclaje y la mojabilidad de la superficie por el líquido en cuestión (48).

El ángulo de contacto y estado de gotas sobre superficies texturizadas está descrito por las ecuaciones de Cassie-Baxter (1944) y Wenzel (1936) las cuales han sido empleadas desde hace varias décadas. En ellas se puede predecir que la rugosidad reduce el anclaje a una superficie cuando la naturaleza química de esta es hidrofóbica y lo aumenta cuando es hidrofílica, alterando el ángulo de contacto, así como en la histéresis (ver Apéndice BI). Recientemente se ha encontrado que dichas ecuaciones fallan en algunos casos ya que no toman en cuenta algunas consideraciones, y que es la histéresis y no la hidrofobicidad en sí la que determina el valor del ángulo de contacto (50-52).

3.3.3 Ángulos de contacto de avance, de recesión y de histéresis

Un ángulo de contacto de avance es aquel que se mide cuando una gota sésil tiene el máximo volumen permisible para el área interfacial sólido-líquido, cualquier adición de líquido hará que la gota se expanda permitiendo el avance de la línea de contacto a un área mayor (**Figura 3.1a**). El ángulo de recesión es lo opuesto, si el líquido es removido de la gota, el área interfacial sólido-líquido decrecerá (**Figura 3.1b**). En otras palabras, el ángulo de avance es el máximo ángulo posible mientras que el de recesión es el mínimo posible para una determinada área de superficie mojada. La diferencia entre estos dos ángulos es lo que se conoce como ángulo de

contacto de histéresis y está relacionado con los mecanismos de anclaje y desanclaje de la línea de contacto durante la evaporación de gotas (53).

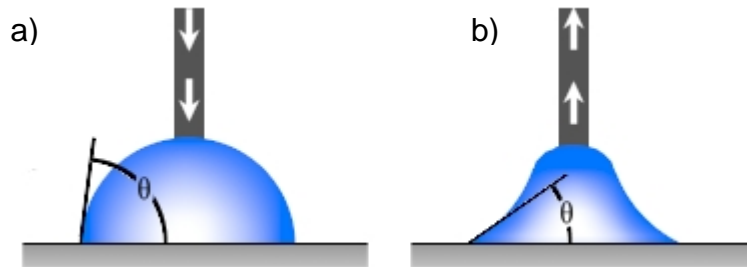


Figura 3.1: Esquema de método de medición de los ángulos de a) avance y b) recesión, mediante la adición y remoción de líquido.

3.4 Objetivo

Analizar cualitativamente el efecto de la rugosidad irregular, la histéresis y el volumen máximo de gotas en pilares milimétricos de polimetilmetacrilato (PMMA) con gotas de volúmenes de microlitros.

3.5 Materiales y métodos

3.5.1 Fabricación de pilares

Placas de polimetilmetacrilato (PMMA) plexiglás de 1.5 mm de grosor fueron maquinadas con una fresadora de control computarizado (Roland MODELA MDX-40) y brocas de carburo de tungsteno de 0.8 mm de diámetro (MexTronics Zanco 1/8") a dos velocidades: 4500 y 6500 rpm, velocidad en x, y, z de 2 mm/s con paso de 0.1 mm, hasta obtener una altura del pilar de al menos 0.4 mm. Los diseños fueron realizados en el programa Dr. Engrave. Los dispositivos fueron manipulados con guantes para evitar contaminación. Se retiraron rebabas con gas N₂. Las imágenes de microscopia electrónica fueron adquiridas con un microscopio de barrido electrónico (SEM) Hitashi SU5000 a 2000 X con una energía de 1 KV.

3.5.2 Medición del ángulo de contacto

El espacio experimental se mantuvo a una humedad relativa de 50% y una temperatura de 25 °C para mediciones de referencia en pilares. Para los experimentos a 37°C se calentaron las soluciones en incubadora por 20 min previamente, y el sustrato se mantuvo sobre una plancha con calentamiento. La

temperatura fue monitoreada con ayuda de un sensor de humedad y temperatura (FSH75, Sensirion, USA). Para la captura de imágenes del perfil de la gota se utilizó un Microscopio Digital (Dino Capture 2.0, AM2111 Dino-Lite Basic USB, 3 MP, 640x480). Las imágenes fueron analizadas con ayuda del plugin LB-ADSA de ImageJ, basado en un ajuste de la ecuación de Young-Laplace (Ec. 1). Para cuantificar el volumen de la gota soportada por cada diámetro de pilar se pipeteó una cantidad conocida del líquido y se adicionó lentamente más líquido sobre esta gota hasta su derramamiento tomando el máximo volumen antes de que este se presentara.

3.5.3 Ángulo de contacto de histéresis en pilares

Se utilizó una pipeta con una punta modificada de diámetro interno reducido a 200 μm , esto aumenta la resistencia del líquido y ayuda a tener mejor control con el flujo. Se montó la pipeta con ayuda de un soporte de manera vertical sobre el pilar (**Figura 3.2**), se inyectó volumen a la gota y posteriormente se succionó, videos del proceso fueron grabados y posteriormente analizados para obtener el mayor ángulo de contacto antes del derramamiento y el menor ángulo de contacto antes del desanclaje y relajamiento de la gota.

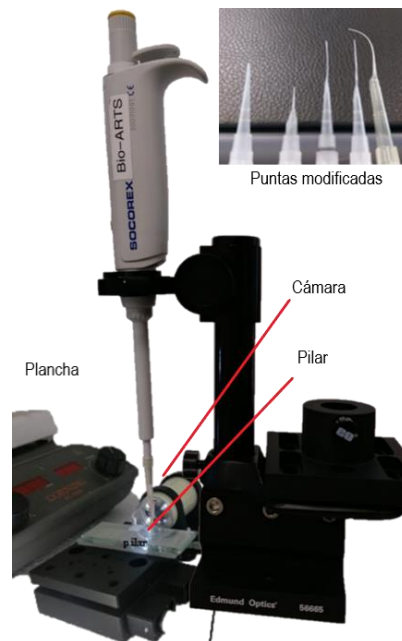


Figura 3.2: Montaje experimental para medición de ángulos de avance y recesión. En el recuadro se muestran las puntas de pipeta modificadas para reducir el diámetro a la salida del líquido.

3.5.4 Tratamientos hidrofóbico e hidrofílico a la superficie

Para el tratamiento hidrofóbico se empleó una solución comercial Rain-X a base de isopropanol con nano partículas de sílice hidrófobas (No. Catálogo 5071268). Los dispositivos fueron suspendidos en la solución y sometidos a agitación ultrasónica por 15 minutos, posteriormente se dejó evaporar al isopropanol quedando una cubierta hidrofóbica. Para el tratamiento hidrofílico se aplicó un tratamiento de plasma de O₂ por 3 minutos al vacío. Ambos tratamientos se hicieron a pequeñas láminas cuadradas de 1.5 cm x 1.5 cm (superficie plana) y a pilares de diferentes diámetros.

3.6 Resultados

3.6.1 Efectos de los parámetros de fabricación sobre la rugosidad de los pilares

La rugosidad formada en nuestros pilares se genera durante el micro maquinado, donde los parámetros de velocidad de corte (mm/s) y velocidad de giro (rpm) deben establecerse para que la fricción que produce el movimiento de la broca a su paso fluidice el polímero en el contorno del pilar, formando una rugosidad abultada más o menos continua (**Figura 3.3B**) en vez de rebabas discontinuas (**Figura 3.3A**).

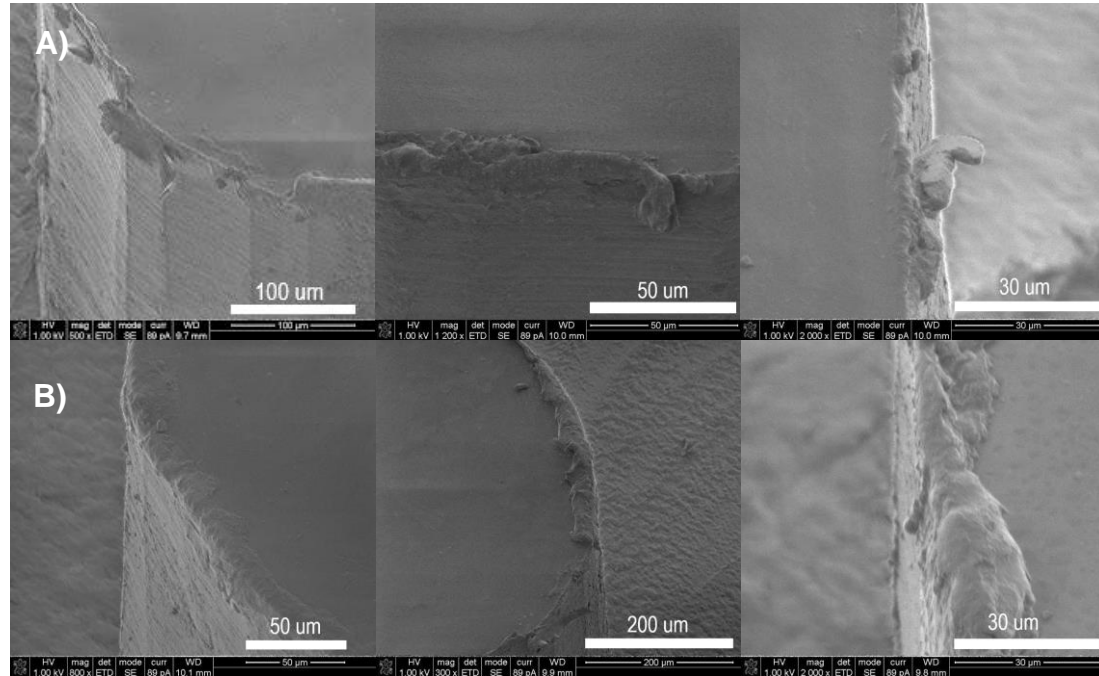


Figura 3.3: Imagen SEM 2000 x del borde de pilares de PMMA de 0.8 mm de diámetro fabricados mediante micromaquinado, A) a 4500 rpm, B) a 6500 rpm, ambas a 2 mm/s.

3.6.2 Efecto de la superficie del pilar.

Cuando se coloca una gota de agua de 1 μl sobre una superficie plana de PMMA esta se extiende en un área de ~ 2.0 mm de diámetro, con un ángulo de contacto de $65\text{-}73^\circ$. Si el volumen se incrementa, el radio de contacto y la altura también lo hacen manteniéndose el ángulo de contacto “de equilibrio” en el mismo valor, y lo hará hasta que la longitud capilar sea rebasada, entonces la gota comienza a sufrir los efectos de gravedad, la altura ya no aumenta, aunque sí el radio, achatando la gota y quizás aumentando el ángulo de contacto. En cambio, al pipetear la gota sobre un pilar esta se extenderá limitándose al área disponible por el diámetro del pilar, pudiendo aumentarse este volumen hasta ángulos de contacto superiores a los 140° como se puede ver en la **Figura 3.4**.

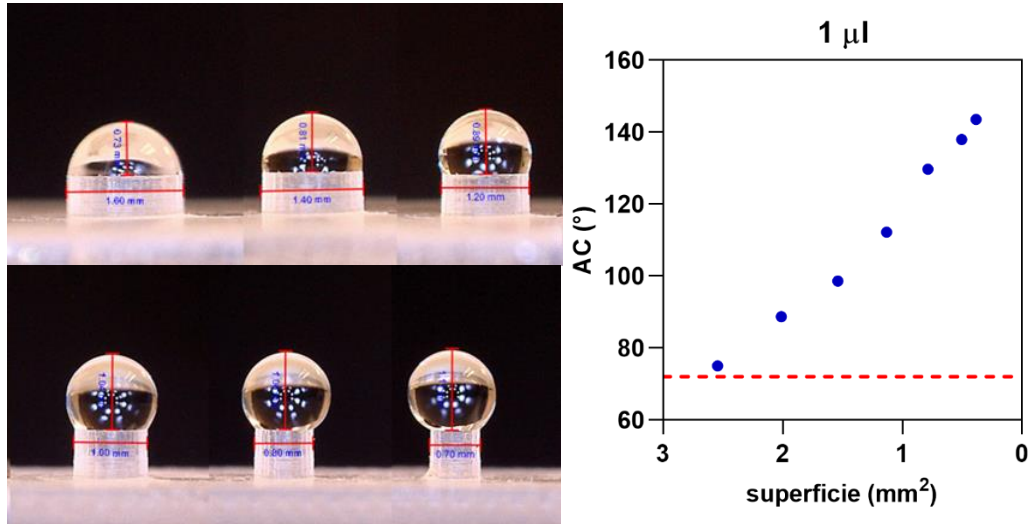


Figura 3.4: Una gota incrementa su ángulo de contacto ajustándose a la superficie disponible. 1 µl de agua Mili-Q sobre pilares de PMMA con diámetros cada vez mas reducidos de 1.6 mm, 1.4 mm, 1.2 mm, 1.0 mm, 0.8 mm y 0.7 mm. Grafica correspondiente, donde la línea punteada indica el valor del AC=72°, de una gota del mismo volumen sobre una superficie infinita de PMMA.

Este anclaje de la línea de contacto puede representar algunos beneficios para la realización de ensayos; al permitir una fijación de la línea de contacto se puede contener una gota de mayor volumen y al evaporarse ésta, los sedimentos a analizar quedarían en un área menor y bien delimitada.

3.6.3 Relación volumen vs diámetro del pilar.

Se midió el volumen de las gotas que se pueden sostener en pilares de diferentes diámetros, a una temperatura de 37°C (misma que se emplea en cultivos celulares) ya que es sabido que la temperatura disminuye la tensión superficial. Esta temperatura se utilizó tanto en las soluciones como en los dispositivos y cámara de experimentación, para evitar gradientes de temperatura o pérdidas de calor que pudieran afectar los resultados.

La relación volumen/diámetro parece aumentar de forma lineal aunque al aumentar el volumen de las gotas estas son afectadas por la gravedad, lo que causa derrames conforme incrementa esta relación (**Figura 3.5**). Se observó también que después de un diámetro de pilar de 1.6 mm las gotas alcanzan ángulos de contacto >140° debido al achatamiento provocado por efectos de la gravedad, lo que indica que ya no son las fuerzas capilares las predominantes en mantener la forma esférica de la gota. El diámetro del pilar está cercano a la longitud capilar (2

mm), teóricamente por arriba de este valor la gravedad comienza a tener efectos de desviación de la forma esférica de las gotas.

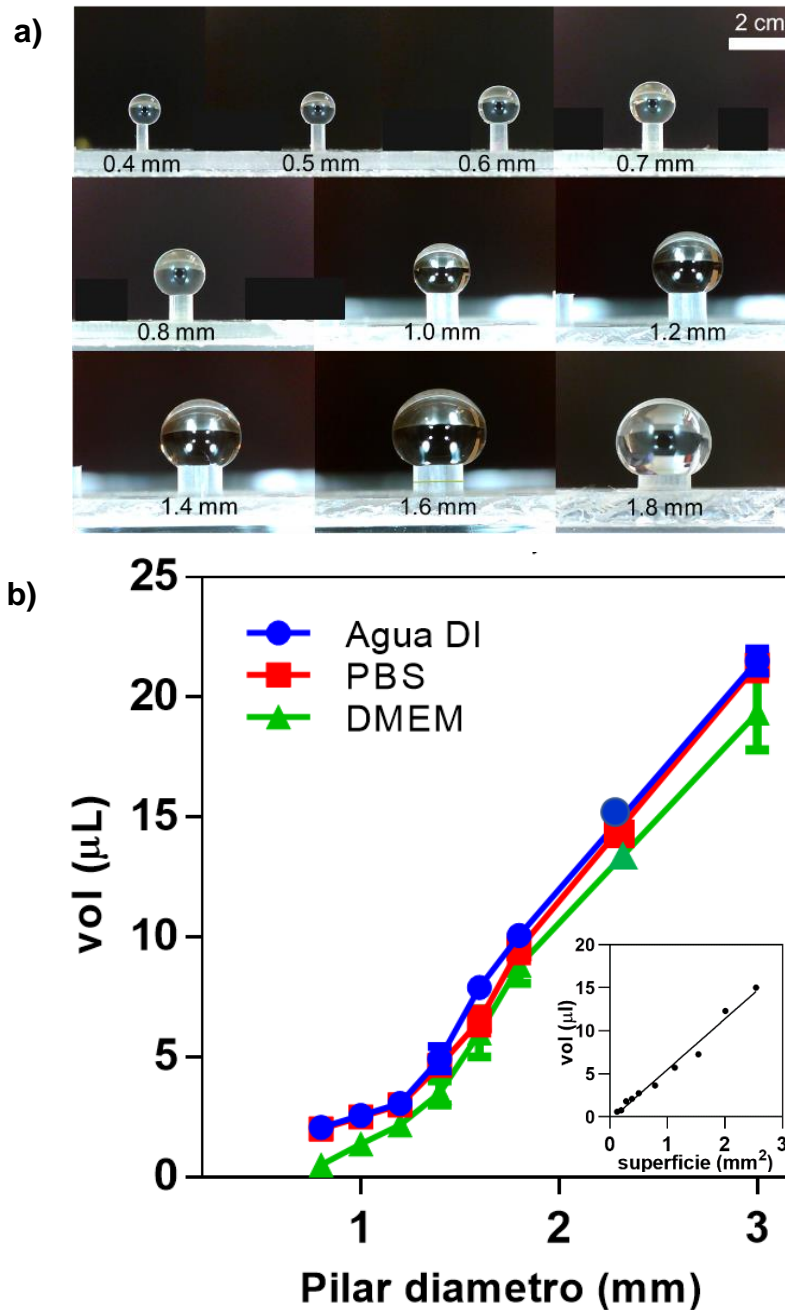


Figura 3.5: Maximo volumen soportado por pilares de diferentes diametros para tres sustancias: agua, solución amortiguadora (PBS) y medio de cultivo celular (DMEM) a 37°C, a) Imágenes representativas, b) grafica correspondiente mostrando una relación cuasi lineal tanto en relación al diámetro como a la superficie del pilar (recuadro).

3.6.4 Efecto de la rugosidad del borde en el incremento de histéresis

Una gota de agua sobre una superficie plana de PMMA presenta ángulos de contacto de avance de 77° y de recesión de 49° , dando como resultado un ángulo de histéresis de $27.6 \pm 1.2^\circ$ (54). En cambio, de acuerdo con la gráfica de la **Figura 3.6** con el uso de estos pilares obtenemos ángulos de avance de $\sim 143 \pm 7^\circ$ y de recesión de $\sim 17 \pm 3^\circ$, con ángulos de histéresis de $\sim 125^\circ$. Esto significa que la rugosidad de los pilares ha incrementado casi 4 veces la histéresis de una superficie plana.

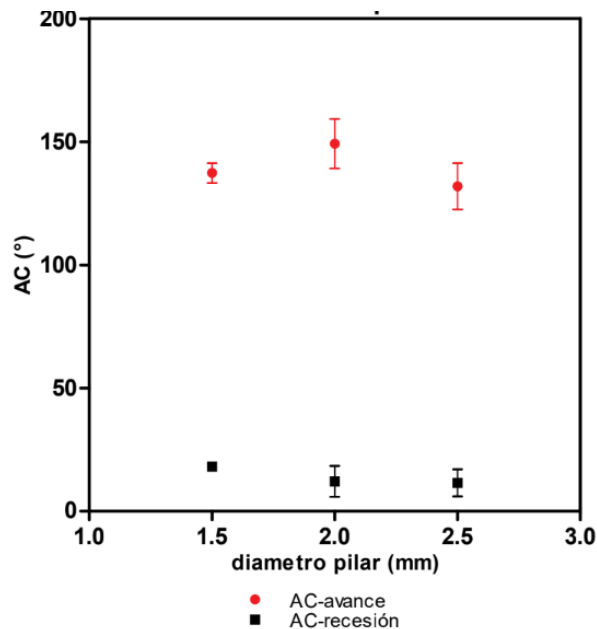


Figura 3.6: Ángulos de avance y de recesión de la línea de contacto de una gota de agua para diferentes diámetros de pilar a 25°C y 50% H.R. La diferencia entre estos dos valores nos da el ángulo de histéresis.

3.6.5 Efecto de tratamientos hidrofóbico e hidrofílico al PMMA

Mediante estos experimentos se pudo comprobar que el borde del pilar permite obtener ángulos de contacto mayores que aquellos alcanzados con el tratamiento de hidrofobicidad. Las superficies planas de PMMA tratadas con Rain-X mostraron apenas un incremento de AC de $\sim 20^\circ$, mientras que en el tratamiento hidrofílico el ángulo se redujo $\sim 33^\circ$, ambos a una humedad de 50% (**Figura 3.7a**). La línea roja punteada indica el valor del AC de referencia de una gota de agua sobre una superficie infinita de PMMA sin tratamiento a 25°C , $\sim 72^\circ$.

Por otro lado, se hizo una comparación del efecto del borde en una superficie de pilar tratada de la misma forma que la superficie plana. Se colocaron gotas según el mayor volumen soportado y se midió el AC de gotas estáticas para cada tamaño de pilar. El efecto del borde, se ve reducido con el tratamiento hidrofílico; mientras que el tratamiento hidrofóbico no provocó mejoras sustanciales, como se puede ver en la **Figura 3.7b**.

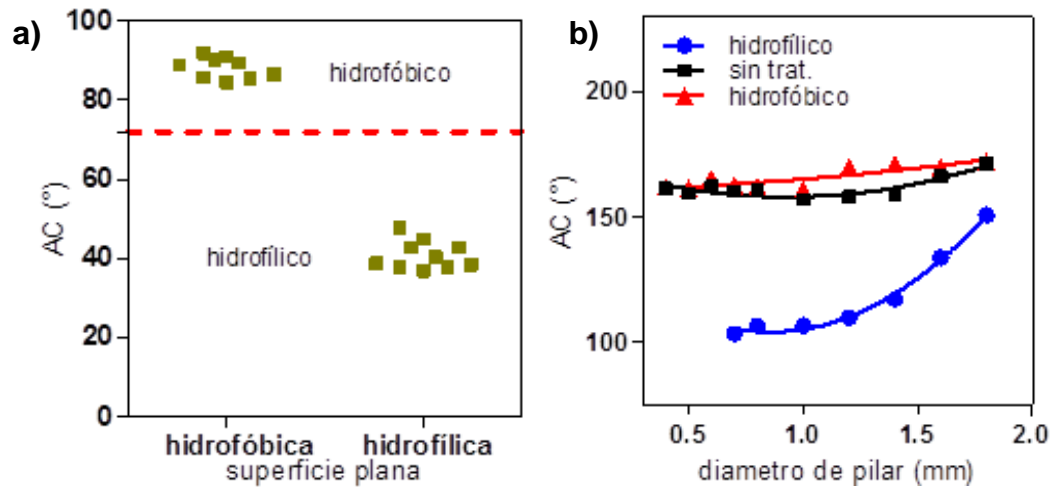


Figura 3.7: Efectos de tratamientos en el ángulo de contacto estático, hidrofóbico (Rain-X) e hidrofílico (plasma O_2) al PMMA, a) en una superficie plana y b) en pilares de diferentes diámetros.

3.7 Discusión de resultados

Cada sustancia forma un ángulo de contacto característico al interactuar con una superficie. Para el caso del agua (tensión superficial= 72.8 mJ/m^2) en PMMA a condiciones de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y suponiendo una superficie totalmente lisa y limpia, el ángulo de contacto es de $\sim 65^\circ\text{-}73^\circ$. Los ángulos de contacto alcanzados mediante el uso de nuestros pilares llegan a superar los 140° y son similares a aquellos obtenidos mediante tratamientos más complejos como arreglos de micropilares o recubrimientos (44, 47–49). A diferencia de los trabajos antes mencionados, el micromaquinado es un proceso sencillo, aunque de baja resolución, pero suficiente para generar la rugosidad que permite mantener una gota anclada aun cuando el ángulo de contacto es muy elevado, evitando el desplazamiento de la línea trifásica y un consecuente derrame. Además, esta histéresis puede mantener la línea de contacto anclada al pilar cuando el volumen de la gota se reduce a ángulos de contacto muy bajos. Esto indica que la energía o el trabajo requerido para relajar la línea de contacto es muy alto.

Se ha observado que al colocar diferentes gotas del mismo volumen y sustancia en una superficie plana infinita se presentan variaciones en los valores de ángulo de contacto, reflejando la heterogeneidad de la superficie en diferentes puntos. Nuestros pilares permiten reducir esta variabilidad de los ángulos de contacto. Otro aspecto importante es que al fijar el diámetro del pilar ya no se depende de la velocidad del flujo durante la deposición del volumen ni de la heterogeneidad de la superficie, que son los principales factores que afectan la reproducibilidad en el caso de superficies planas (40, 41).

Las diferentes modificaciones a superficies de PMMA reportadas en otros proyectos han dado buenos resultados, sin embargo, todos los procedimientos reportados conllevan una serie de pasos que consumen material, tiempo y reactivos, haciéndolos poco viables para el diseño de dispositivos de bajo costo. En cambio, el PMMA es un material relativamente económico (aunque esto dependerá también de su pureza) y es fácil de adquirir en forma de láminas. El proceso de fabricación es muy simple y rápido (20 min- 2 h) ya que incluye un solo paso. El micro maquinado es un proceso rápido y preciso y su calidad depende de la herramienta de corte y los parámetros de fabricación, la altura y el ancho de los pilares puede ser fácilmente ajustado. La presencia de rugosidad en el borde del pilar puede ser selectivamente modificada sin alterar las propiedades del resto de la superficie del PMMA. Por otro lado, el micro maquinado de PMMA puede ser complementado con tratamiento de plasma de oxígeno o funcionalización con moléculas de adhesión.

Debido a que el PMMA es un material químicamente hidrofílico (ángulo de contacto $<90^\circ$), es de esperar que el agua pueda penetrar en los espacios que proporciona la rugosidad, proveyéndose así, una mayor área de interfaz sólido-líquido, al menos a lo largo de la línea de contacto, que como se ha mencionado al inicio del capítulo es el sitio principal responsable de fenómenos de histéresis y ángulo de contacto.

3.8 Conclusiones y perspectivas

El volumen de la gota que reposa sobre el pilar puede incrementarse gracias al aumento de histéresis. Esto mantiene una alta relación volumen/superficie que aumenta la capacidad de concentración de solutos disueltos al evaporarse el

solvente. Dicha característica puede ser útil en incrementar la sensibilidad en ensayos.

El procedimiento presentado es sumamente sencillo comparado con aquellos que conllevan diferentes pasos de funcionalización, fabricación de arreglos de micropilares, o capas de nanopartículas, además de tener características que lo hacen un buen candidato para su uso en ensayos que requieran de biocompatibilidad, transparencia para el uso de microscopios, rigidez para el maquinado, o facilidad de funcionalización.

Aun cuando se pueden alcanzar altos ángulos de contacto debido al volumen grande en relación con el pilar empleado, no siempre es factible emplear estos para ensayos bioquímicos. La razón es que conforme se aumenta el volumen de la gota y si la tensión superficial disminuye por la presencia de otras moléculas en solución que interfieran con los puentes de hidrógeno, se reduce la condición de casco esférico (que representa un estado donde las moléculas del líquido se encuentran unidas con la suficiente fuerza para no ser afectadas por la gravedad), en cuyo caso, las gotas son vulnerables a ser derramadas fuera del pilar con cualquier agente externo que rompa el equilibrio de fuerzas. Estudios más detallados son necesarios para conocer la relación entre rugosidad y su efecto en la histéresis.

4. Evaporación de una gota sobre un pilar con borde rugoso

Se dará una reseña de antecedentes en estudios sobre evaporación y se explicará la física de dos diferentes regímenes de evaporación, empleados en nuestro trabajo experimental: el limitado por difusión y el limitado por transferencia de vapor. También se explica la forma en que se llega a una ley de escalamiento que predice la tasa de evaporación de gotas en pilares para tres diferentes soluciones: simple (agua), mixta (solución binaria) y compleja (plasma sanguíneo).

4.1 Introducción

La evaporación de una gota sobre un pilar difiere de aquella en una superficie plana, debido al balance de fuerzas que cambia con la curvatura de la gota, la forma del menisco que se forma en la línea de contacto, y cuánto tiempo esta línea permanece fija a la superficie. La evaporación local también puede variar a lo largo de la superficie de la gota dependiendo de obstáculos físicos, estímulos externos o el ambiente circundante.

Durante los ensayos biológicos se pueden emplear diferentes componentes o soluciones que difieren entre sí en cuanto a sus propiedades. Es común que la muestra a analizar consista en fluidos corporales como pueden ser la orina o plasma sanguíneo. La evaporación de gotas de plasma sanguíneo ha sido ampliamente estudiada, ya que los patrones que quedan tras la evaporación pueden aportar información sobre la estructura molecular y supramolecular de proteínas (9) e incluso ser utilizada para la detección de enfermedades (55).

4.2 Antecedentes

Se ha encontrado en diversos estudios que el flujo de evaporación dirigida por difusión no es uniforme alrededor de la gota, sino que varía con las características de ésta y el sustrato en que se encuentra. En gotas con altos ángulos de contacto (sobre una superficie plana) se ha encontrado que en la región cercana a la línea de

contacto con el sustrato se forma un espacio semibloqueado, por lo que el transporte difusivo del vapor de agua es suprimido, reduciendo así el flujo de evaporación. En el caso de gotas con bajos ángulos de contacto (en superficies planas) el flujo local de vapor es mucho mayor cerca de la línea de contacto que en la parte más alta de la gota (**Figura 4.1**). Este fenómeno se ha encontrado incluso cuando se agrega calentamiento (56).

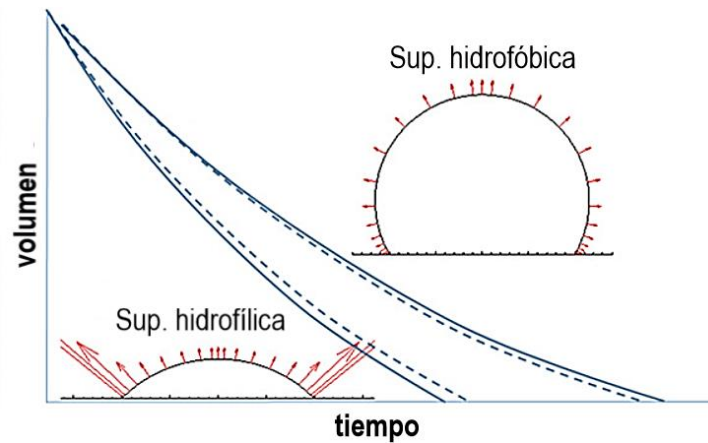


Figura 4.1: Evolución del volumen de dos gotas de agua como indicador de la evaporación en el tiempo, el tiempo de vida de la gota en superficie hidrofóbica es mayor a la evaporada en superficie hidrofílica. Las flechas indican el flujo de vapor (56).

Tuan y Nguyen (57) analizaron teórica y experimentalmente la evaporación de gotas de agua en superficies hidrofílicas ($AC < 90^\circ$) e hidrofóbicas ($AC > 90^\circ$) ambas con la línea de contacto anclada a la superficie plana y añadiendo el efecto de la gravedad. También encontraron un tiempo de vida mayor para gotas en superficies hidrofóbicas, atribuyendo esta diferencia a un ángulo de contacto transitorio justo en la línea de contacto donde se presenta un confinamiento de vapor, distinguible solo a nivel microscópico, en cambio la superficie hidrofílica presenta una película precursora que facilita la evaporación (**Figura 4.2**).

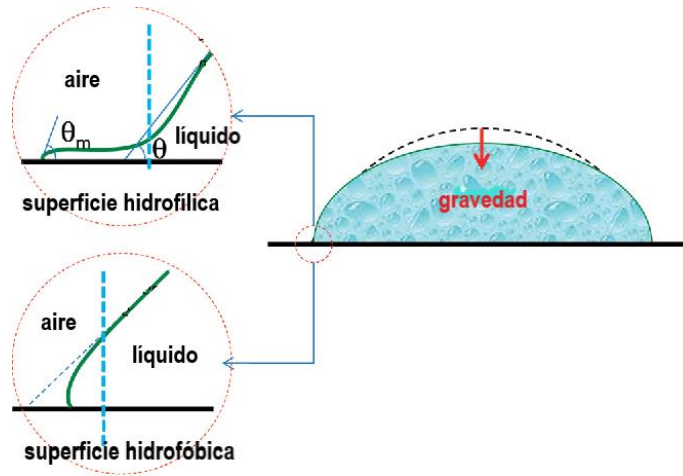


Figura 4.2: Efectos de fuerzas intermoleculares y de gravedad, con una película precursora y una curvatura local en la interfase líquido-vapor respectivamente (57).

Stauber y colaboradores (58) también han estudiado la evaporación de gotas ancladas, describiendo la dependencia del tiempo de evaporación respecto al ángulo de contacto inicial, siendo mayor en superficies hidrofóbicas. Ellos consideraron los dos modos de evaporación, radio de contacto constante y ángulo de contacto constante, permitiendo transiciones entre anclaje y desliz de la línea de contacto.

Heijden y colaboradores (59) concluyen que el tiempo de vida de la gota depende del ángulo de contacto inicial y es afectado por la competencia entre anclaje y relajación. Los autores describen que una línea anclada de manera permanente o temporal exhibe ángulos de contacto diferentes a su ángulo de equilibrio. Si la gota mantiene la línea de contacto fija mientras se evapora, habrá un decrecimiento del ángulo hasta que ésta se desancla a un valor equivalente al ángulo de recesión θ_r , después de esto continúa en un θ_r , mientras la línea de contacto retrocede (58). Man y Doi (60) afirman que esta competición depende solo de las propiedades del fluido y de la fase vapor circundante

4.3 Justificación

Una gran diversidad de estudios y consideraciones se han llevado a cabo para el desarrollo de modelos que describen la evaporación de una gota bajo condiciones determinadas, pero entre todos ellos no se encontró un estudio que se adaptara a las condiciones experimentales que requerimos. En especial porque dichos estudios

se basan en superficies relativamente extensas en comparación al pilar, planas, independientemente de si estas contienen rugosidad o texturas. Además, las condiciones de ángulo de contacto inicial elevado y radio de contacto constante, no se encuentran juntas en un mismo modelo.

Por lo tanto, se hace necesario el desarrollo de un estudio que nos permita determinar la tasa de evaporación que se lleva a cabo en gotas de volúmenes de microlitros sobre pilares con borde rugoso. Este borde previene el deslizamiento de la línea de contacto de las gotas propiciando una evaporación en modo de radio de contacto constante (RCC). Por otro lado, tener un pilar, y no una superficie plana, se descartan las condiciones de película precursora o confinamiento cerca de la línea de contacto descritas por Tuan-Nguyen (57) y otros investigadores.

Comprender el proceso de evaporación de una gota sobre un pilar puede ayudar en el desarrollo de diversas aplicaciones como los ensayos biológicos, donde los resultados pueden depender del tiempo de reacción o movimientos de convección dentro de la gota y estos a su vez de la tasa de evaporación. Además, debe considerarse que durante una reacción pueden generarse productos y con esto cambien las características de la gota durante su evaporación. Es por ello que se hace necesario un análisis de evaporación de gotas de soluciones de diferentes características.

4.4 Objetivos

Estudiar la evaporación de gotas de 1-3 μl con forma cuasi-esférica, con radio de contacto constante anclado al borde rugoso irregular de un pilar de PMMA, evaluando el efecto de variables como presencia o no de corrientes de aire, nivel de humedad, diámetro de pilar, volumen inicial, tipo de sustancia .

4.5 Metodología

4.5.1 Arreglo experimental

Todos los experimentos de evaporación fueron desarrollados a 25 ± 1 °C, manteniendo una humedad relativa de 30% o 50% según se indique, dentro de una cámara de control de volumen (15 L). Esta cámara consta de una caja de acrílico transparente de 1" de grosor en cuyo interior se puede controlar: humedad,

temperatura, corriente de aire e iluminación. Las dimensiones de la caja son 30 cm x 50 cm x 30 cm (l x a x h), está recubierta al exterior con un fondo blanco y papel polarizado (vinil cromado). En su interior cuenta con una lámpara fluorescente compacta (SKU#902-838, Ecosmart, 5000 K, 9 W) que proporciona luz o contraste, dependiendo de su ubicación respecto a la gota (la luz detrás de la gota fue colocada cuando se requirió mayor contraste.), un humidificador ultrasónico (AIR-200, STEREN de 20,000 Hz) y un ventilador (Cooler TITAN, TFD-8025M12S de 8 x 8 x 2.5 cm.), un Microscopio Digital (Dino Capture 2.0, AM2111 Dino-Lite Basic USB, 3 MP, 640x480) conectado a una computadora para la adquisición de imágenes. El microscopio digital y el ventilador se encuentran alineados al pilar para tener un enfoque lateral de la gota. El arreglo se encuentra esquematizado en la **Figura 4.3**.

Las condiciones dentro de la cámara fueron controladas y monitoreadas mediante un entorno Visual Studio, codificado en Visual C Sharp, como se muestra en la **Figura 4.4**.

4.5.2 Evaporación de soluciones

Las gotas fueron pipeteadas con puntas Low Retention graduadas para 0.1-10 μL (MultiFit Pipette Tips Low Binding Polymer Technology de BioScience). Se evaporaron gotas de 1 μl , 2 μl y 3 μl de las siguientes sustancias: Agua Mili-Q, solución binaria compuesta por agua Mili-Q y 10% de polietilenglicol PEG-400 (No. 20 2398, Sigma Aldrich, USA), solución de etanol al 70%, y plasma sanguíneo. Las gotas de plasma fueron colocadas usando una punta metálica debido a que la interacción con una punta común no permitía tener gotas de volúmenes reproducibles. Para la obtención del plasma se centrifugaron 10 ml de sangre fresca por 5 minutos a 1600 rpm en una centrifugadora (LAB 5804-R Eppendorf) recolectando 4 mililitros de la parte superior del tubo. Alícuotas de 100 μl de plasma sanguíneo fueron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y atemperadas antes de su uso.

Para el régimen de evaporación limitado por difusión se permitió que las gotas se evaporan pasivamente dentro de la cámara de control. Para los experimentos correspondientes al régimen limitado por tasa de transferencia se utilizó el ventilador dentro de la cámara a 10 cm de distancia del pilar, operando al 70% de su capacidad.

4.5.3 Análisis de imágenes

Imágenes secuenciales fueron capturadas mediante la programación de las cámaras microscópicas durante los experimentos. Las dimensiones (altura y ángulo de contacto) de la gota fueron medidas con el software ImageJ. Para los ángulos de contacto se empleó específicamente en plugin LB-ADSA, basado en un ajuste de la ecuación de Young-Laplace de libre descarga.

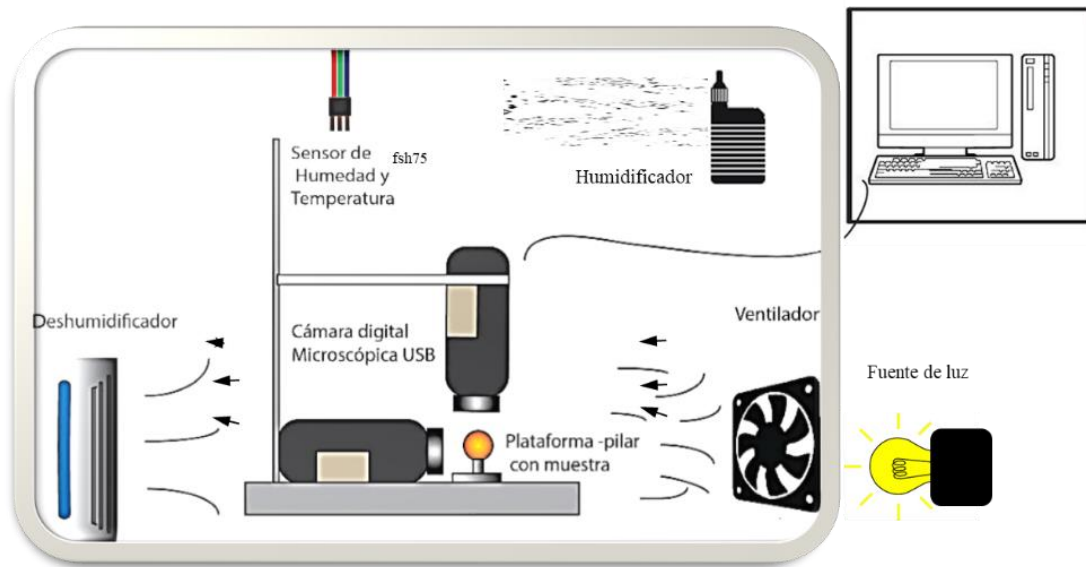


Figura 4.3: Esquemático del arreglo experimental para el estudio de evaporación de gotas.

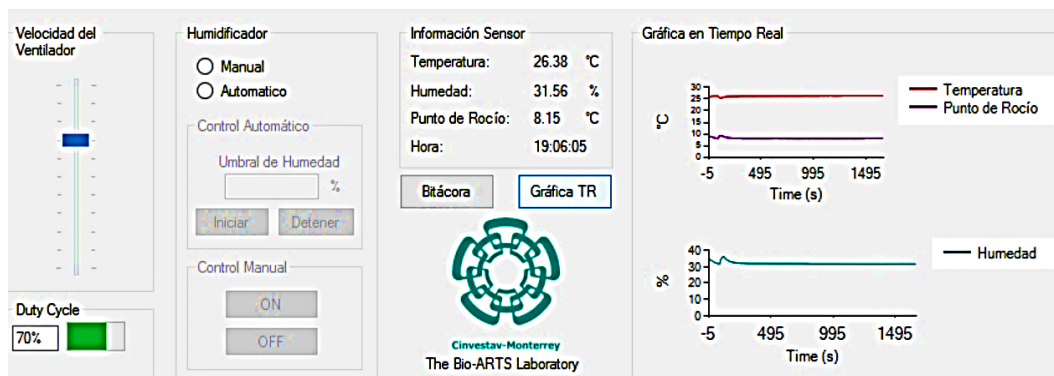


Figura 4.4: Interfaz Visual Studio para el control de humedad y temperatura del arreglo experimental.

4.6 Resultados

4.6.1 Evaporación de gotas de diferentes volúmenes.

Las gotas de agua pura fueron evaporadas a 50% H.R. sin intervención de corrientes para permitir la difusión natural de las moléculas de vapor. La evolución de altura, ángulo de contacto y volumen fueron medidos cada minuto hasta su evaporación total. Los experimentos de evaporación en el régimen limitado por difusión para los tres volúmenes presentaron una disminución del volumen en el tiempo muy similar entre ellos, la relación entre el tiempo de vida de la gota y el volumen inicial es proporcional. Las pendientes promedio para cada volumen fueron de: = -0.049 para 1 μ l, -0.060 para 2 μ l y de -0.063 para 3 μ l, con una $P < 0.0001$ (Figura 4.5).

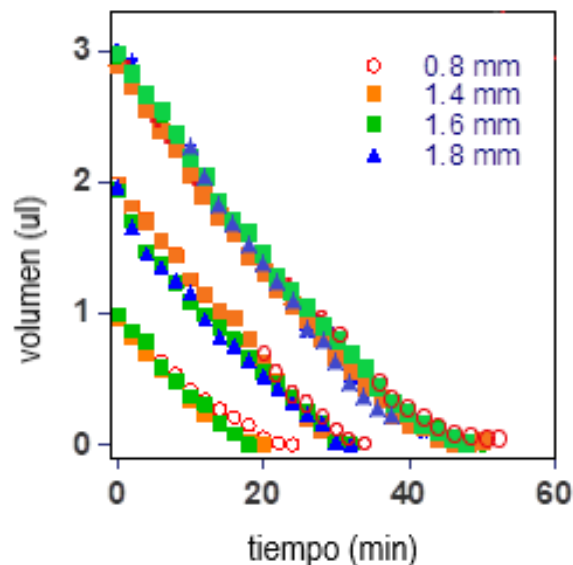


Figura 4.5: Evaporación de gotas de agua de diferente volumen asentadas sobre pilares de diferentes diámetros.

4.6.2 Comparación del tiempo de vida de gotas bajo dos regímenes de evaporación

Entre los dos modos de evaporación se encontró una notable diferencia en el tiempo de vida de la gota, siendo menor por al menos 1/3 del total cuando las moléculas de vapor eran retiradas con el uso del ventilador (este régimen de evaporación corresponde al limitado por la tasa de transferencia) que aquel en el

que esperábamos una difusión natural del vapor de agua alrededor de la gota (Figura 4.6).

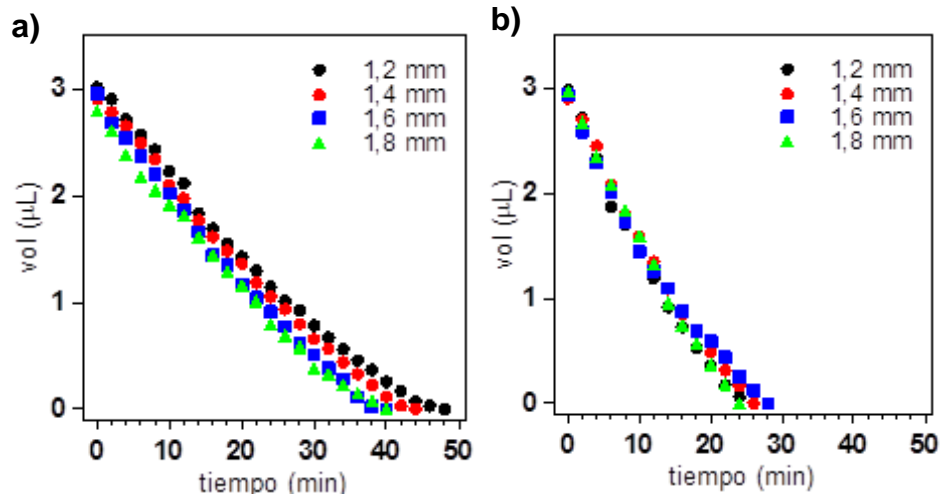


Figura 4.6: El tiempo de vida se reduce más de un tercio al eliminar el paso limitante de difusión. Evaporación de una gota de 3 µl en pilares de diámetros de 1.2-1.8 mm a) mediante evaporación limitada por difusión, y b) limitada por transferencia de fase.

En el caso de evaporación limitada por difusión se encontró una pequeña diferencia en el tiempo de evaporación total, siendo mayor por ~8 minutos en el pilar de 1.2 mm de diámetro respecto a los pilares de 1.6 y 1.8 mm. Una diferencia intermedia de ~4 minutos se observa para el pilar de 1.4 mm. Este comportamiento donde el mismo volumen se evaporó en un tiempo ligeramente mayor cuanto más pequeño era el pilar se repitió para otros experimentos a 47% H.R. (ver Apéndice CI). Cabe recordar que, conforme el tamaño del pilar disminuye, el ángulo de contacto y al mismo tiempo la curvatura, aumentan, esto representa una mayor presión al interior de la gota (29, 61) lo cual pudiera ser la causa de esta diferencia. Este efecto en el tiempo total de evaporación puede estar siendo mitigado por las corrientes de aire que desplazan las moléculas de vapor de la interfase, en el caso de evaporación limitada por la tasa de transferencia de moléculas de agua de la fase líquida a la fase vapor, el cual, al reducir el tiempo total, debe estar reduciendo también las diferencias.

4.6.3 Evaporación limitada por difusión de diferentes sustancias

Al cambiar la complejidad del fluido también cambia la curva de evaporación, presentándose más de una pendiente a lo largo del proceso. Además, las curvas

presentan ciertas diferencias para cada fluido, como se puede observar en la **Figura 4.7**.

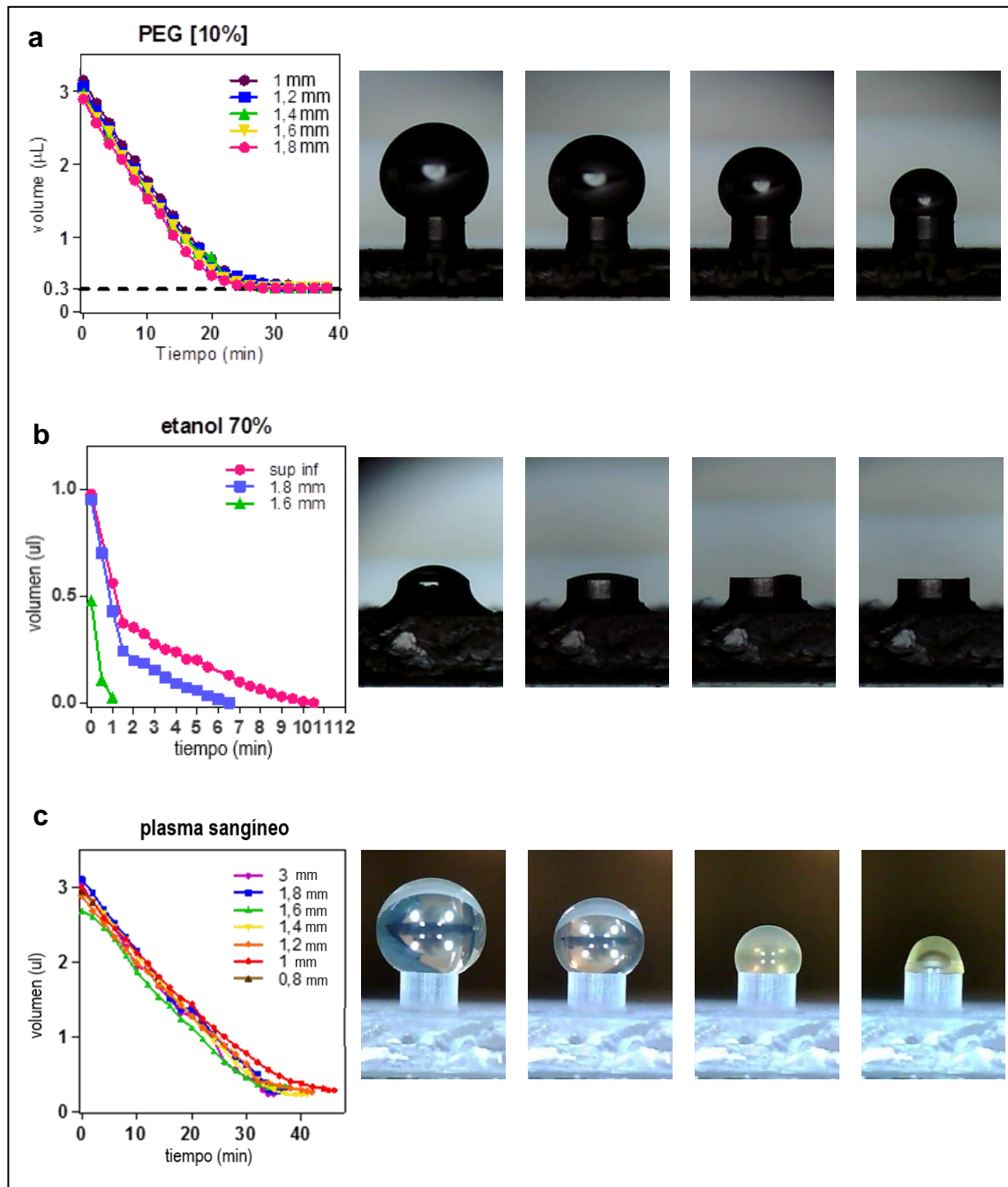


Figura 4.7: Evaporación difusiva de gotas de diferentes sustancias a) PEG 10%, b) etanol 70% y c) plasma sanguíneo, con su respectiva serie de imágenes representativas en intervalos de tiempo equivalentes, donde la figura del extremo izquierdo corresponde al inicio de la evaporación y la figura del extremo derecho corresponde al final de la evaporación. Las diferentes curvas representan el diámetro del pilar en el que fue evaporada la gota y en el caso del etanol también para una superficie infinita (sup. Inf.). Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C y 50% H.R.

En el caso de la solución binaria agua: PEG al 10% (**Figura 4.7a**), se observa un decrecimiento del volumen mayor al que se esperaría del agua pura hasta un punto donde la curva muestra un comportamiento asintótico sin llegar a evaporarse completamente. Se puede deducir que el volumen evaporado corresponde a la pérdida de masa de agua mientras que el volumen que permanece en el pilar corresponde al volumen inicial de PEG, ya que la evaporación de éste es casi nula. El motivo de que la evaporación del agua sea más rápida que en el caso del agua pura, puede deberse a que el PEG en solución acuosa reduce la tensión superficial, lo cual facilita el escape de las moléculas de agua de la fase líquida a la fase vapor (62) (para más detalles ver Apéndice CI) .

En el caso de la solución con etanol (**Figura 4.7b**) se observan dos pendientes, la primera indica una reducción rápida hasta casi la mitad del volumen inicial, que puede suponerse corresponde al etanol evaporado ya que este es más volátil que el agua y evapora rápidamente. Posteriormente continúa la evaporación de manera más lenta hasta llegar a un valor de volumen cero, ésta puede corresponder a la evaporación de agua.

Para el caso de la solución compleja (**Figura 4.7c**), el plasma sanguíneo presentó una curva de reducción del volumen sin llegar a cero, cuyo comportamiento es similar al del PEG 10%, acercándose asintóticamente a un volumen que permanece constante por los minutos-horas siguientes. El plasma representa el 55% de la composición de la sangre, a su vez está compuesto de 90% agua y un 10-13% de contenido de iones, electrolitos y proteínas (63). El plasma sanguíneo es una matriz compleja de moléculas con diferentes características, proteínas disueltas tales como albúmina, globulina, fibrinógeno y otras (aproximadamente 300) con diferente tamaño, hidrofobicidad, carga, que modifican la interacción con algunos sólidos (es por ello que se usó una punta de metal para colocar las gotas). Estas proteínas no se evaporan, sino que cristalizan cuando el agua en que se encuentran es evaporada. Estos residuos proteicos se pueden observar sobre el pilar en la **Figura 4.7c** donde tras la evaporación de la fase líquida del plasma, se observa una gota que no reduce más su tamaño y que al tacto es sólida (para más detalles ver Apéndice CI).

4.6.4 Modelo de evaporación de gotas ancladas a un pilar

En las dos condiciones experimentales probadas anteriormente, correspondientes a dos distintos regímenes y diferentes tasas de evaporación, se asume que se trata de un proceso cuasi-estático, debido a que la evaporación es un proceso lo suficientemente lento y a que el campo de concentración de vapor se ajusta fácilmente a los cambios en el tamaño de la gota. En la **Figura 4.8** se muestra un ejemplo idealizado de los gradientes de concentración de vapor en cada uno de estos regímenes para una gota perfectamente esférica evaporándose en el espacio libre lo cual representa la forma más simple del sistema.

En el régimen limitado por la tasa de transferencia se considera que las moléculas circundantes que recién han escapado de la fase líquida son movidas inmediatamente, alejándolas de la superficie de la gota y, por lo tanto, la tasa de evaporación queda limitada solamente por la tasa de transferencia neta de las moléculas de la fase líquido a la fase vapor. En este caso se considera que la concentración de vapor circundante a la gota es la misma que en el ambiente (**Figura 4.8a**).

En el régimen limitado por difusión la evaporación está limitada por un tiempo necesario para que las moléculas que han escapado de la superficie a la fase vapor difundan en el medio, para reducir la concentración de vapor en la proximidad de la superficie y permitir la evaporación de otras moléculas. En cuyo caso la concentración de vapor en la superficie de la gota c_s es alto y va reduciendo asintóticamente con la distancia r hasta llegar a una concentración en el infinito c_∞ , correspondiente a la concentración dada por la humedad relativa H.R. en el espacio (**Figura 4.8b**).

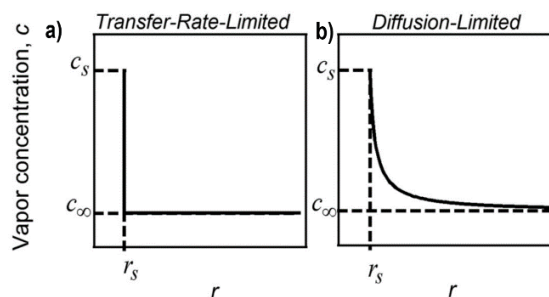


Figura 4.8: Perfil idealizado de concentración de vapor para la evaporación de una gota perfectamente esférica en el espacio donde, a) representa el régimen limitado por transferencia y el b) por difusión.

4.7 Conclusiones y perspectivas

La rugosidad de los pilares aumenta la fuerza de adhesión en la línea de contacto, pues la barrera energética que debe rebasarse para desanclarla es alta. Los volúmenes utilizados permiten una longitud capilar que hace que el efecto de la gravedad sea despreciable. Al mantener el radio de contacto constante y la forma semiesférica se simplifican las mediciones y cálculos del volumen, así como el desarrollo de un modelo matemático. Ya que, por otro lado, el uso del pilar reduce el bloqueo que se presenta en una superficie plana, aproximándose al modelo de una gota completamente esférica evaporando libremente en el aire, por lo que el flujo de vapor puede basarse en un modelo radial.

5. Desarrollo de una reacción enzimática con mezclado por corrientes de Marangoni bajo un régimen de evaporación limitado por transferencia.

Se explicará el proceso que facilita la agitación por movimiento convectivo dentro de una gota al introducir un gradiente térmico y un flujo de aire direccionado. Se explicará cómo el uso de flujo de aire aumenta la tasa de evaporación facilitando una reacción enzimática para un ensayo de detección de glucosa por colorimetría. El movimiento es detenido más adelante por la alta viscosidad del fluido que contiene los productos de la reacción.

5.1 Introducción

Una gota presenta la potencialidad para ser usada como un pequeño reactor, aunque ciertas consideraciones deben tomarse en cuenta ya que esto implica una mayor complejidad que aquella de un recipiente sólido de volumen constante. En el caso de una gota sésil se tiene un volumen cambiante debido a la evaporación, simultáneamente y debido a esta se pueden presentar cambios en concentración, densidad, viscosidad y pH (64).

Durante la evaporación de una gota pueden formarse corrientes de tipo capilar por la pérdida de moléculas en zonas de mayor evaporación en la interfaz líquido-vapor y su correspondiente reemplazo por otras del bulto de la gota. O bien, si existe un gradiente de tensión en la interfaz (superficie de la gota) se formarán tensores que arrastrarán otras capas subyacentes del líquido, resultando en lo que se conoce como corrientes de Marangoni (25).

Existen dos formas de generar estas corrientes de Marangoni. Una es mediante gradientes de temperatura, ya sea por calentamiento del sustrato o pérdida de calor

por vaporización; o por una concentración no uniforme en la solución (25). Esta última se presenta cuando por evaporación local preferencial de algún componente se generan sitios más concentrados y por lo tanto con mayor o menor tensión, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas y la composición porcentual.

Uno de los fenómenos comunes en la evaporación de gotas es la formación de un patrón circular una vez seca la superficie, debido al acarreamiento y acomodo de partículas en suspensión que fueron depositados en el perímetro de la gota (**Figura 5.1c**). Estos patrones son originados por el flujo capilar inducido por una diferencial en la tasa de evaporación a lo largo de la gota (ver Apéndice AII). Se ha estudiado el efecto que las corrientes de Marangoni tienen en la supresión de las marcas de anillo de café (39, 65), y cómo la dirección de las corrientes puede ser modificada si se controla el sitio de mayor o menor tensión superficial. Se debe además tener en cuenta que, así como hay factores que promueven la formación de estas corrientes de Marangoni, también hay factores que las inhiben, como el llegar a un equilibrio en la temperatura global, homogeneidad en la concentración de solutos y amortiguación viscosa (66).

Las corrientes de Marangoni pueden ser efectivas para facilitar el mezclado en una reacción enzimática, cuidando que tengan la magnitud y el tiempo suficiente para que la reacción en cuestión se lleve a cabo, y entonces frenar estas corrientes para evitar que se formen estructuras tipo anillo de café.

5.2 Justificación

Se ha comprobado que una manera efectiva de aprovechar la evaporación es en la concentración de moléculas en solución, con la finalidad de mejorar la señal de detección, ya sea por absorbancia, fluorescencia o colorimetría. Este tipo de reacciones requieren un tiempo específico que depende entre otras cosas de la cinética de la reacción, para que esta se lleve a cabo con buenos rendimientos. Durante la reacción se pueden producir compuestos o sustancias cuya viscosidad, densidad o baja presión de vapor alteren los patrones estudiados hasta el momento por otros grupos. Es necesario un análisis de la forma de las corrientes en nuestro arreglo experimental para un ensayo de detección de glucosa, mediante el uso de enzimas del tipo oxidorreductasa con sus respectivas características de reacción.

Por otra parte, es importante que el método utilizado reduzca los errores de medición. El anillo de café que se forma por el acarreamiento y deposición de partículas puede ser un obstáculo o una ventaja dependiendo de lo que se desee estudiar. En el caso de ensayos colorimétricos una huella más intensa y uniforme es deseable, por lo tanto, deben analizarse los modos de suprimir la formación de dicho anillo (ver Apéndice AII).

5.3 Objetivos

Aplicar gradientes de tensión superficial para la generación de movimientos convectivos que faciliten el mezclado de reactivos en una gota, favorecido mediante el alto ángulo de contacto que se alcanza con el uso de un pilar. Dirigir el sentido de estos movimientos para impedir la formación del anillo de café una vez evaporada la gota. Aplicar estos fenómenos para el desarrollo de un ensayo de detección de glucosa mediante una reacción enzimática colorimétrica.

5.4 Antecedentes

De acuerdo con el capítulo anterior existe una forma de acelerar la tasa de evaporación de gotas sobre pilares usando como paso limitante a la tasa de transferencia de moléculas de agua de la fase líquida a la fase vapor, lo cual se puede conseguir con la ayuda de un flujo de aire que desplace las moléculas de vapor lejos de la gota en cuanto estas escapan de la interfaz líquido-vapor, esto aplica para líquidos puros, o soluciones binarias y complejas. Mientras que las propiedades intrínsecas (densidad, solubilidad, viscosidad y tensión superficial) son tratadas como constantes en líquidos puros (excepto para tensión superficial dependiente de temperatura), el flujo en una mezcla es gobernado por el rol que juega la evaporación preferencial de uno de los componentes. La convección y la difusión generan una composición no uniforme en la gota, de manera que las propiedades físicas del fluido varían en espacio y tiempo.

Se ha reportado que la formación del anillo de café puede ser suprimido por la relajación del ángulo de contacto a su valor de equilibrio (59) es decir, cuando una gota se evapora libre de anclaje en la línea de contacto.

5.4.1 Corrientes de Marangoni

Los flujos convectivos o corrientes de Marangoni se forman por un desbalance de fuerzas tangenciales en la superficie de la gota dirigiéndose hacia la zona de mayor tensión superficial. El efecto Marangoni puede tomar lugar tanto a grandes escalas como en pequeñas. Dentro de una gota los campos de flujo que se forman pueden depender de la forma de la gota, la tasa de evaporación y las condiciones ambientales, así como de la temperatura de superficie. Los perfiles de velocidad de estas corrientes están relacionados con un número adimensional llamado número de Marangoni, este es proporcional al cociente entre fuerzas de tensión superficial y fuerzas viscosas. Los valores típicos para una gota sésil está en un rango de $1-3 \times 10^4$ (64).

Diversos estudios han demostrado que durante la evaporación se pueden presentar gradientes de temperatura en la interfaz (67) debidos a la pérdida de calor latente por evaporación (68), así como la formación de gradientes de composición por evaporación preferencial de uno de los componentes (66, 69). Incluso se ha observado el efecto de gravedad en el caso de mezclas binarias (70). Todo ello puede modificar las corrientes dentro de la gota y consecuentemente los patrones de partículas depositadas al final de la evaporación.

En cuanto a la forma de la gota, se han encontrado diferencias en los patrones de flujo entre gotas en superficies hidrofílicas e hidrofóbica (69, 71). Mientras que en el primer caso se dirigen hacia la línea de contacto en el segundo se dirigen hacia la parte más alta de la gota (**Figura 5.1a y b**). En ambos casos se ha encontrado un campo de flujo axisimétrico por lo que los depósitos de partículas muestran un patrón radial.

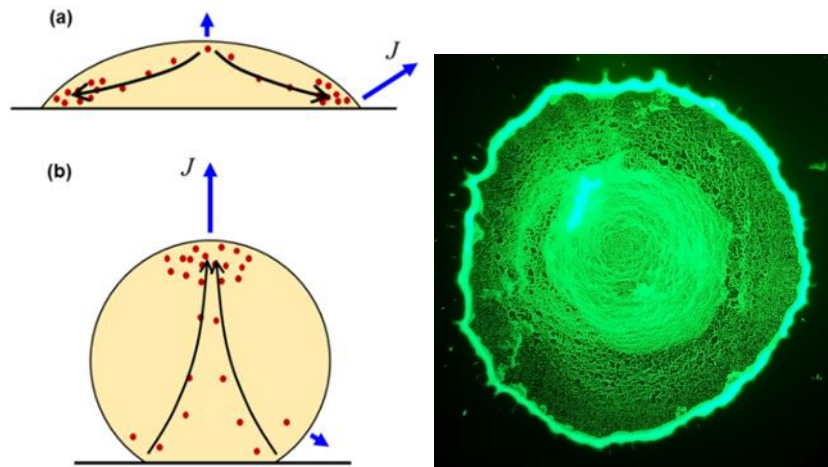


Figura 5.1: Ilustración esquemática que muestra la advección de partículas coloidales por flujo dirigido por evaporación en superficies a) hidrofílicas e b) hidrofóbicas. Las flechas azules indican la magnitud del flujo de vapor en la dirección dada y las flechas negras el movimiento de las partículas por las corrientes internas (71) c) ejemplo de formación de “anillo de café” al evaporar una gota de 2 μl de suspensión de partículas de diferentes tamaños sobre un portaobjetos de dióxido de silicio, con AC inicial de 37° .

5.4.2 Supresión de corrientes de Marangoni

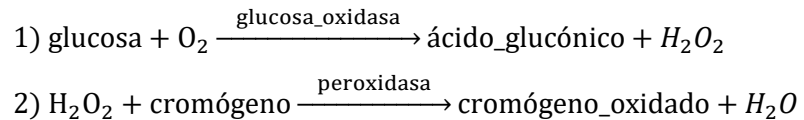
Se ha observado que mientras el volumen de la gota decrece por la evaporación, el gradiente térmico se reduce y el flujo de Marangoni se vuelve despreciable (72). También se sabe que las líneas del flujo y la magnitud de la velocidad son atenuadas linealmente con la viscosidad del fluido.

5.4.3 Reacción química de glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano en la detección de glucosa

La reacción enzimática para la detección de glucosa se presenta en dos pasos principales secuenciales donde cada uno emplea una enzima; glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano (GOx/HRP) respectivamente. La enzima glucosa oxidasa es ampliamente usada como principal componente de biosensores de glucosa, donde la intensidad en el color de un producto oxidado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

En el primer paso, la glucosa oxidasa cataliza una reacción entre la glucosa y el oxígeno del aire ambiental para producir ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.

En el segundo paso la peroxidasa cataliza la reacción entre el peróxido de hidrógeno y un cromógeno, en este caso yoduro de potasio (KI) para formar un compuesto oxidado coloreado que indica la presencia de glucosa.



5.5 Materiales y métodos

5.5.1 Visualización de corrientes y efecto del ángulo de contacto

Se colocaron gotas de 1.5 μl de suspensión de perlas fluorescentes de poliestireno de 5 μm , a una concentración de 0.001% vol. sobre pilares de 1.8 mm, 1.4 mm y 0.8 mm, los cuales nos proporcionaban ángulos de contacto agudo, recto y obtuso respectivamente. Se observaron al microscopio de fluorescencia (sin aislamiento de las corrientes de aire dentro del laboratorio) y se grabaron videos.

5.5.2 Visualización de corrientes y efecto de los regímenes de evaporación: limitado por difusión y limitado por transferencia.

Se colocaron gotas de 500 nl de colorante vegetal en el centro de pilares de diferente diámetro en un rango de 1.2 mm - 3 mm y se permitió evaporar hasta secar. Posteriormente se colocaron gotas de agua Mili-Q de 1.5 μl y se permitió evaporar de manera natural dentro de la cámara a 25°C y 50%, para experimentos de evaporación limitada por difusión. Para experimentos de evaporación limitada por transferencia se agregó un flujo de aire colocando un ventilador a 10 cm de distancia de la gota. Se tomaron videos del proceso y se midió el tiempo que cada gota tardo en formar una solución homogénea mediante un análisis de imágenes.

5.5.3 Reacción enzimática facilitada por corrientes de Marangoni

Los experimentos se desarrollaron en el interior de la cámara de acrílico descrita en el capítulo 4, llevando el sistema a 25°C incluyendo el dispositivo con pilar.

Las soluciones para llevar acabo la reacción se colocan en dos pasos. La primera de ellas es la mezcla de reactivos en las proporciones necesarias de: un

buffer, las enzimas GOx/HPR, y KI como agente de coloración. Se coloca con punta metálica una gota de 2 μ l a 4 °C, y se enciende el ventilador monitoreando la altura de la gota, hasta reducir el volumen a 500 nL (0.8 mm) para concentrar la solución 4X y reducir el tiempo de reacción. Entonces se coloca inmediatamente con punta plástica otra gota de 1 μ l de la solución muestra de glucosa a 25°C. Se deja evaporar a una temperatura de 25°C y una H.R. de 50 % aplicando una corriente de aire para favorecer la evaporación. La evolución de la gota es seguida mediante la captura de imágenes cada minuto por 25 minutos, hasta que el agua ha sido evaporada en su totalidad, quedando un menisco que corresponde a los productos de la reacción no evaporados. La intensidad de color alcanzada sobre el pilar es evaluada mediante análisis de imágenes de la vista superior del pilar.

Un procedimiento similar se llevó a cabo con soluciones de orina artificial (Artificial urine normal, Flinn Scientific, FB1444), la cual contiene en su composición: creatina 0.1%, albumina 0.1%, colorante artificial amarillo 0.1%, hidróxido de sodio 1%, cloruro de sodio 1-2 %, fosfato de sodio 1%, benzoato de sodio 1%, urea 3-5%, agua 89.7-92.7%. Las concentraciones evaluadas fueron en el rango de 0- 17.5 mM y fueron preparadas justo antes de los ensayos a temperatura ambiente.

5.6 Resultados y discusión

5.6.1 Visualización de corrientes con perlas fluorescentes en gotas de diferente ángulo de contacto.

Los movimientos de las perlas mostraron una dependencia al ángulo de contacto de la gota. Se pudo apreciar cualitativamente que las perlas se movían con mayor velocidad en gotas con ángulos de contacto más elevados, aun cuando se mantuvieron fijas variables como volumen, concentración y temperatura. Sin embargo, hacer un análisis de seguimiento de las partículas, fue difícil porque el movimiento caótico no se mantiene en un solo plano y el enfoque se pierde en un corto tiempo sobre todo en gotas con mayor ángulo de contacto.

Se realizó otra prueba cambiando: microscopio, cámara de video y tamaño de partícula. En ambos casos se observó un movimiento relativamente menor para ángulos de contacto $<90^\circ$, intermedio para ángulos de $\sim 90^\circ$ y altos para ángulos

>90°. Imágenes representativas de estos experimentos se muestran en la **Figura 5.2**. En cuyo caso había corrientes dentro de la habitación.

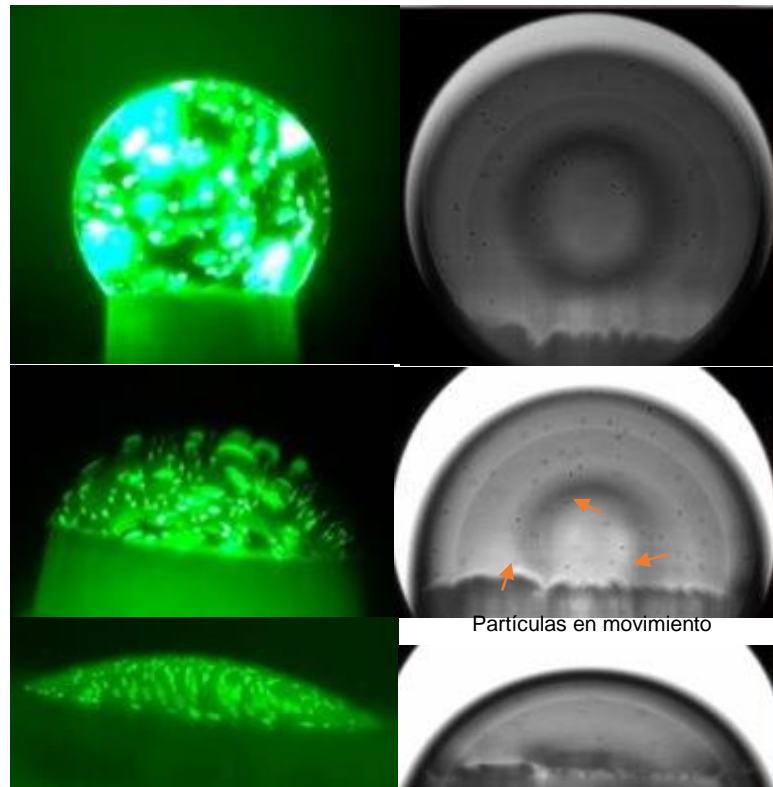


Figura 5.2: Imágenes representativas de experimentos de visualización de movimiento de partículas en una gota durante el primer minuto de evaporación. El efecto del ángulo de contacto inicial se percibió cualitativamente pero no fue posible cuantificarlo.

La evaporación bajo un régimen limitado por transferencia se puede alcanzar con un flujo de aire que retire el vapor de agua de la zona cercana a la superficie de la gota. Es muy probable que las corrientes de aire presentes en el laboratorio donde se realizaron los experimentos hayan tenido el mencionado efecto. Siendo así, consideremos que en el modelo teórico se encontró una tasa de evaporación proporcional al área superficial disponible en la gota, esta es mayor para una gota de mayor ángulo de contacto, aunque se trate del mismo volumen.

Si el movimiento de las partículas se da por flujos capilares desencadenados por moléculas en el bulto que se desplazan a la superficie para reemplazar a las que se han evaporado, se puede esperar un mayor movimiento dentro de la gota cuanto más esférica sea esta ya que su interfaz líquido-vapor tiene mayor área superficial.

5.6.2 Visualización de líneas de corriente dentro de la gota bajo dos regímenes de evaporación, limitado por tasa de transferencia y limitado por difusión, a diferentes ángulos de contacto.

Las líneas de corriente dentro de gotas que se evaporan en pilares de diferentes diámetros (y en consecuencia diferente ángulo de contacto), fueron visualizadas con ayuda de colorante alimentario. Bajo la condición de evaporación limitada por difusión no se visualizaron corrientes bien definidas, sino que más bien parecía que la evaporación era lo suficientemente lenta para permitir que el mezclado en el interior de la gota también se diera por simple difusión, como se observa en las imágenes de la columna izquierda en la **Figura 5.3**. En cambio, durante la evaporación limitada por la tasa de transferencia se distinguen líneas de corriente que giran en un mismo sentido, el cual coincide con el flujo de aire incidente sobre la gota.

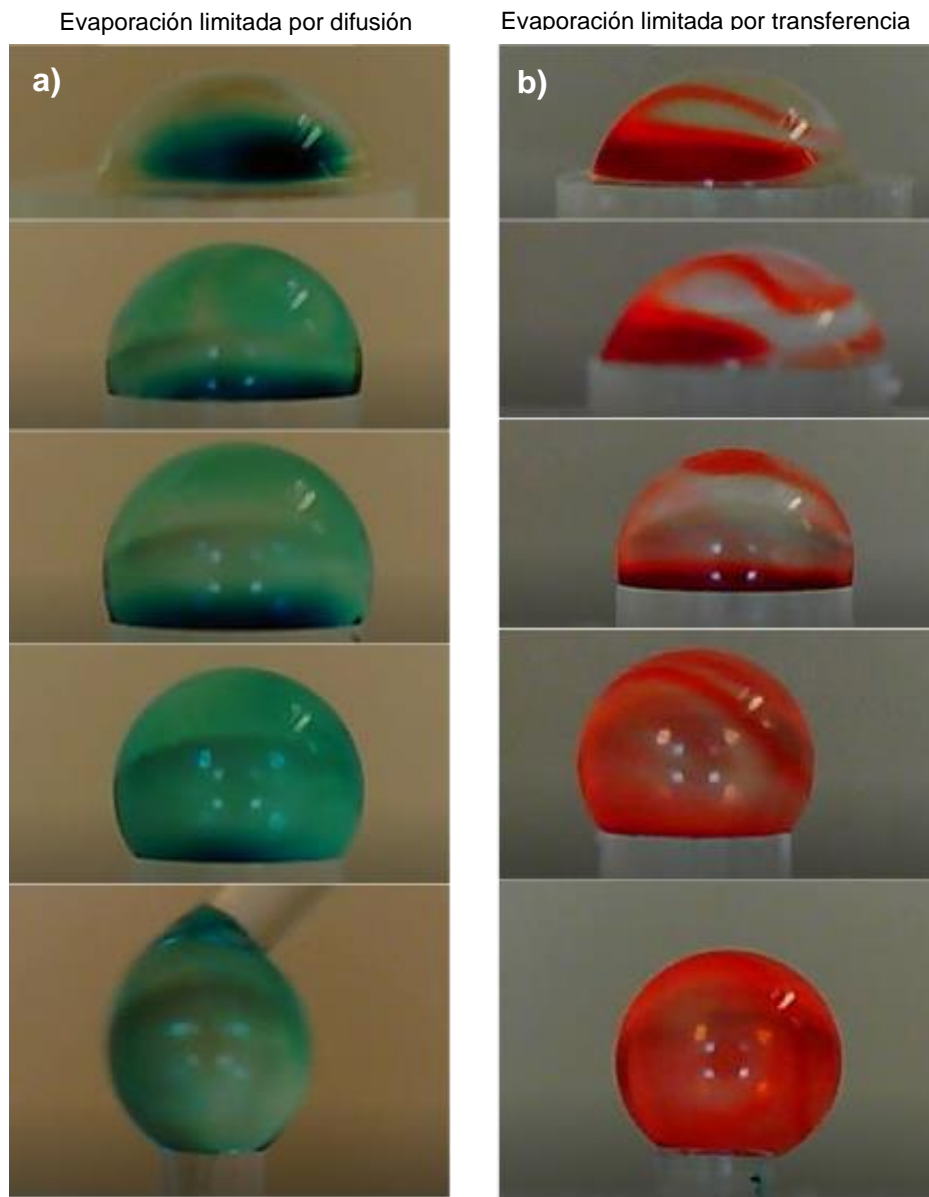


Figura 5.3: Mezclado en el interior de una gota de 1.5 μl evaporándose en pilares de 3mm, 1.8 mm, 1.6 mm, 1.4 mm y 1.2 mm, bajo dos regímenes de evaporación; a) limitada por difusión y b) limitada por transferencia. La velocidad de mezclado es afectada por el diámetro del pilar/ángulo de contacto y el sentido de las corrientes es afectado por el flujo de aire incidente. Las imágenes mostradas corresponden a los primeros 5 s de evaporación.

De acuerdo con lo observado, al tener un pilar de menor diámetro se obtiene una gota de mayor curvatura, teóricamente esto aumenta la presión interna de la gota (61) lo cual tiene un efecto en la evaporación reduciéndola (29, 73), es decir, pilares más pequeños en este rango hacen más largo el tiempo de evaporación total, al menos para evaporación limitada por difusión. A pesar de que en un pilar más pequeño la tasa de evaporación promedio es menor, la velocidad de mezclado

es mayor, como se puede ver en la **Tabla II**. También puede apreciarse en la imagen de la esquina inferior izquierda en la **Figura 5.3**, donde, justo al colocar la gota sobre el pilar más pequeño sin presencia de corrientes, se inicia el mezclado. Esto pudiera deberse a algún movimiento de acomodo del fluido al tomar la forma esférica ya que esto implica el efecto de la tensión superficial.

Por otro lado, una forma de esfera más completa pudiera permitir un efecto hidrodinámico distinto causado por las “paredes” internas de la gota. Un fenómeno que explica Ding (74) en su trabajo de generación de corrientes asimétricas mediante ondas acústicas transmitidas a través del sustrato, con la notable diferencia de que, en nuestro caso, la fuerza sería transmitida a través de la interfase líquido-vapor, cuando se aplica una corriente de aire.

Otro efecto que puede presentarse es aquel de la evaporación local facilitada en el punto de incidencia de la corriente de aire, lo cual puede estar generando un efecto comparable al de la asimetría en las corrientes internas de la gota, por la evaporación localmente reducida mediante la presencia de una gota vecina (75).

Tabla II. Tiempo de mezclado para diferentes condiciones de evaporación de gota

Diámetro de pilar/ AC	Régimen de evaporación	
	Limitado por Difusión	Limitado por Transferencia
2.00 mm/ 68°	1 min 30 s	20 s
1.8 mm/70°	1 min 15 s	13 s
1.6 mm/92°	1 m 10 s	15 s
1.4 mm/110°	1m 20 s	11 s
1.2 mm/140-150°	16 s	10 s
promedio	1 minuto	14 s

5.6.3 Reacción enzimática facilitada por corrientes de Marangoni

Al llevar a cabo la reacción química se consideró la formación de gradientes de temperatura y de soluto para producir corrientes de Marangoni. Adicionalmente se favoreció el mezclado al dirigir una corriente de aire que alejara las moléculas de vapor de la interfaz líquido-vapor una vez que escapaban de la fase líquida.

La primera gota que se coloca contiene todos los componentes necesarios (excepto la glucosa) para desarrollar la reacción en las proporciones evaluadas y

determinadas previamente, esta gota es de un volumen de 2 μl lo que puede ser un poco elevado para un pilar de 0.8 mm, con lo que se consigue un ángulo de contacto de 145° , pero por encontrarse a una baja temperatura de 4°C , la tensión superficial es favorablemente alta, por lo que no se afecta su forma esférica (**Figura 5.4a**). Un ángulo elevado también favorece la formación de corrientes. Conforme la gota se evapora hasta 500 nl para concentrar los reactivos 4X reduce su volumen al tiempo su temperatura tiende al equilibrio con el resto del sistema que se encuentra a 25°C (**Figura 5.4b**). Una vez llegado a este volumen se adicionó una gota de 1 μl de solución de glucosa, de este se generaron las corrientes de Marangoni debidas a un gradiente térmico.

Llegar a una temperatura de 25°C es necesario para una adecuada actividad enzimática, la cual tiene su máxima eficiencia a 20°C para la peroxidasa y a 35°C para la glucosa oxidasa. A 25°C la glucosa oxidasa tiene un 85% de actividad enzimática lo cual aún representa una eficiente actividad. Una temperatura mayor podría reducir inconvenientemente la tensión superficial afectando la esfericidad y haciendo a la gota vulnerable a derrames por las perturbaciones que añade la corriente de aire.

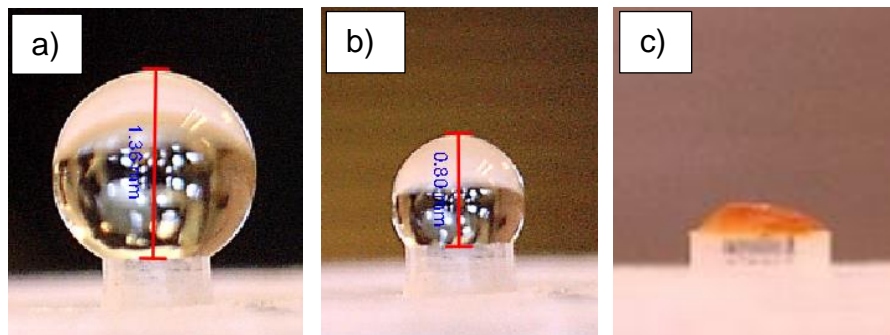


Figura 5.4: Perfiles de gotas durante un ensayo de detección de glucosa; a) 2 μl de mezcla de reactivos GOx/HRP/ KI/buffer a 4°C , b) gota concentrada 4x (500 nl) a 25°C y c) gota al final de la prueba. Los productos de esta reacción no evaporan.

Al adicionar la muestra de glucosa a analizar, el volumen de la gota llega a 1.5 μl y debido a que se tienen diferentes soluciones, se presenta una heterogeneidad en la composición de la gota lo cual permite generar corrientes de Marangoni por gradientes de soluto.

Una vez que las moléculas presentes participan en las reacciones en serie descritas en la parte de métodos, se observa un cambio de color, el cual también nos facilita el observar la generación de las corrientes en forma de vortice (**Figura 5.5**).



Figura 5.5: Visualización de las corrientes de Marangoni durante un ensayo de detección de glucosa. Se observa una forma de vórtice en el sentido del flujo de aire incidente, a diferencia de la clásica forma toroidal.

Conforme el volumen de la gota decrece, la altura lo hace de manera asintótica sin llegar a un valor de cero (**Figura 5.4c**), tal como en los experimentos de evaporación de mezclas binarias y complejas evaluadas en el capítulo 4 para los modelos de Agua-PEG 10% y plasma sanguíneo. Se supone un incremento en la viscosidad de la solución conforme la concentración de productos aumenta, éste inhibe las corrientes formadas. La distribución de partículas coloreadas se muestra homogénea dentro de la gota al final de la evaporación (76). Con ayuda de MATLAB se determinó la intensidad del color para hacer la curva de calibración con concentraciones que en rango fisiológico abarcan situaciones de hipoglucemia a hiperglucemia, observándose una relación semilogarítmica lineal, excepto en el último punto el cual excede dichas concentraciones fisiológicas (**Figura 5.6**).

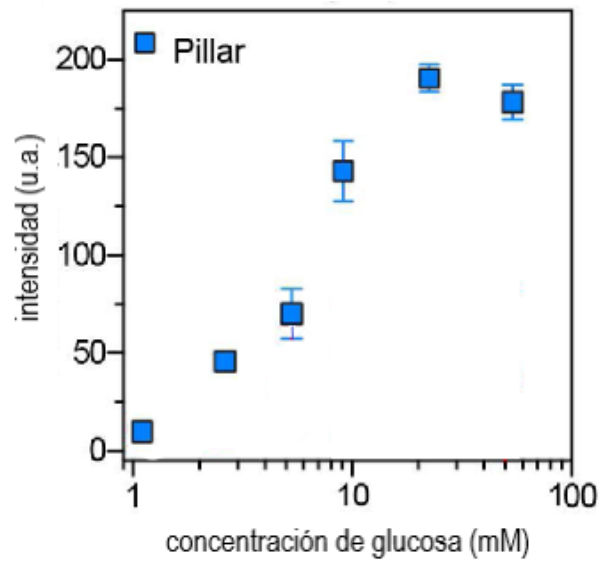


Figura 5.6: Curva de intensidad de color final en un ensayo de detección de glucosa por evaporación de gotas para un rango de concentraciones fisiológicas.

Estos experimentos se realizaron usando soluciones acuosas de concentraciones conocidas de glucosa. En pruebas reales con plasma sanguíneo las características de este fluido podrían aumentar drásticamente la viscosidad frenando anticipadamente las corrientes de Marangoni. Por lo que un nuevo ajuste debería hacerse, por ejemplo, incrementando la temperatura de la reacción para mayor fluidez o bien, usar otro fluido como lo es la orina, aunque esta última tiene concentraciones mucho menores de glucosa. Una prueba rápida de este ensayo se realizó con soluciones de orina artificial comercial a las cuales se agregaron concentraciones fisiológicas de glucosa (ver sección de métodos) (**Figura 5.7**).

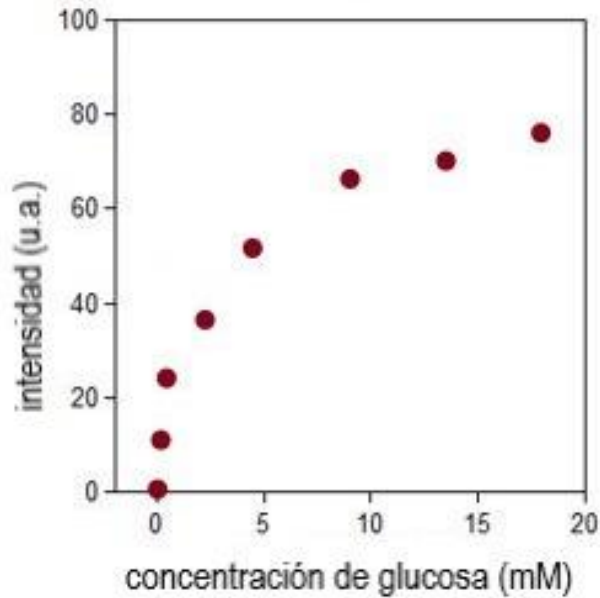


Figura 5.7: Residuos sin evaporar de un ensayo de detección de glucosa en orina artificial.

Con esta prueba no hubo algún problema para obtener los gradientes de color, aunque un detalle a tener en cuenta es que el pH puede variar entre una muestra de orina y otra, y por lo tanto afectar la intensidad de color generada. Por lo que una curva de calibración deberá realizarse con cada prueba.

5.7 Conclusiones y perspectivas

Existe un efecto en la velocidad de mezclado cuando se emplean diferentes pilares. Los pilares de menor diámetro forman gotas de mayor ángulo de contacto y los experimentos mostraron que el movimiento es mayor dentro de una gota cuanto más esférica es, independientemente del régimen de evaporación. De los dos probados, el régimen limitado por la tasa de transferencia muestra mayor velocidad de mezclado que el limitado por difusión.

A pesar de que en un pilar más pequeño la tasa de evaporación promedio es ligeramente menor para el caso de la evaporación limitada por difusión, la velocidad de mezclado se observó ser mayor. Esto puede ser bien aprovechado para aquellas

reacciones que requieran de agitación para aumentar la interacción entre moléculas de las sustancias reactivas.

A diferencia del clásico patrón de corrientes de Marangoni en forma toroidal, nuestros resultados muestran que los movimientos no son axisimétricos, sino que forman un solo vórtice. Podemos suponer que esto se debe a que el flujo de aire está siendo inducido por un lado de la gota más que en otro, generando una asimetría en el flujo de vapor y probablemente una tensión en la superficie de la gota que arrastra capas de fluido subyacentes.

El efecto que tiene la geometría de las gotas en el transporte de masa influye en la evaporación, y a su vez en la velocidad de corrientes formadas interior de la gota, lo que se refleja en un mejor mezclado y la supresión del anillo de café, comúnmente formado en superficies planas.

Mejores estudios para determinar no solo cualitativa sino cuantitativamente la velocidad y dirección de estas corrientes conforme cambia la forma de la gota, podrían ayudar en una mejor planeación experimental para aplicar en otros ensayos que requieran de mezclado.

6. Desarrollo de una reacción de conjugación de BSA-BPB para la detección de albúmina mediante evaporación limitada por difusión.

Se realizó un ensayo de detección de Albúmina de suero bovino (BSA) mediante el colorante Bromofenol azul (BPB), el cual indica la concentración de BSA mediante un cambio de color. El ensayo se ajustará a las características de los reactivos utilizados y al mecanismo de evaporación limitado por difusión. La tensión superficial en este caso es menor a la del ensayo de glucosa (por contener alcohol), no se provocan corrientes por gradiente térmico, sino que se permite una reacción dependiente de la difusión, la reducción del volumen por la evaporación favorece el encuentro de moléculas y la correspondiente concentración de color.

6.1 Introducción

6.1.1 Ensayo de detección de albúmina

La albúmina se encuentra en la sangre y es filtrada por los riñones cuando estos funcionan adecuadamente, permitiéndose una pequeña cantidad de esta proteína en la orina. Pero cuando los riñones se encuentran dañados, por ejemplo, como consecuencia de la diabetes, alta presión sanguínea, fallas en el corazón, cirrosis y lupus (77), se presenta una fuga de cantidades anormales, a esta patología se le conoce como albuminuria.

Distintos métodos para la identificación de concentración proteica han sido desarrollados en el campo de la microfluídica, los principales son aquellos basados en papel cromatográfico (78, 79). En estos se presenta un cambio de color el cual es comparable a la intensidad en una curva de calibración, típicamente lineal, hasta una concentración de saturación.

Entre los trabajos de detección de albúmina se ha empleado principalmente un colorante conocido como 3',3", 5', 5"-tetrabromofenolsulfonphtalein (TBPB) o bien solo bromofenol azul (por sus siglas en ingles BPB), el cual cambia de color amarillo a azul en la presencia de albúmina de suero bovino (BSA) (80).

Las propiedades espectrales de los colorantes utilizados son altamente dependientes de la polaridad del solvente y el pH, los enlaces colorante-proteína pueden además precipitarse en condiciones ácidas (81, 82).

La albúmina puede ser determinada en una variedad de formas, la más simple es mediante el enlace con algún tinte o colorante, en el cual el cambio de color es observado conforme se da un enlace a las proteínas. Colorantes como: 2-(4'-hydroxyazobenzene) acido benzoico (HABA), verde de bromocresol, azul de bromocresol y tetrabromofenol azul (TBPB), también llamado bromofenol azul (BPB). Los colorantes se enlazan a sitios de enlace fuertes y débiles, los sitios de enlace fuertes son los primariamente responsables del cambio de color (83).

En la orina podemos encontrar componentes diversos como fragmentos de proteínas, péptidos y poliaminas. De las muchas proteínas comúnmente encontradas en la orina, la albúmina da el mayor color por gramo de proteína conforme esta se enlaza al colorante. Una limitante del enlace proteína-colorante es que otras proteínas pueden también enlazarse y dar un cambio de color e incrementar falsamente el resultado de concentración de albúmina detectado. Metabolitos y drogas generalmente no interfieren con las mediciones. Falsos positivos se obtienen al usar soluciones con alta fracción de buffer o en orinas alcalinas. El enlace del colorante a la albúmina presenta una mejor coloración a pH 1.8, es inhibido al incrementar la concentración del buffer (84). La interacción BPB-BSA puede ser afectada por la presencia de urea en altas concentraciones ya que reduce la absorbancia del complejo por desnaturalización (85). Algunos métodos reportados no tienen una sensibilidad química para detectar concentraciones menores a 300 mg/L.

6.2 Marco teórico

El bromofenol azul (BPB) es usado como un indicador de pH o colorante. Como indicador de pH, es amarillo por debajo de un valor de 3.0, y azul por arriba de 4.6,

siendo este cambio de color reversible. El bromofenol azul es la sustancia que tiene el más grande cambio de tonalidad cuando el espesor o concentración de la muestra varía (86). Es soluble en agua 3.5×10^{-4} mg/L a 25 °C (~ 0.4 g/100mL), pero mayormente soluble en alcohol metílico (100 mg/100 mL) (87) (ver Apéndice DII).

6.2.1 Gota en evaporación limitada por difusión y su uso en ensayos

Se ha descrito en capítulos anteriores que la evaporación de gotas sobre pilares limitada por difusión es más lenta que aquella limitada por la tasa de transferencia de moléculas de la fase líquida a la fase vapor, y también, que en el interior de estas gotas pueden no presentarse movimientos de agitación vigorosa como en aquellas que se evaporan con ayuda de una corriente de aire.

Cuando se tienen componentes más volátiles en una reacción y la evaporación en sí es rápida, no se requiere de favorecerla mediante la eliminación del paso de difusión de las moléculas evaporadas. Es probable también que no se requiera de una agitación vigorosa para provocar la reacción.

En el caso de una gota en evaporación limitada por difusión, donde hay dos componentes o más, la diferencia en volatilidades de éstos componentes genera un gradiente de composición en la interfaz líquido-aire, que es donde se da la evaporación. Cuando existe más de un componente en una solución debe considerarse que las propiedades de esta cambian dependiendo de la composición; densidad de masa, viscosidad, tensión superficial, coeficiente de difusión mutua y actividades termodinámicas (77). Esto trae una variedad de efectos que van desde flujo de Marangoni por concentración de soluto hasta la desviación de la típica forma de casco esférico. Las corrientes producidas pueden ser muy débiles como para crear líneas de corriente visibles, pero suficientes para mezclar los componentes en la solución y permitir su reacción.

6.3 Justificación

Se ha demostrado que una superficie hidrofóbica permite una mayor concentración de analito por unidad de área, ya que al reducirse el radio de contacto con el tamaño de la gota conforme esta se evapora, los solutos contenidos en la solución se concentran depositándose en un área menor (88). El análisis de color de gotas de una solución homogénea puede ser un método sencillo para evaluar la

concentración y la cinética de la reacción sin necesidad de equipo costoso o de difícil acceso. Ni siquiera se requiere que la línea de contacto sea retráctil, pues con la ayuda del pilar se tiene una alta relación de volumen por área de sustrato similar a la de una superficie superhidrofóbica.

De acuerdo con lo descrito, la detección de proteínas representa un ensayo factible para ser desarrollado en evaporación de gotas sobre un pilar. El amplio cambio de coloración que ofrece el BPB en solución es útil para medir diferentes concentraciones. La importancia de este ensayo y la facilidad de obtener una muestra de orina son un área potencial para aplicar este tipo de estudios, que, aunque se han manejado ya desde hace tiempo en tiras de papel, no ofrecen la homogeneidad requerida lo que lleva a errores de medición, además de que ciertas características del papel pueden llevar a obtener falsos positivos.

6.4 Objetivo

Desarrollar un ensayo colorimétrico de detección de proteína BSA en solución acuosa y en orina artificial mediante el cambio de color de una gota en evaporación limitada por difusión sobre un pilar.

6.5 Metodología

6.5.1 Prueba de detección de albúmina en papel

Para realizar los ajustes de proporción de reactivos se reprodujo primeramente la reacción en papel desarrollada por Martinez (89). Posteriormente, y en base a estos resultados se realizaron los cambios necesarios para desarrollarla en gotas. Una gota de 0.3 μ l de una solución base compuesta por 92% agua, 8% etanol y buffer de citratos 250 mM a pH 1.7 fue colocada en papel cromatográfico (3030-861 3mm, Whatman), esta se permitió secar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó una gota de 0.3 μ l de bromofenol azul (BPB) 3.3 mM en 95% etanol y se permitió secar por 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, finalmente 0.3 μ l de una solución de BSA 5 mg/ml fue pipeteado sobre esta zona y se permitió evaporar (ver Apéndice DII).

6.5.2 Prueba de detección de albúmina en gotas

Una solución amortiguadora de citratos 125 mM a pH 1.8 fue preparada en agua 92% y etanol 8%, v/v. Una solución de bromofenol azul (BPB) 9 mM fue preparada en 95% etanol, 5% agua. Ambas soluciones fueron mezcladas en una proporción 10:1. Se prepararon soluciones de albúmina de suero bovino en un rango de concentraciones de 10-60 μ M. Una gota de 0.8 μ l de la mezcla que contenía el bromofenol azul (BPB) fue colocada sobre el pilar y se permitió su completa evaporación en oscuridad, de esta manera se consiguió preparar la superficie. Posteriormente se agregó una gota de 0.8 μ l de la muestra de la proteína albúmina de suero bobino (BSA) permitiendo reaccionar durante la evaporación por simple difusión. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C y H.R. 30%. El uso de flujo de aire no fue necesario (ver Apéndice DIII).

6.5.3 Medición de curva de calibración y cinética de reacción

Imágenes secuenciales fueron tomadas para el análisis del cambio de color de las gotas durante la reacción. Las imágenes se analizaron mediante un script de MATLAB usando el canal K del sistema de colores CMYK. El cambio de color fue monitoreado cada 30 s para visualizar la cinética de la reacción y el máximo color obtenido para cada concentración fue elegido para la curva que relaciona intensidad de color con concentración de BSA.

6.6 Resultados

6.6.1 Detección de albúmina

Con la finalidad de obtener un balance entre la intensidad de color obtenido y la tensión superficial suficiente para mantener de pie a la gota, se probaron diferentes proporciones de componentes en la solución, así como volúmenes de la gota (Apéndice DII). Finalmente se utilizó una solución de BPB 9 mM para la mezcla de ambas soluciones de reactivos, la solución base donadora de protones (diluida mayormente en agua) con la solución de indicador de color (diluida mayormente en alcohol) a una proporción 10:1. El volumen final de la gota tanto para los reactivos de base como la muestra de BSA fue de 0.8 μ L. La mezcla final fue utilizada para preparar la superficie con una capa del colorante indicador BPB, la cual presentó un

color amarillo homogéneamente distribuido sobre el pilar como se observa en la **Figura 6.1**.

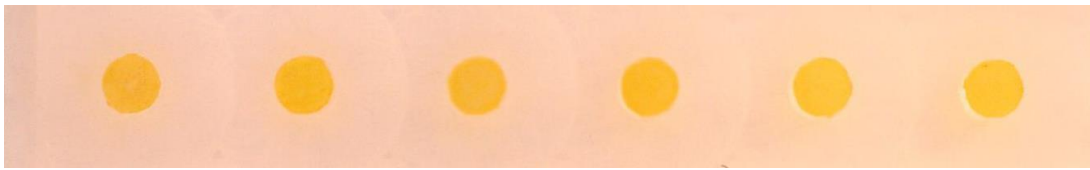


Figura 6.1: Preparación de pilares para un ensayo de detección de BSA. La superficie del pilar muestra una coloración amarilla homogénea por la capa de BPB.

Tras colocar las gotas de BSA de diferentes concentraciones ($10 \mu\text{M}$ – $60 \mu\text{M}$) sobre cada pilar previa preparación, se observó un cambio de coloración que iba de amarillo a azul verdoso, pasando por diferentes tonalidades de verde. La velocidad e intensidad de este cambio fue correspondiente con la concentración de la solución de BSA pipeteada (**Figura 6.2**).

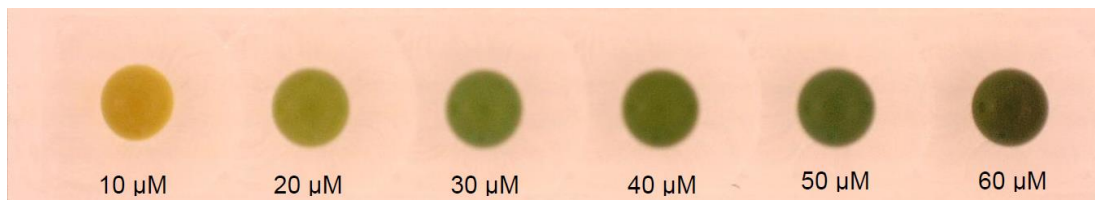


Figura 6.2: Cambio de coloración para diferentes concentraciones de BSA en solución después de 10 minutos.

En la **Figura 6.3** se puede observar una secuencia de imágenes del perfil de la gota durante un ensayo de detección de BSA.

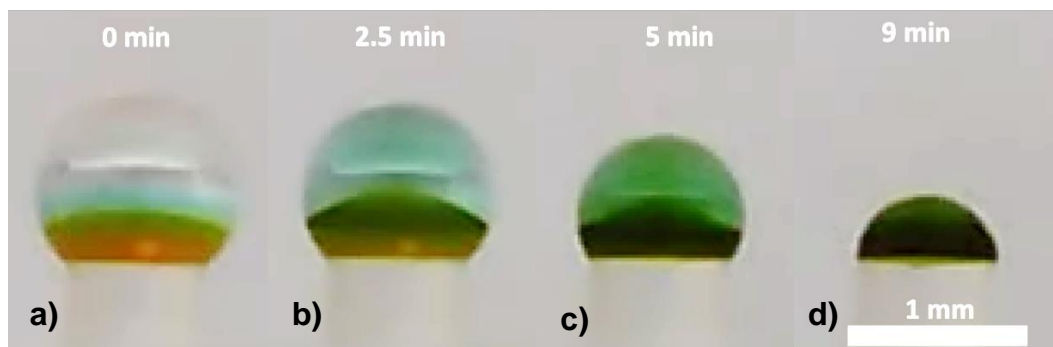


Figura 6.3: Difusión de componentes dentro de la gota durante la evaporación por difusión. No se observan líneas de corriente bien definidas sino más bien un prevaleciente proceso difusivo con un gradiente normal a la superficie.

Casi inmediato a la colocación de la solución con BSA se observa un gradiente de color que es normal a la superficie, en la parte más alta de la gota vemos ausencia de color, lo cual corresponde a el BSA incoloro, conforme este se conjuga con el BPB adquiere un color azulado, que es la primera franja que se observa de arriba hacia abajo en la gota. Posteriormente se ve un color verde que corresponde a la mezcla de BPB conjugado y el libre, encontrándose en la zona más cercana a la superficie el color amarillo característico de la solución reactiva de bromofenol no conjugado.

6.6.2 Curva de calibración y cinética de reacción

En la **Figura 6.4** se muestran los datos obtenidos para el cambio de color cada 30 s, donde se puede observar la intensidad media de la gota durante el tiempo de evaporación para seis concentraciones y un control. Esta aumenta con el tiempo y conforme llega al final de la evaporación la intensidad de color decrece (esta última parte no se muestra en la gráfica). Si se toma el valor más alto de la coloración el cual se presenta a los 10 minutos se puede formar la curva de calibración de la **Figura 6.4b** donde se observa una relación creciente que corresponde con la concentración de BSA en solución.

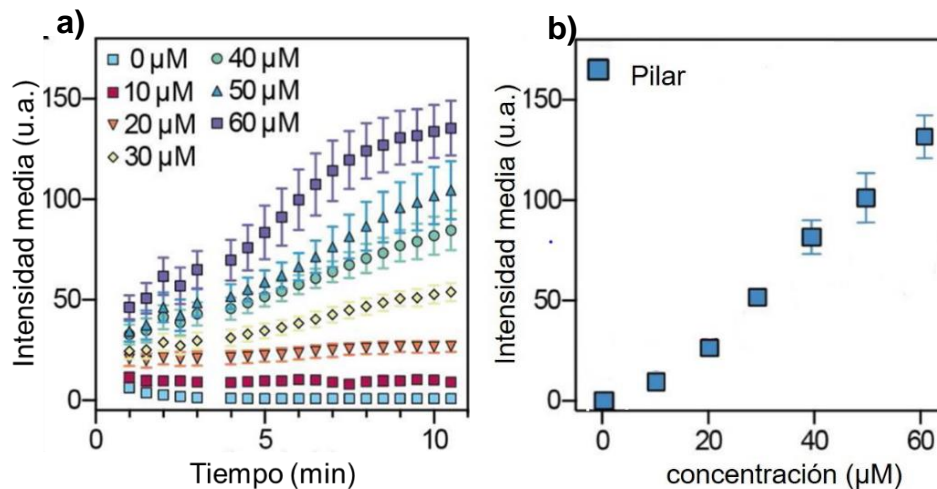


Figura 6.4: Intensidad de color indicando la cinética de la reacción para diferentes concentraciones de BSA. a) incremento de BSA conjugado en el tiempo, b) máximo color obtenido al minuto 10.

Se obtuvo una curva de coloración donde la intensidad media presenta dos rectas con diferente pendiente respecto a la concentración, la primera de 0-20 µM y

la segunda de pendiente mayor, de 20 -60 de tal como se esperaba, para un rango de 0-60 μM (**Figura 6.4b**). Los resultados fueron comparados con el mismo ensayo sin usar pilar, es evidente la formación del anillo de café en la superficie plana comparada con el color más homogéneo del ensayo en pilar (**Figura 6.5**). Esto es más notable en concentraciones por debajo de 40 μM donde hay una diferencia en el color de la pared la cual luce amarilla mientras que el centro del spot presenta una coloración verde.

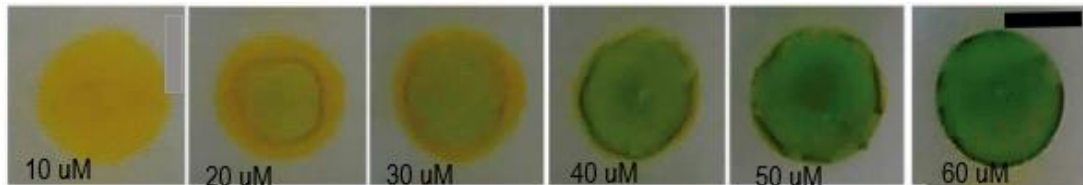


Figura 6.5: Ensayo de detección de albúmina mediante evaporación de gotas en una superficie plana de PMMA. Barra de escala 1 mm.

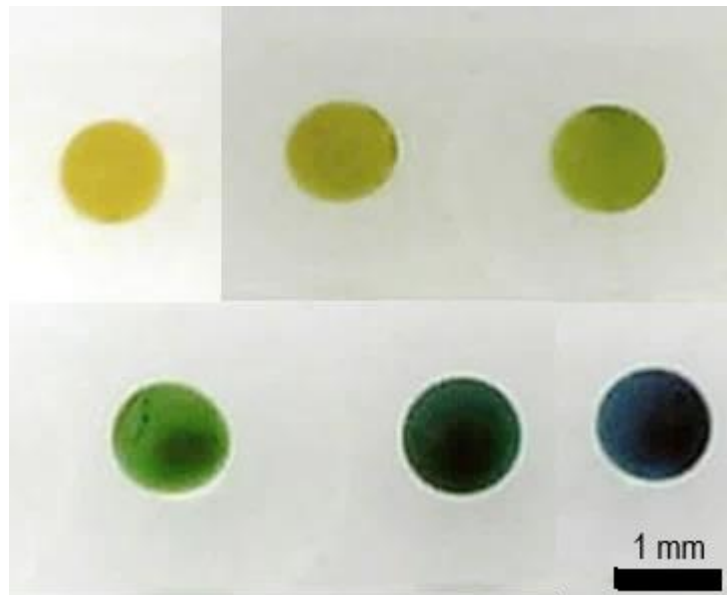


Figura 6.6: Ensayo de detección de albúmina en orina artificial.

En el ensayo realizado con orina artificial se observó que el color desarrollado tenía algunas variaciones respecto a aquel realizado con soluciones acuosas (**Figura 6.6**). Aspectos como el pH de la orina o el grado de dilución de esta pueden provocar cambios de coloración. Por esta razón es necesario realizar una curva de calibración con cada muestra real para evitar errores en la medición.

6.7 Discusión

En el uso de la técnica de evaporación sobre un pilar para la realización de un ensayo de detección de proteína BSA, el volumen y los pasos a seguir fueron ajustados al tipo de soluciones requeridas para llevar a cabo la reacción. El mecanismo de reacción es diferente del ensayo de glucosa y la presencia del etanol en la solución marcó una notable diferencia en el volumen soportado por el pilar. Las características de las soluciones son diferentes a las del ensayo del capítulo anterior (volatilidad, tensión superficial y mecanismo de reacción). Una de las principales variantes fue que, el proceso de evaporación se dio por difusión, sin la necesidad de un flujo de aire que lo facilitara, y aun así se obtuvo una distribución homogénea del color (indicador de la presencia del conjugado BPB-BSA).

Respecto al ensayo para la detección de glucosa del capítulo anterior, las gotas empleadas en este ensayo son de menor volumen y menor ángulo de contacto lo que se relaciona con un bajo número de Marangoni (25). La evaporación total no fue necesaria pues el efecto cromógeno se pierde, por lo que debe tomarse el punto máximo de la intensidad en la curva. El protocolo debe ser ajustado a los parámetros de interés, pues el equilibrio químico y el método de enlace de los colorantes utilizados requieren condiciones de tiempo de reacción y temperatura óptima (90).

La reacción se llevó a cabo en dos pasos, uno de preparación o funcionalización de la superficie, y otro de la adición de la muestra para la detección de la proteína en un rango de concentración clínicamente relevante (0–60 μM). Las soluciones comenzaron a mezclarse y producir inmediatamente un cambio de color que va de amarillo a azul, pasando por verde, para bajas y altas concentraciones respectivamente, el cambio puede distinguirse a partir del primer minuto.

Una evaporación más rápida es posible si se reduce la humedad relativa, en este experimento se consiguió una reducción de hasta 30% lo que daba un pico de intensidad más alto a los 4 minutos y entonces el color comenzaba a menguar, una vez evaporados en su totalidad todos los pilares volvían a su coloración amarilla inicial previa a la adición de BSA.

Cabe mencionar que al colocar una gota de agua mili-Q después del secado, aun en días posteriores, el color vuelve a tornarse azul, y aun con mayor intensidad, lo que pudiera servir para una lectura post prueba, aunque habría que corroborar que la lectura obtenida sea la misma. Ya que el tetrabromofenol azul puede presentar enlaces no específicos además de cambios en la absorción si existen contaminantes (90).

En cuanto al mezclado de los reactivos dentro de la gota, la volatilidad representa la tendencia de una sustancia a pasar a la fase vapor a una temperatura dada, las sustancias con mayor presión de vapor se evaporan más fácilmente. Los solventes base de la reacción en cuestión son agua y etanol los cuales son completamente miscibles entre sí. Tomando como referencia al agua, el etanol es mucho más volátil (presión de vapor $H_2O=0.0231$ atm y $EtOH=0.0776316$ atm a $20^{\circ}C$), menos denso ($H_2O=1$ g/cm³ y $EtOH=0.789$ g/cm³) y de menor tensión superficial ($H_2O=72.75$ y $EtOH=23.1$ din/cm) (23). Como consecuencia, la mayor tasa de evaporación del etanol cambia la fracción en solución durante la evaporación. Los gradientes de concentración son responsables de generar los gradientes de tensión superficial, La velocidad aumenta con la diferencia de tensión superficial. Los gradientes son contrarrestados por un flujo de líquido que tiende a restaurar la condición inicial.

Si observamos detenidamente en la **Figura 6.3b-c** se puede apreciar una tendencia a la formación de corrientes de tipo toroidal característica, que diversos autores han encontrado al interior de gotas en evaporación (91). Si bien, estos no se asemejan a los presentados en el estudio de Diddens (92) durante la evaporación de una gota de agua-etanol, ya que en su campo vectorial se observan dos vórtices a cada lado de la gota y en este ensayo se observa solo uno. Debemos considerar que en nuestro caso la presencia de proteínas en la solución puede ser motivo de una mayor viscosidad. De acuerdo con otro estudio del mismo Diddens (69), la viscosidad tiene el efecto de atenuar la fuerza de las corrientes, reduciendo en número de vórtices en el interior de la gota.

En cuanto a la intensidad de color que se obtienen con las gotas, es notorio que al evaporar la gota sobre un pilar se obtiene un color más homogéneo que el que se presenta en la superficie superhidrofóbica compuesta por múltiples pilares donde también se emplea evaporación de gotas (84). Así mismo al comparar con el caso

de los ensayos que emplean el mismo sistema de conjugación BPB-BSA en papel, se observa un color mucho más uniforme que se obtiene en 10 minutos o menos y que, para un ensayo de tipo colorimétrico es una característica que debe cuidarse para tener una menor variación en los resultados (ver Apéndice DII).

6.8 Conclusiones y perspectivas

Este ensayo aprovecha la concentración por evaporación y el mezclado para detectar y medir la presencia de albúmina de suero bovino BSA mediante un cambio de coloración.

En el caso del ensayo de detección de BSA, la reacción de conjugación se da casi de manera instantánea y no se requiere de una temperatura cálida para un mejor rendimiento (como en el caso de las reacciones enzimáticas). A pesar de que la especificidad de BPB no es alta y que existen variantes que pueden afectar los resultados, como el pH, éstas pueden ser verificadas.

A diferencia de otros ensayos que concentran una solución en una superficie superhidrofóbica hasta reducir su diámetro a micras debiendo ser analizado en equipo especial, en nuestro pilar la concentración se da en un área aproximada de 0.8 mm^2 , el color y el tamaño son visibles al ojo humano, y la medición bien puede adaptarse a aplicaciones para teléfonos celulares que calculen la concentración de albúmina en muestra a partir de una fotografía.

7. Cultivo de células en gotas sobre pilares mediante la inhibición de la evaporación.

En este capítulo se explican las consideraciones a tomar para adaptar el uso de los pilares al cultivo de células como evaporación, diseño de dispositivo, distribución uniforme de humedad, tratamientos pro-adhesión, concentración celular, viabilidad. Además, se discutirán las razones por las que se tuvo dificultad en el proceso, sustentando los argumentos con referencias bibliográficas.

7.1 Introducción

Los ensayos basados en células son una herramienta que permite la obtención de datos de diversa índole, representando gran parte de los ensayos totales (93, 94). En recientes años se ha desarrollado tecnología de deposición robótica en placas de 1536 pozos para hacerlos más eficientes (95, 96). Sin embargo, el número de células requeridas, como en el caso de las células primarias, puede no estar disponible en suficiente cantidad. Mientras que reducir el volumen en las placas de pozos puede ser problemático debido a la evaporación y fuerzas capilares (97, 98).

La elección de una plataforma multi-ensayos debe considerar aspectos como el costo y facilidad de producción, así como la complejidad y el comportamiento celular para determinar su validación. Contar con una estructura que ayude a aprovechar el espacio disponible de una manera simple y eficiente permitiendo el suministro de nutrientes y CO₂ necesarios para el crecimiento celular, al mismo tiempo que se mantenga aislado cada grupo de células sin riesgo de migración o contaminación.

El incremento en la relación volumen/área de sustrato que se puede alcanzar en un pilar de PMMA, puede ser aprovechado para el cultivo celular manteniendo una buena cantidad de nutrientes disponibles para un área de cultivo determinada,

al mismo tiempo que puede mantener aislados pequeños cultivos celulares en un mismo dispositivo (99).

La presión interna de la gota, al ser positiva puede reducir la tasa de evaporación con respecto a una superficie plana o cóncava como en el caso de los pozos de placas de volúmenes equivalentes (29). Sin embargo, debe considerarse que en la manipulación durante el proceso de cultivo la estabilidad de las gotas se encuentra vulnerable a fuerzas externas como gravedad, vibración, presión.

Para conseguir que el volumen de la gota sea suficiente para suplir nutrientes al cultivo y al mismo tiempo mantenerse en pie sobre el pilar, es necesario evaluar la relación entre el diámetro de pilar y el tamaño de la gota que nos permitan tener la mayor relación volumen de medio de cultivo sobre área de superficie de sustrato, pero al mismo tiempo reduciendo el colapso de las gotas. Esta relación de volumen máximo se midió considerando las condiciones de cultivo convencional, usando el medio de cultivo correspondiente y una temperatura de 37°C en una atmósfera de CO₂, 5% y alta concentración de vapor.

7.2 Marco teórico

7.2.1 Separación mínima entre dos gotas para no ser afectadas por la evaporación de la gota vecina

Se ha observado que la evaporación se vuelve asimétrica y reducida debido al enriquecimiento de vapor en un espacio constreñido. Sin embargo, existe una distancia de separación crítica más allá de la cual una gota no es afectada por la presencia de la otra. Shaikeea y Basu (75) determinaron una relación entre la separación mínima entre dos gotas y su diámetro para que el flujo de evaporación no se vea afectado cuando estas se encuentran en una cercana proximidad. Su estudio aplica para gotas de ángulos de entre 110° y 160°, con ángulos de contacto de histéresis muy bajos ($ACH < 10^\circ$).

Cada gota presenta un flujo de evaporación, y su correspondiente campo de vapor, el cual es reducido en la presencia de una segunda gota, especialmente si ésta se encuentra interactuando fuertemente en su campo de vapor (75). El efecto de una gota vecina puede ser tal que se han llegado a observar ángulos de contacto asimétricos en la región del domo de vapor (75). De acuerdo con Shaikeea, más allá

de cierta distancia de separación crítica el flujo de cada una de las gotas no presenta asimetría detectable para radios de contacto entre 2.1 y 3 mm, con un límite teórico igual al diámetro de la gota.

7.2.2 Dinámica de evaporación de una gota en confinamiento

La evaporación es un fenómeno dirigido por gradiente de concentración. Bansal (100) estudió la evaporación de gotas en espacios confinados encontrando que el flujo de evaporación y el flujo interno son procesos espaciotemporales, y que el incremento en la concentración de vapor del espacio confinado depende de la longitud del espacio.

Berthier y col. (33) estudiaron una forma de prevenir notablemente la evaporación hasta <10% del volumen de gotas de interés manteniendo la presión de saturación de vapor de agua en un recipiente cerrado (caja Petri) y también permitir la evaporación de gotas sacrificiales. Denotando un *Número de Evaporación (Ev)* en unidades de s^{-1} , el cual indica si el agua contenida en las gotas sacrificiales es suficiente para limitar la evaporación de las gotas de interés. Recalcando de manera más específica que la tasa de evaporación de una microgota es proporcional a su radio e inversamente proporcional a la densidad del líquido que la conforma (35, 73).

En la **Figura 7.1b** se puede observar el número de evaporación como función de la temperatura y el número de gotas sacrificiales en una caja Petri de 100 mm. El número de evaporación depende la razón de la masa del líquido de interés/líquido sacrificial, volumen de contenedor y temperatura (101).

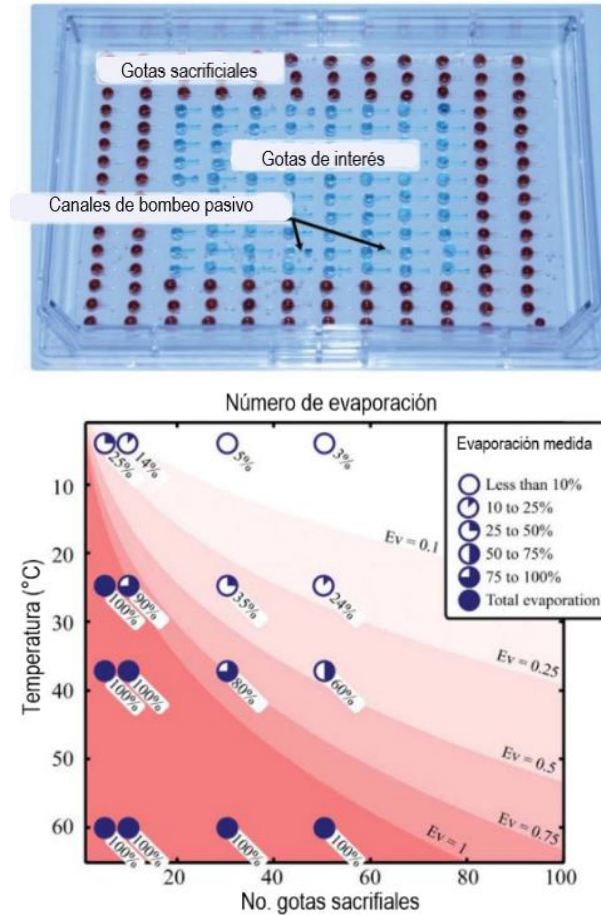


Figura 7.1: Gotas sacrificiales para reducir la evaporación de gotas de interés en un arreglo de canales de bombeo mediante gotas, a) arreglo experimental conteniendo gotas sacrificiales y de interés, b) números de evaporación una caja Petri de 4" para diferente número de gotas sacrificiales y una gota de interés a diferentes temperaturas (101).

Sin embargo, este estudio trata de un arreglo de gotas en un espacio semiabierto y no considera los efectos de pared o interacciones entre fuentes de evaporación (gotas).

Más tarde Bansal (100) estudió el efecto de pared mediante el confinamiento de gotas de microlitros, mostrando que la tasa de evaporación varía en función de la concentración de vapor. Debido a esto se ha observado una asimetría en la evaporación cuando se encuentra una gota vecina o la presencia de una barrera permitiendo un flujo unidireccional. La barrera que él emplea está fabricada con PDMS el cual es un material absorbente al agua.

7.2.3 Adhesión celular en cultivos *in vitro*

La adhesión juega un rol integral en comunicación y regulación celular y es de fundamental importancia en el desarrollo y mantenimiento de tejidos (102). En cultivos *in vitro*, la mayoría de las células de mamíferos son anclaje-dependientes y se unen firmemente al sustrato (103). La adhesión celular se refiere más a un contacto físico que a uno de interacciones químicas y celulares complicadas, y es usualmente reversible. Hay varios factores influenciando el proceso de adhesión de la célula al sustrato, incluyendo las características intrínsecas de ésta, razón por la que diferentes tipos de bacterias (por ejemplo, Grampositiva y Gramnegativa) pueden responder de manera diferente. Al cambiar las características de la superficie del material y factores ambientales relevantes es posible controlar el proceso de adhesión de forma similar a las células en el tejido.

La posibilidad de adhesión entre un sustrato y una célula es un proceso complejo el cual está gobernado por las propiedades fisicoquímicas del sustrato (104, 105). La química de superficie es una característica importante en el diseño de sustratos biomédicos, determinada por los grupos funcionales disponibles en la superficie para interactuar con biomoléculas (106, 107). Dos métodos para lograr una mejor adhesión pueden ser la incorporación de una película orgánica ultradelgada sobre la superficie, o técnicas de modificación con plasma (108, 109). Algunos grupos funcionales como CH₃, NH₂, COOH, péptidos y proteínas son conocidos por su disponibilidad para interactuar con ciertas estructuras celulares de acuerdo con sus comportamientos específicos con la superficie (106, 110). Mientras que una cantidad sustancial de investigaciones ha sido conocida sobre los efectos de la química de superficie en adhesión de microorganismos, recientes estudios están dirigidos hacia la topografía y rugosidad de la superficie (104), la principal razón para esto se debe a las inconsistencias en las tasas de adhesión de microorganismos a superficies químicamente similares con topografía diferente (111, 112).

7.3 Justificación

El cultivo de células puede ser adaptado al formato de gotas en pilar aprovechando el efecto de anclaje de la gota a los bordes rugosos y el hecho de que, a diferencia de las superficies planas, los pilares no estorban la circulación del

vapor de agua alrededor de la gota por lo que se supone una concentración de vapor más uniforme. La separación de los pilares puede proveer sitios aislados y específicos donde un número pequeño de células pueda crecer independientemente usando cada gota como compartimento, pudiéndose tener diferentes cultivos o concentraciones a la vez.

Los métodos reportados al momento requieren de sistemas robotizados y procedimientos de fabricación de difícil acceso. La cantidad de células que se requiere para un sistema de este tipo puede ser grande, por lo que en casos de poblaciones pequeñas de células es mejor evitarlos. Características del PMMA como transparencia y rigidez permiten una adecuada visualización al microscopio.

7.4 Objetivo

Desarrollar una metodología que permita el cultivo de diferentes células adherentes en pilares de PMMA empleando la saturación de vapor como medio para inhibir la evaporación y promoviendo a la adhesión celular mediante tratamientos físicos y/o químicos de ser necesario.

7.5 Métodos

7.5.1 Prueba de inhibición de evaporación

Se llevaron a cabo cuatro diferentes experimentos de evaporación de gotas de medio de cultivo de 3 μ l, 5 μ l y 8 μ l. Se midió su altura cada minuto para calcular el volumen. 1) Una gota individual evaporando en un cuarto limpio, a 50% y 37 °C. 2) Una gota individual evaporando dentro de la incubadora, a 37°C y 95%. 3) Una gota rodeada por las gotas asentadas sobre un arreglo de pilares dentro de la incubadora, a 37°C y 95%. 4) Una gota en el dispositivo con canales abiertos, centrales y periféricos, llenos de PBS dentro de una caja Petri en incubadora, 37°C y 95%. En los casos de las gotas evaporadas en incubadora se colocaron varias gotas o arreglos al mismo tiempo y se tomó uno diferente para cada medición, esto para reducir la alteración a las tasas de evaporación al sacarlas de la incubadora.

7.5.2 Fabricación del dispositivo con pilares para el cultivo celular en gotas

Se empleó una placa de PMMA de 1.5 mm de grosor y brocas carburo de tungsteno para fabricar los dispositivos. Para la generación de los pilares se usó una broca de 0.8 mm de diámetro, a 6500 rpm y velocidad de corte de 3 mm/s, con pasos de 100 μm de profundidad. Para los canales se usó una broca de 2 mm de diámetro a 4500 rpm y velocidad de corte de 6 mm/s. El dispositivo consiste en un disco que se ajusta a interior de una caja Petri de 60 mm. Está dividido en ocho secciones mediante canales rectos y un canal periférico cerca del borde que rodea el arreglo de gotas. Todos los canales tienen un ancho de 2 mm. Cada sección tiene 7 pilares de 2.5 mm de diámetro distribuidos de forma tal que exista una distancia de centro a centro de aproximadamente 5.5 mm. El dispositivo cuenta también con letras grabadas (A-H) que permiten la identificación de cada sección (**Figura 7.2**).

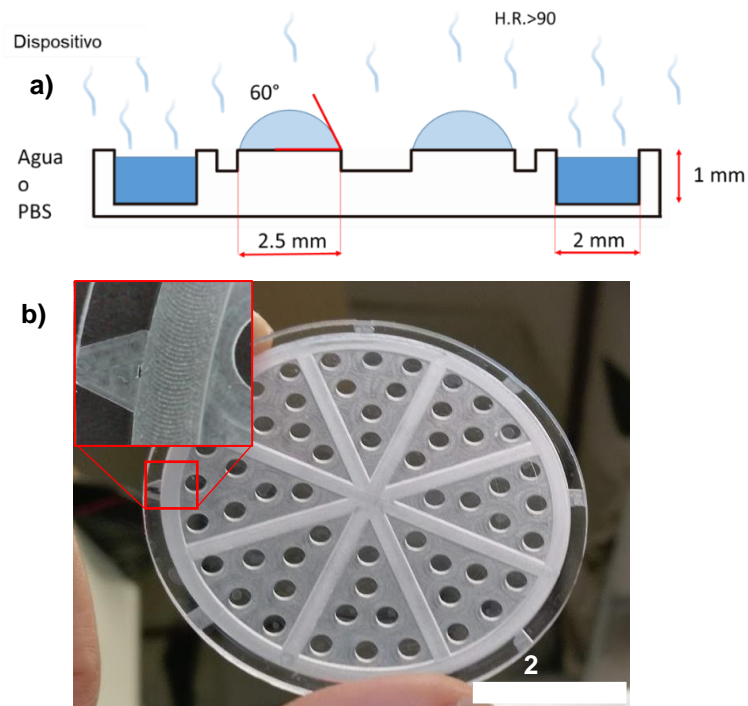


Figura 7.2. Dispositivo para cultivo celular. a) corte transversal donde se observa la configuración de canales y pilares para mantener una humedad de saturación, b) imagen real del dispositivo con un acercamiento al grabado de referencia.

7.5.3 Tratamientos físicos para mejorar la adhesión celular.

Para la fabricación de pilares con rugosidad se diseñaron diferentes patrones empleando el software Dr. Engrave y se grabaron sobre las placas de PMMA posteriormente se fabricaron los pilares ranurando estas mismas placas. Los grabados varían en forma, dirección y profundidad, todos ellos se realizaron con micro maquinado sin alterar químicamente el PMMA (**Figura 7.3**).

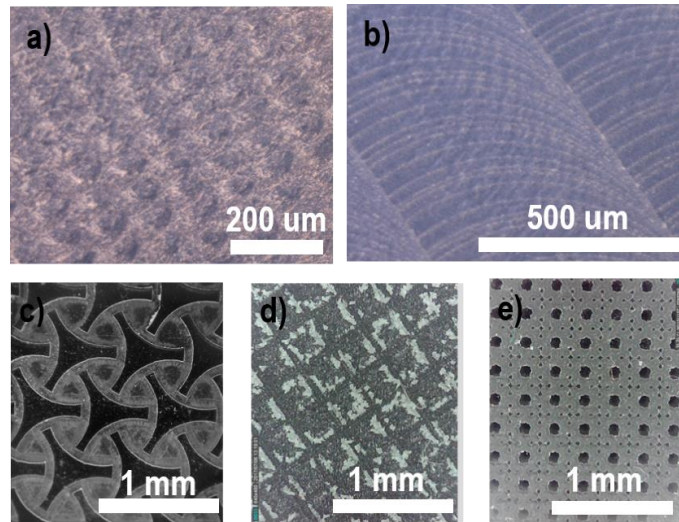


Figura 7.3: Diferentes patrones maquinados para probar la adherencia de células a los pilares a) empleando brocas de 2 mm con cortes cruzados y separación de 0.1 mm entre trayectorias, b) lineales con separación de 1 mm entre trayectorias, con broca de 0.1 mm. Diseños de c) círculos solapados, d) rombos y e) panal.

7.5.4 Tratamientos químicos para mejorar la adhesión celular.

Se probaron diferentes tratamientos a la superficie del pilar con cada tipo de células, estos incluyen el uso de proteínas de adhesión y tratamientos con plasma de oxígeno o aire a diferentes dosis. En el tratamiento de plasma se usaron dosis de 20 s, 40 s y 60 s. Los pilares eran tratados justo antes de la siembra de las células y debían ser usados dentro de los siguientes 30 minutos para mantener la afectividad del tratamiento (**Figura 7.4**).

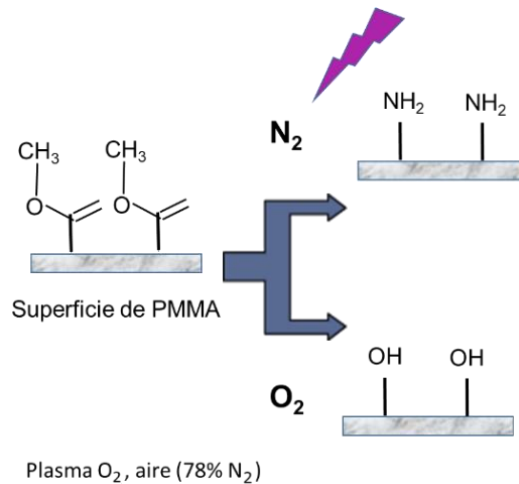


Figura 7.4: Esquema de modificación química de la superficie del PMMA mediante el tratamiento con plasma y corrientes de N₂ y O₂.

Como proteínas de adhesión se emplearon soluciones de colágeno 8%, Poli-L-lisina 5%, y (3-aminopropyl) trietoxi silano APTES 1%. En un ambiente estéril (campana de seguridad biológica Clase 2 Tipo AI) se colocaron gotas de 5 μ L de la solución deseada y se dejó incubar por 20 minutos, las gotas de tratamiento con proteínas de adhesión fueron retiradas antes de la siembra de células.

7.5.5 Cultivo celular con método convencional

Células de ovario de hámster chino (CHO) fueron descongeladas y cultivadas con medio de cultivo DMEM-F12 en matraz de 25 cm² por seis días a 37°C y 5% CO₂ para su recuperación antes de ser resuspendidas para su siembra en pilares. Células fluorescentes previamente transfectadas con un plásmido portador del gen de proteína verde fluorescente (GFP) fueron descongeladas y tratadas con un antibiótico de selección G418 (Sigma) para mantener sólo las células transfectadas con GFP. Para resuspenderlas se lavó con PBS estéril y se agregó una solución de tripsina 1% incubando por 3-5 minutos. La actividad de la tripsina se detuvo con 3 ml de medio de cultivo fresco con suero bovino fetal FBS 10%. Las células THP-1, pertenecientes a una línea de monocitos inmortalizados a partir de sangre periférica de un niño con leucemia, fueron cultivadas en medio RPMI-1640 adicionado con glutamax. Para diferenciarlas a células adherentes se empleó un tratamiento con Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 200 ng/ml por 3 días para una concentración celular de 2-4 x 10⁵ cel/ml.

7.5.6 Obtención de células primarias

Macrófagos primarios fueron obtenidos a partir de una muestra de sangre fresca la cual fue centrifugada con un gradiente de Percoll a 1500 rpm (**Figura 7.5 b-c**), fueron cultivadas en RPMI (1640 Sigma) adicionado con suero autólogo (del mismo donante). Para las tinciones de viabilidad en estas células se usó Vybrant Dil (naranja) 10 μ l/ml incubando por 20 min, para visualizar el citoplasma, Sytox Green 1 μ l/ml fue adicionado al medio para visualizar el núcleo, para el lavado de las células estas fueron centrifugadas en 5 ml de medio de cultivo por 5 min 1300 rpm y resuspendidas (3X).

Fibroblastos y cardiomiocitos primarios fueron obtenidos de ratón adulto (**Figura 7.5a**), diseccionadas con tripsina 1% y pipeteo vigoroso usando ADNasa. Neuronas fueron obtenidas de embrión de ratón mediante protocolos ya establecidos (113).

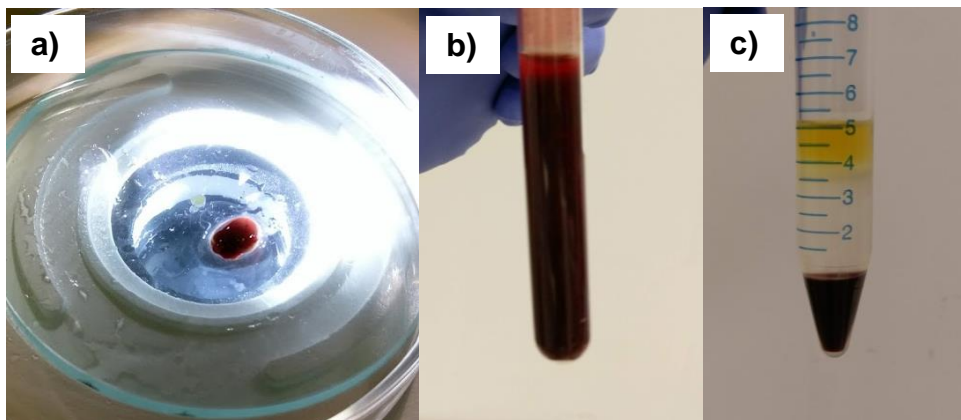


Figura 7.5: Células primarias fueron obtenidas a partir de: a) órganos de ratón y b) sangre fresca humana, c) separada mediante centrifugación para la obtención de células sanguíneas.

7.5.7 Siembra de células en pilar

Los dispositivos fueron colocados dentro de la caja Petri, y llenados los canales con 250 μ l de PBS estéril. Posteriormente se pipetearon manualmente (colocando la pipeta a 45°) gotas de 7 μ l de la suspensión a la concentración celular deseada sobre los pilares y el cultivo se llevó a incubación por 4 horas o toda la noche para permitir la adhesión de las células. Las células muertas y no adheridas se retiraron usando la pipeta de 1 ml. El reemplazo de medio se realizó cada 24 horas con el mismo volumen de medio fresco DMEM F-12 o RPMI-1640 a 37°C, así como el rellenado de canales con agua (100 μ l) de acuerdo con el esquema de la **Figura**

7.6. Para reducir el tiempo de reemplazo de medio se usó la misma punta para retirar las gotas de una sección completa y así mismo para la adición de medio fresco.



Figura 7.6: Esquema de siembra y reemplazo de medio para el cultivo de células CHO: a) pipeteo de gotas de suspensión celular, b) succión de medio de cultivo conteniendo células no adheridas con una pipeta de mayor tamaño para aprovechar fenómenos de capilaridad y sin tocar la superficie donde se encuentran las células, c) reemplazo con medio de cultivo fresco.

7.6 Discusión de Resultados

7.6.1 Prueba de inhibición de evaporación

En los casos donde se evapora una sola gota la difusión de vapor es rápida y en consecuencia la tasa de evaporación también lo es. En los casos donde existen otras gotas que son fuentes de vapor, las gotas centrales tienen mayor concentración de vapor a su alrededor mientras que las gotas de los extremos evaporan más rápido. En la gráfica de la **Figura 7.7** se observa una evaporación más rápida en las gotas individuales, pilar y pilar-incubadora. El menor tiempo de vida de la gota dentro de la incubadora puede deberse a la temperatura de 37° frente a la temperatura ambiental 25°. Las gotas del pilar-incubadora-arreglo incrementaron su tiempo de vida debido al que las gotas que le rodean sirven como fuentes de vapor que reducen la difusión de las moléculas de vapor en el entorno. En el caso donde se emplearon canales con líquido sacrificial (pilar-incubadora-arreglo+pilar) las gotas que no están rodeadas por otras gotas tienen el vapor de los canales para compensar la concentración de vapor, esto permite que la reducción del volumen de la gota en el tiempo sea aun menor. Gracias al uso de los canales el

volumen se mantiene sin cambio aparente por 3 horas, mientras que en los otros casos las gotas se evaporan totalmente en 30-125 minutos.

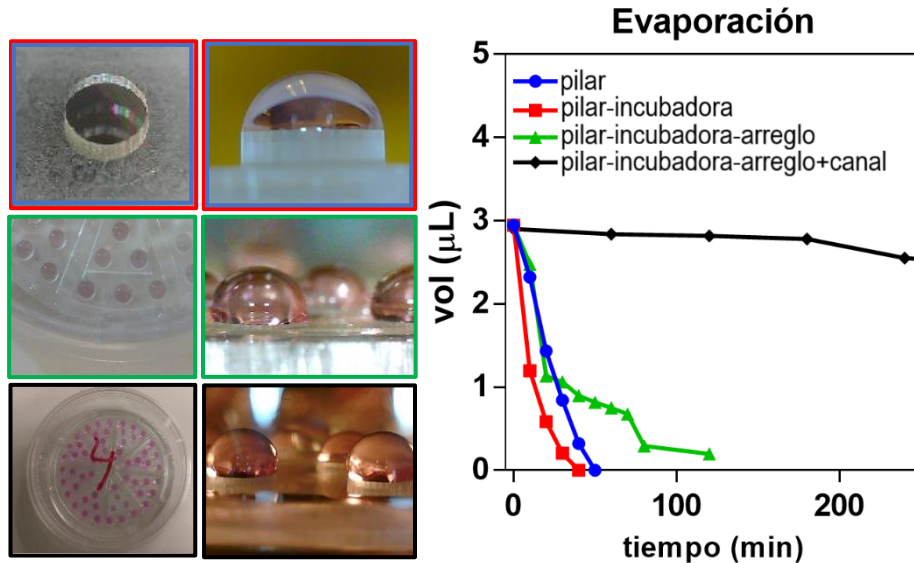


Figura 7.7: Evaporación de gotas de 3 µl bajo diferentes configuraciones experimentales. Las gotas en el arreglo de pilares con canales de agua sacrificial dentro de una caja Petri tuvieron una tasa de evaporación mucho menor con respecto al resto de las configuraciones. Imágenes representativas de pilar individual y arreglo de gotas, el color del contorno corresponde con el de la curva en la gráfica.

Posteriormente se evaporaron volúmenes de 3 µl, 5 µl y 8 µl bajo el arreglo de pilares en el disco usando los canales de agua sacrificial y la caja Petri de 60 mm (pilar-incubadora-arreglo+canal), adicionalmente se colocó una segunda caja Petri de 100 mm conteniendo 2 ml de agua estéril, para tener mayor nivel de humedad. Se demostró que es posible mantener el volumen casi sin cambios durante al menos 24 horas bajo estas condiciones (**Figura 7.8**).

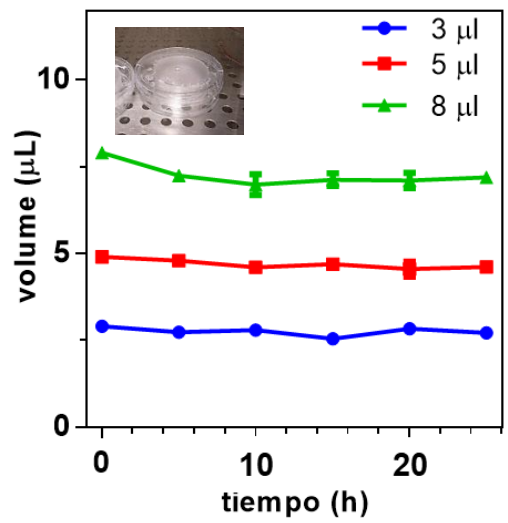


Figura 7.8: La evaporación se reduce significativamente de manera que el volumen se mantiene sin cambios significativos por 24 horas.

7.6.2 Dispositivo con pilares para el cultivo celular en gotas

Para aprovechar las ventajas que brinda una caja Petri (visualización, aislamiento del ambiente externo y venteo de CO₂), el dispositivo diseñado puede ser integrado a la caja Petri, permitiendo optimizar el uso de este espacio (**Figura 7.9**). Esto permite tener varios cultivos simultáneamente, en las diferentes secciones. La distribución de pilares y canales permite mantener una concentración de vapor elevada, suficiente para reducir la evaporación, y así mantener un volumen y osmolalidad apropiados (concentración de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa, y suero, entre otros, en el medio de cultivo).

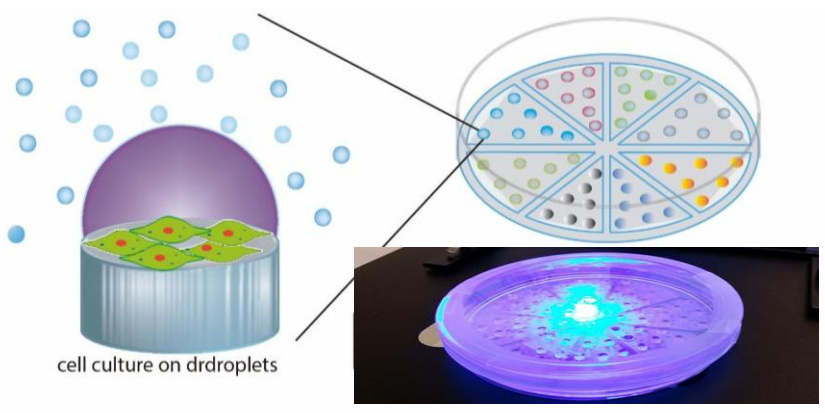


Figura 7.9: Imágenes representativas del dispositivo con pilares de PMMA para diferentes cultivos celulares simultáneos en una misma caja Petri y su facilidad para ser observados al microscopio.

La altura de los postes no es relevante para el sostenimiento de la gota La altura de los postes no es relevante para el sostenimiento de la gota de cultivo celular más allá de las 200 μm ya que con esto se evita que dos o más gotas coalescen como lo harían en una superficie plana (ver Apéndice AIV y EI); sin embargo, una mayor altura favorece la difusión de vapor haciendo la concentración más uniforme a lo largo de la caja Petri en todas las gotas del canal (114). La altura de los pilares también afecta la profundidad del canal y el volumen de líquido que este puede contener, ya que están ranurados en una sola pieza. Para este dispositivo se eligió una altura de postes de 400 μm , y una profundidad de los canales de 900 μm .

Los canales deben ser llenados previo a la colocación de las gotas para así preparar el ambiente con ambiente húmedo. Los canales pueden ser llenados con agua Mili-Q estéril o buffer de fosfatos (PBS). La evaporación del buffer es más lenta que la del agua pura debido al contenido de iones disueltos que generan una mayor atracción entre moléculas. El proceso manual toma alrededor de 3 minutos para un total de 54 gotas.

7.6.3 Efectos de los tratamientos físicos (rugosidad) y químicos (plasma)

Células adherentes CHO fueron sembradas en pilares con superficies rugosas, así como en las tratadas con plasma de aire y O_2 para verificar el mejor tratamiento. Una forma extendida después de más de 4 horas indica una buena adhesión. En cambio, si las células mantienen su forma esférica o granular la adhesión se considera deficiente.

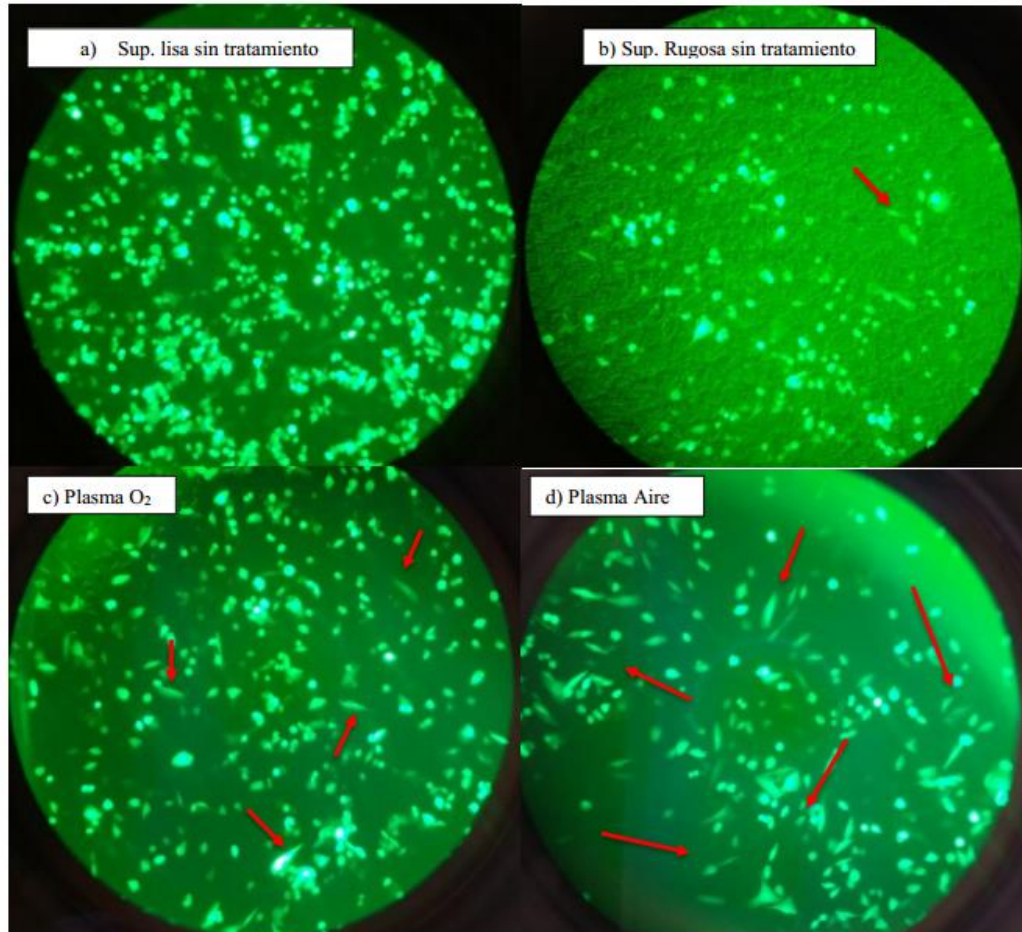


Figura 7.10: Adhesión celular a pilares de PMMA con diferentes tratamientos: a) superficie lisa sin tratamiento (control) , b) superficie rugosa sin tratamiento, c) superficie lisa con tratamiento de plasma de oxígeno y c) superficie lisa con tratamiento de plasma de aire.

Después de 24 horas en incubación las superficies lisas y rugosas presentaron un bajo número de células adheridas. En cambio, los pilares con tratamientos de plasma mostraron mejores resultados, en especial el plasma con flujo de aire (**Figura 7.10**). Esto puede explicarse debido a que el flujo de oxígeno O_2 ayuda a funcionalizar la superficie del PMMA con radicales OH, lo que la vuelve más hidrofílica. En cambio, el aire contiene una mezcla de gases cuyo componente principal es el nitrógeno N_2 (78 %), el cual ayuda a funcionalizar la superficie con grupos amino NH_2 cuya presencia favorece la unión con proteínas membranales (106).

7.6.4 Procedimiento para el cultivo de células en gotas sobre pilares de PMMA

El procedimiento general que se esquematiza en la **Figura 7.11**, a partir de líneas celulares en cultivo o células primarias obtenidas directamente de ratón transfectado con GFP, se hacen los conteos y diluciones correspondientes para obtener una concentración celular deseada en suspensión, posteriormente se siembran mediante pipeteo en los pilares y se llevan a condiciones de cultivo. La evolución de estas células puede ser fácilmente monitoreada mediante microscopio.

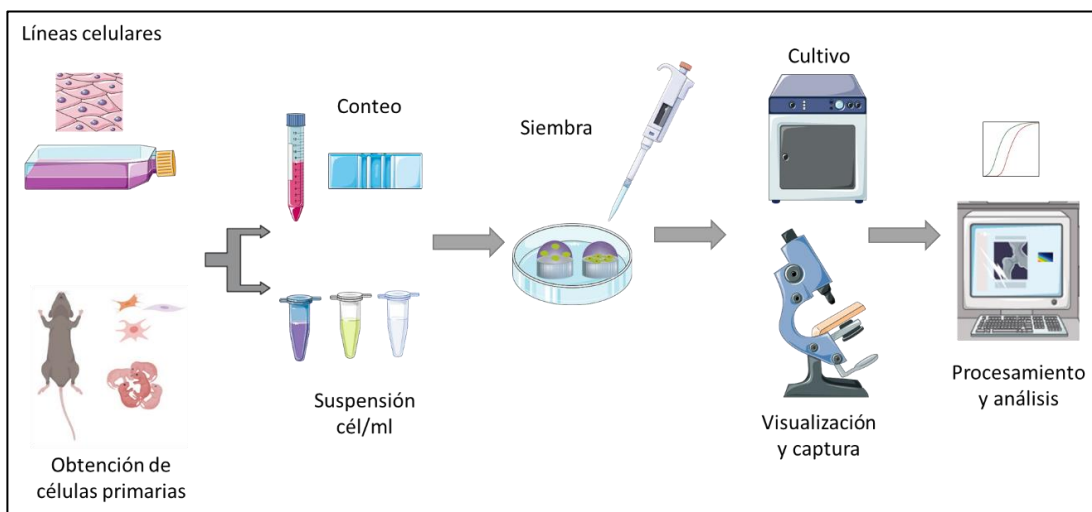


Figura 7.11: Esquema de proceso general de cultivo celular en pilares de PMMA a partir de líneas celulares o primarias.

7.6.5 Cultivo de células CHO-GFP en pilares de PMMA tratados con plasma y flujo de Aire

Las células de ovario de hámster chino conjugadas a una proteína verde fluorescente (CHO-GFP) permiten una mejor visualización de su adhesión, extensión y posterior crecimiento poblacional durante los cultivos. Las células CHO son muy utilizadas en laboratorios debido a su resistencia y fácil adaptación.

De la misma suspensión celular y calculando que la relación volumen/área de superficie fuera equivalente a la de una caja de cultivo de poliestireno PS (método convencional), se realizó una siembra colocando gotas en pilares de PMMA. Se adquirieron imágenes en diferentes tiempos para evaluar mediante fluorescencia la

adhesión de estas. El cultivo mostró buena viabilidad (ya que las células muertas dejan de emitir fluorescencia), así como la extensión de las células con el paso del tiempo. Los resultados después de 92 horas son similares tanto en el pilar como en la superficie del matraz de PS, tal como lo indican las imágenes representativas de la **Figura 7.12** y la gráfica que las acompaña.

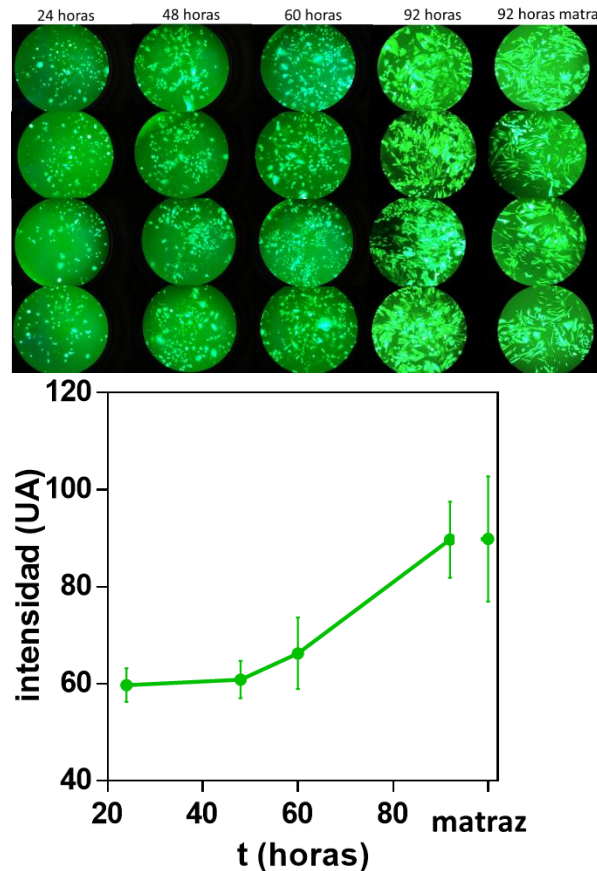


Figura 7.12: Evolución del cultivo de células CHO-GFP ; a) Imágenes representativas de 4 diferentes pilares a 24 h, 48 h, 60 h y 92 h comparadas contra un cultivo en matraz a 92 h, b) la fluorescencia del área analizada es equivalente entre el cultivo en pilares de PMMA y el método convencional.

7.6.6 Cultivo de células THP-1, en pilares de PMMA sin tratamiento a superficie

Se probó la funcionalidad de los pilares con otra línea de células, THP-1, que naturalmente se encuentran en suspensión. Estas células fueron diferenciadas a células adherentes con un tratamiento de Phorbol 12-myristate13-acetate (PMA) 200 ng/ml por tres días. Este paso de diferenciación se relizó debido a que después del uso de enzimas peptidasas como la tripsina, para despegarlas del sustrato de

cultivo, un número de células sufre daños y muere. Al hacerlas adherentes las células muertas serán eliminadas con el primer cambio de medio. De no hacer esta diferenciación, todas las células en suspensión serían eliminadas.

Se emplearon moléculas de adhesión como poli-L-Lisina y colágeno, sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron en pilares de PMMA sin tratamiento alguno. Una vez diferenciadas estas células se adhieren fácilmente a los pilares sin tratamiento, aunque al aumentar la confluencia por el crecimiento de la población también se observó que las células adoptaban nuevamente su forma esférica de suspensión y perdían la adherencia a la superficie **Figura 7.13**. Esto puede deberse a algún mecanismo de las células que va más allá de nuestro campo de investigación.

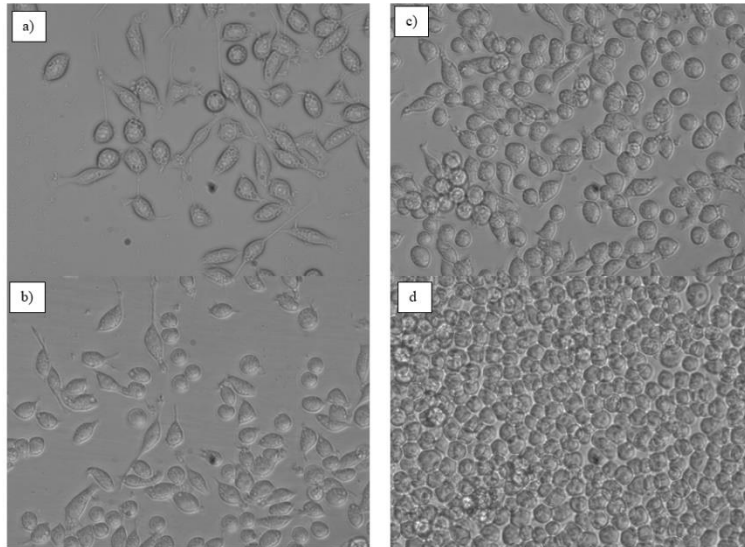


Figura 7.13: Células monocíticas THP-1 (a, b) diferenciadas a macrófagos (forma alargada) con tratamiento de PMA 200 ng/ml por 3 días, (c, d) y su posterior recuperación de forma esférica conforme la población celular aumenta en el tiempo.

Se dio seguimiento al cultivo celular de cuatro diferentes concentraciones de células THP-1 encontrando un crecimiento exponencial, como se observa en la **Figura 7.14**, con una alta viabilidad, incluso después de siete días de cultivo sin cambio de medio. Esto para una siembra máxima de 50 células por pilar (6×10^3 cél/ml). Concentraciones celulares iniciales mayores a ésta mostraron estrés y muerte debido al agotamiento de nutrientes.

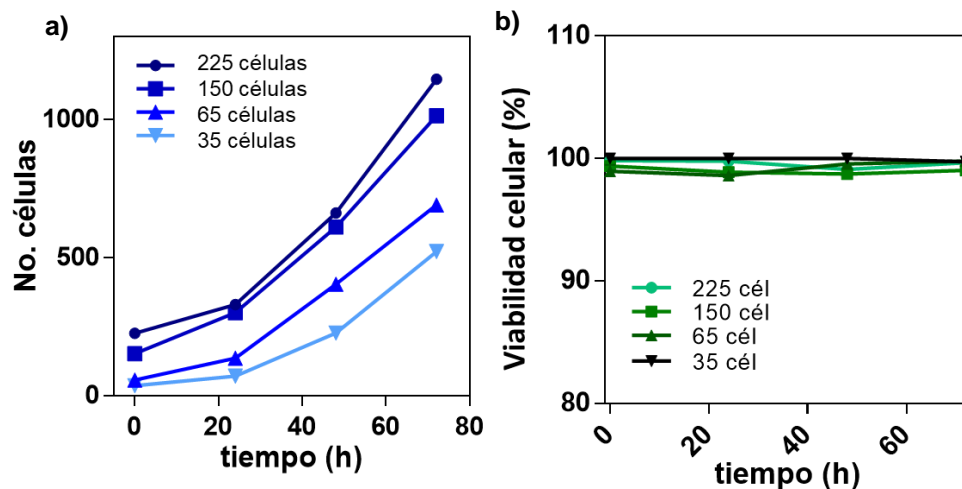


Figura 7.14: Proliferación celular de THP-1 cultivadas en gotas sobre pilares de PMMA. a) Crecimiento exponencial de cuatro poblaciones celulares. b) viabilidad celular a largo de tres días.

7.6.7 Compatibilidad del pilar de PMMA con otras células

Para verificar la posibilidad del cultivo de otras células, ya que cada una cuenta con características propias, se purificaron células primarias a partir de sangre fresca humana y también de órganos de ratón.

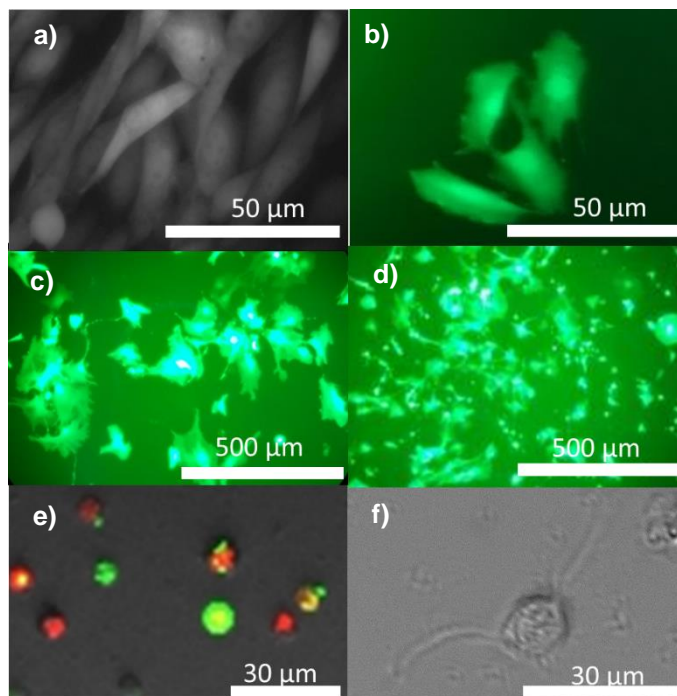


Figura 7.15: Diferentes células cultivadas en pilares de PMMA. a) CHO-WT, b) CHO-GFP, c) cardiomiocitos primarios de ratón, d) fibroblastos primarios de ratón, e) macrófagos primarios de humano y f) neurona de embrión de ratón.

Para cada tipo de célula se siguió un procedimiento diferente, de acuerdo con metodologías de extracción y de cultivo convencionales. Se requiere hacer adaptaciones, tanto de tratamiento a la superficie de los pilares como de concentración celular, para mantener el cultivo en una gota para cada tipo celular, sin embargo, se comprobó que existe compatibilidad con diferentes tipos de células que se observaron adheridas a la superficie del PMMA (**Figura 7.15**).

En el caso de células que no se adhirieron y posteriormente murieron se observó que estas se desplazaban hacia la zona central del pilar (ver Apéndice E).

7.7 Discusión

El uso de canales en el arreglo permite contener líquido sacrificial, que al evaporar ayude a mantener la humedad distribuida equitativamente dentro de la caja Petri y alrededor de las gotas. De esta manera se evita el uso de gotas sacrificiales sugeridas en el trabajo de Berthier (115) y se aprovechan todas ellas en el cultivo celular (33). Los canales tienen además la función de dividir la caja en secciones, de modo que, se pueden tener cultivos de diferentes concentraciones o líneas celulares sin preocuparse por la migración de una colonia a otra, ya que el medio cultivo y el área de cultivo se encuentran discontinuos, a diferencia de lo que sucede en un medio de cultivo de agar o en cajas Petri en formato convencional.

Se decidió usar un volumen de gota de 7 μ l para un pilar de 2.5 mm de diámetro. El tamaño del pilar permite una visualización completa del área de cultivo con un objetivo 10X, lo que facilita la captura de imágenes en una sola toma. El volumen corresponde a la mitad del máximo soportado por el pilar cuando se trata de medio de cultivo fresco. Sin embargo, el ajuste se hizo después de que experimentalmente se encontrara una disminución de la estabilidad de la gota cuando se incrementaba la concentración inicial de células en la gota o, al transcurrir el tiempo de cultivo. El diámetro del pilar también está muy cercano a la longitud capilar que nos indica que por arriba de los 2 mm la gravedad comienza a tener efectos.

Es sabido que el agua tiene una alta tensión superficial debido a sus interacciones por puentes de hidrogeno, pero cuando se agregan otras moléculas que interfieren con estas interacciones, las fuerzas cohesivas pueden debilitarse. El medio de cultivo contiene diversos componentes que van desde aminoácidos,

proteínas y sales, lo que modifica la tensión superficial. Al presentarse evaporación las concentraciones de estos componentes pueden incrementar, lo que acarrearía un nuevo cambio. Por otro lado, el incremento de la temperatura aumenta la energía vibratoria intermolecular, lo que también contribuye a un debilitamiento de la tensión superficial.

La siembra de las células se lleva a cabo colocando la punta de la pipeta a 45° respecto a la superficie del pilar (116), esto facilita la liberación de la gota sin ser obstruida por el propio pilar. Para retirar el medio de cultivo se emplea la pipeta de 100 µl-1 ml. Las características de esta punta, principalmente el radio interno, al ser comparable con el tamaño de la gota, “absorbe” la gota al contacto por efecto de capilaridad dejando apenas una película líquida cubriendo las células, sin tocar a las células adheridas a la superficie para evitar daños.

En esta fase del proyecto presentamos una plataforma basada en pilares de PMMA que por su tamaño permite ser adaptado a una caja Petri común, la distribución de los pilares permite aprovechar el espacio para realizar múltiples ensayos con células adherentes, manteniendo un alto porcentaje de viabilidad y proliferación. El cultivo celular se lleva a cabo en gotas que funcionan como compartimentos independientes aislados entre ellos lo que impide la contaminación cruzada, a la vez que se reduce el consumo de reactivos. Una adecuada distribución de la humedad impide la evaporación evitando cambios en la osmolaridad del medio de cultivo. Finalmente, las células no adheridas pueden ser arrastradas por corrientes generadas por evaporación a través de la superficie (75, 117).

7.8 Conclusiones y perspectivas

Nuestro dispositivo basado en pilares y canales hace más eficiente el espacio de la caja Petri al permitir multiensayos con bajo consumo de reactivos, aumentando el número de pruebas de una manera simple y sencilla. Al tener bien delimitados la superficie del substrato y el volumen, se puede tener un control total en el análisis de células únicas y pequeñas colonias, permitiendo llevar a cabo ensayos dosis-respuesta o incluso técnicas de clonación celular. Este formato es muy práctico para el cultivo de células valiosas como las primarias o para estudios de comunicación autocrina.

9. Conclusiones

La física que involucra la evaporación de gotas incluyendo el fluido, gradientes de temperatura, corrientes internas, la tasa de flujo de vapor alrededor de la gota, entre otras, representan una amplia gama de oportunidad para su uso como herramienta de diagnóstico clínico en la miniaturización de ensayos biológicos. La evaporación de gotas sésiles involucra una compleja interacción entre cambio de fase, difusión, advección y fuerzas de superficie. La microfluídica abierta tiene una alta dependencia del flujo capilar espontáneo y la tensión superficial, ofreciendo como ventajas un mejor acceso al fluido, fácil visualización y monitoreo, además, no se requiere del sellado total de los sistemas.

Las características que adopta la gota al ser colocada sobre uno de nuestros pilares, como el elevado ángulo de contacto, es similar al alcanzado mediante metodologías largas y complejas reportadas en otros trabajos para formar superficies superhidrofóbicas. Además, se puede mantener un radio de contacto constante durante la evaporación debido al anclaje, característica de superficies hidrofílicas. Esta combinación de características es única, haciendo que la evaporación y el movimiento convectivo dentro de una gota sea diferente a aquel que tendría al evaporar sobre una superficie plana. Las interacciones de un líquido con una superficie rugosa o texturizada son distintas de las interacciones con sustratos lisos. Cambios en la rugosidad o textura de los patrones produce cambios en el área efectiva de contacto por lo que el ángulo de contacto es diferente.

La evaporación puede ser aprovechada para incrementar la sensibilidad de detección en diversos ensayos bioquímicos, ya sea mediante técnicas de colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, espectrofotometría, entre otras. El anclaje de la gota es útil para la delimitación de los sitios de detección. Se han propuesto técnicas para mejorar la homogeneidad de un spot en biotecnología, usando factores externos como temperatura, voltaje eléctrico, señales de corriente alterna, o la modificación del líquido, con resultados variables. En este proyecto hemos comprobado la efectividad del uso del pilar para alcanzar este objetivo.

Ambas características combinadas; elevado ángulo de contacto y anclaje de la línea de contacto, permiten tener un perfil de la gota en forma de casco esférico, siempre que no se rebasen los límites en que el efecto de la gravedad se hace presente. De esta manera es posible conocer la evolución del volumen de manera más exacta, con tan solo medir la altura de la gota y conociendo las dimensiones del pilar donde ésta descansa. Tener un control del volumen y del cambio de color puede ayudar en el estudio de la cinética de una reacción. Por otro lado, forma esférica y radio de contacto constante, facilitan el desarrollo y aplicación de un modelo teórico que predice la tasa de evaporación bajo diferentes condiciones de humedad alrededor de la gota (ver Apéndices AI y II).

Al emplear un flujo de aire dirigido hacia la gota se consigue una mayor tasa de evaporación; al mismo tiempo que se incrementa el movimiento convectivo que facilita el efecto de mezclado. Aunque este no tiene la característica forma toroidal simétrica, lo que dificulta un estudio cuantitativo, se pudo observar cualitativamente que cuanto más esférica sea la gota se incrementa la velocidad de las corrientes. Al reducir el diámetro del pilar y manteniendo el volumen de la gota, el perfil esférico era más completo y la velocidad del mezclado mayor.

En cuanto a los ensayos basados en células, estos representan casi la mitad del total de ensayos para validación farmacológica. Estos tienen el objetivo de identificar moduladores o vías metabólicas de interés, redes regulatorias, retroalimentación, mecanismos de control, entre otros. Por lo que se requiere de un conocimiento previo sobre procesos fenotípicos, migración, citoquinesis, selección de compuestos que pueden atravesar la membrana y pruebas de citotoxicidad aguda. La primera consideración a tener en cuenta al realizar un ensayo basado en células *in vitro* es mantener el contexto biológico apropiado. Además de contar con un balance de: facilidad del método, disponibilidad y adaptación al método empleado considerando el tipo de células, tipo de ensayo, densidad celular, lectura y estrategias de análisis de datos, relación señal a ruido, estabilidad de los reactivos, sensibilidad a los solventes.

Los sistemas recientes más sofisticados para ensayos en células incluyen miniaturización usando placas de 384 o 1536 pozos, donde se manejan volúmenes de 2-8 μl por pozo; sin embargo, se requiere de confiabilidad en los volúmenes. Los instrumentos deben ajustarse para mantener volumen, velocidad, altura y posición

de las puntas con la finalidad de brindar una apropiada dispensación y aspiración de líquidos sin dañar las monocapas de células. Para resolverlo, con nuestros pilares se puede explotar la tensión superficial para el transporte y mezcla de fluidos, captura y liberación de biomoléculas y soluciones químicas mediante el uso de pilares de diferentes diámetros.

La microfluídica abierta tiene una alta dependencia del flujo capilar espontáneo ofreciendo como ventajas un mejor acceso al fluido, fácil visualización y monitoreo, además, no se requiere del sellado de sistemas. El formato de gotas puede adaptarse a microscopios de laboratorio, pero además a equipos más asequibles como las cámaras USB. El uso de la técnica de pruebas de detección mediante evaporación de gotas sobre pilares podría ser fácilmente integrada con aplicaciones para celular que faciliten el diagnóstico con una fotografía.

10. Apéndices

Apéndice A

I. Área superficial de un casquete esférico

La energía de superficie E_{surf} (N·m) es proporcional al área de superficie, de ahí que es posible medir el volumen de una gota a partir de una sola imagen. En casos hidrofóbicos, la superficie de la gota se obtiene mediante la relación:

$$S = \frac{\pi}{4} \left[d_1 \pm \sqrt{d_1^2 - d_2^2} \right] \quad (S1)$$

Donde d_1 representa el diámetro de la esfera de la gota y d_2 el diámetro de contacto de la gota con el sustrato (118).

II. Modelo teórico de evaporación de gotas y corrientes de Marangoni

Considerando una gota esférica y siguiendo la aproximación de Birdi y colaboradores (35). La tasa de evaporación se deriva de la Ley de Fick:

$$\frac{dm}{dt} = \rho \frac{dV}{dt} = -D \int \nabla c \cdot dS = -D \int \frac{\delta c}{\delta r} dS \quad (S2)$$

Donde m (Kg) es la masa del líquido, V (m³) es el volumen, ρ (Kg/m) la densidad del líquido, D (m²/s) es el coeficiente de difusión de vapor, c (Kg/m³) su concentración y r (m) el radio de la gota. Por aproximación el gradiente de concentración de vapor alrededor de la gota es:

$$\frac{\delta c}{\delta r} \approx \frac{c_0 - c_\infty}{R} \quad (S3)$$

Donde R es el radio de la gota, c_0 y c_∞ son las concentraciones en la interfaz y en el infinito respectivamente. La tasa de evaporación es entonces,

$$\frac{dm}{dt} = \rho \frac{dV}{dt} = 4\pi R D (c_0 - c_\infty) \quad (S4)$$

En el caso de la gota sésil la integración se realiza sobre la superficie del casco esférico. Esta ecuación ha servido como base para el modelado de evaporación de

gotas en una superficie (114) si se considera una evaporación uniforme, pero no siempre es así.

En gotas de bajo AC se ha observado que la presencia de una película precursora permite un flujo de vapor mayor en la línea trifásica. Para reemplazar a las moléculas que han escapado de la gota en esta zona, moléculas que se encuentran en el bulto se desplazan hacia la línea de contacto generando lo que se conoce como flujo capilar, este movimiento es el responsable del acarreo de partículas que forman el anillo de café.

Por otro lado, si las corrientes predominantes son generadas por gradientes de tensión superficial, es decir, un flujo de Marangoni, éste producirá un movimiento convectivo recirculante que es a la vez supresor de la formación del anillo de café (**Figura S1**) (119).

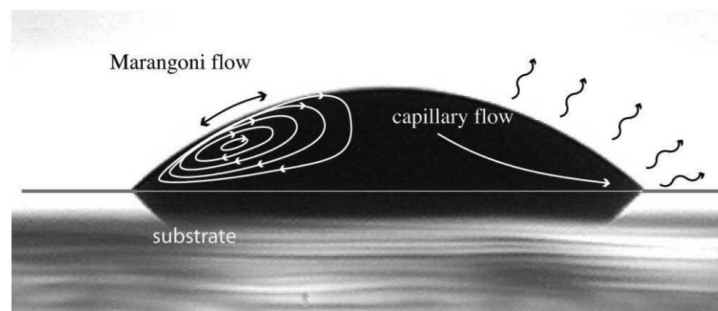


Figura S1: Líneas de corriente para flujos de Marangoni y flujos capilares producidos por la diferencial en el flujo de vapor a lo largo de la gota (119).

III. Métodos para calcular la tensión superficial

Existen diversos métodos para medir la tensión superficial de un líquido; A partir de una imagen de una gota colgante, por un lado, el peso de la gota tiende a elongarla y por otro, la tensión superficial tiende a minimizar la interfaz haciéndola esférica. El volumen y el peso de la gota pueden ser determinados mediante un análisis del perfil vertical, el cual está en función de la tensión superficial (120). Otro método es el de la gota sesil, el ángulo que forma la línea trifásica o línea de contacto con la tangente de la gota provee una medida inversa de la tensión superficial, o en su caso de la mojabilidad de una superficie. Ya que el ángulo de contacto refleja las fuerzas cohesivas de las moléculas de un líquido, que son las

causantes de la tensión superficial, para una misma superficie un líquido de mayor tensión superficial tenderá a juntarse con mayor fuerza adoptando una forma más esférica.

IV. Película precursora

Cuando una gota es depositada en una superficie sólida plana, una delgada película de apenas unos pocos nanómetros se esparce más allá de la línea de contacto visible (**Figura S2**) (121, 122). Las moléculas líquidas se intercalan entre el gas y el sólido esparciéndose progresivamente bajo la acción de la así llamada “presión de desunión” causada por las interacciones de Van der Waals entre las moléculas. Las películas precursoras existen para ángulos de contacto en superficies hidrofílicas de gotas estáticas, así como para mojabilidad dinámica (61).

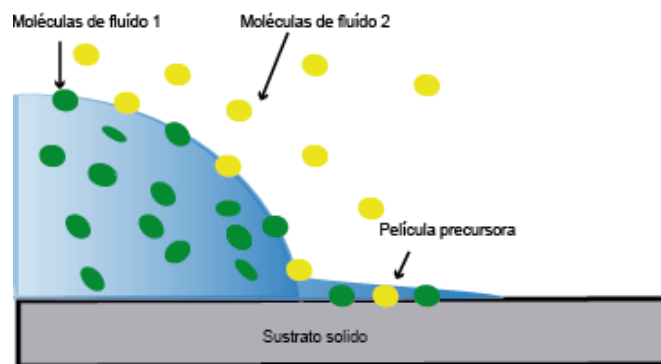


Figura S2: Interfaz con película precursora.

La existencia de la película precursora alrededor de cada gota enlaza o conecta a las gotas que están cercanas, provocando que dos gotas depositadas sobre una superficie lo suficientemente cerca una de la otra, pero sin estar en contacto directo aparente, se fusionan.

V. Pipeteo; Dificultades en la succión de un líquido

El mismo fenómeno de capilaridad que se presenta en tubos cilíndricos podemos encontrarlo en la punta de una pipeta durante la succión de líquidos, con la correspondiente adaptación a una forma cónica. Los estados de equilibrio mecánico y la presión de Laplace son balanceados por la presión hidrostática formando un menisco con un radio de curvatura. Dependiendo de los valores de los

ángulos α y θ , el menisco puede ser estable o inestable. En el caso inestable el menisco dará un salto a la parte alta o baja de la punta de pipeta donde será estabilizado. Hay dos dominios donde el menisco salta dentro de la pipeta hasta encontrar una pared de anclaje. Los valores críticos dependen del radio interno R_0 de la pipeta al punto $h = 0$. En la **Figura S3** α es positivo y existe un amplio rango en que el menisco estará en el fondo (123). Si el valor del ángulo en el cono o pared es menor a un valor crítico α habrá un ascenso o descenso continuo similar al observado en paredes paralelas.

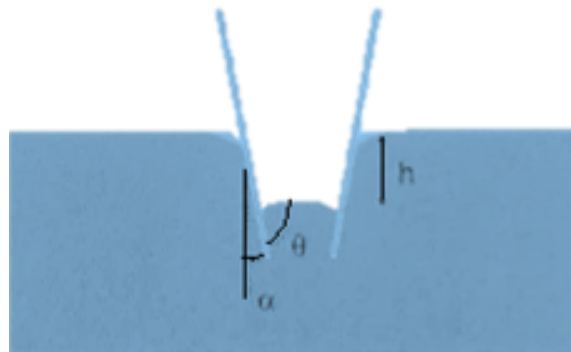


Figura S3: Diagrama del comportamiento del menisco en el plano (θ, α) . El ángulo α está definido por $\sin \alpha^* = \bar{R}_0^2/4c$. Si el ángulo de contacto en la pipeta es lo suficientemente grande ya sea hidrofóbico o hidrofílico, el menisco permanecerá en el fondo. El líquido no penetrará en la pipeta a menos que una presión negativa sea aplicada (97).

Este fenómeno puede causar errores de medición en el manejo de volúmenes pequeños, dependiendo de las interacciones entre moléculas del material de fabricación de la pipeta y el líquido en cuestión.

VI. Trabajo de cohesión y adhesión; ecuación de Young-Dupre

El trabajo de adhesión W_a (N/m) es el trabajo requerido para separar dos cuerpos, y su relación con la tensión superficial está representada por la ecuación:

$$W_a = \gamma_1 + \gamma_2 - \gamma_{12} \quad (S5)$$

Donde los subíndices 1 y 2 representan las diferentes sustancias, líquido y sólido.

El trabajo de cohesión W_c se presenta entre dos moléculas iguales, por lo tanto:

$$W_c = 2\gamma_1 \quad (S6)$$

El trabajo de adhesión de un líquido a un sólido está representado por:

$$W_a = \gamma(1 + \cos \theta) \quad (S7)$$

Mientras más hidrofóbica es la superficie menor es el trabajo de adhesión. La fuerza de adhesión es la que mantiene suspendida a una gota sobre un sólido aun cuando el sistema se invierta de cabeza (39).

VII. Evaporación de un líquido en un micropozo

Las paredes de un micropozo pueden ser de naturaleza hidrofóbica o hidrofílica dependiendo del material de fabricación. En el caso de los pozos de materiales hidrofílicos la interfaz líquida será cóncava y si tiene una forma poligonal, la superficie del líquido sube o desciende formando picos que dependen del ángulo de la esquina para satisfacer los ángulos de contacto con la superficie (**Figura S4**) (97).

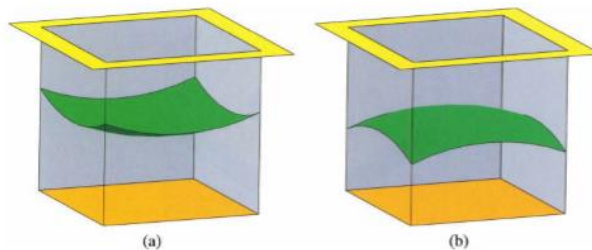


Figura S4: Líquido acuoso en un micropozo con forma poligonal y ángulos de contacto de: a) 70° (hidrofílico) y b) 110° (hidrofóbico) (97).

La evaporación local depende de la curvatura de la superficie de la gota. A la vez que el movimiento y deposición de partículas depende de la evaporación(39). Cuando la superficie es cóncava el centro del pozo se seca primero. Si el menisco no es muy curvado la evaporación sería más o menos uniforme. Si la superficie es convexa, la evaporación resulta en un secado de las esquinas primero, formando una pequeña gota al fondo del pozo durante las últimas etapas de evaporación (123).

Apéndice B

I. Efecto de rugosidad explicado por los Modelos de Cassie-Baxter y Wenzel.

Los trabajos de modificación a superficies aprovechan el fenómeno explicado por las ecuaciones de Cassie-Baxter y Wenzel mediante la formación de estructuras en escala micrométrica, nanométrica, o jerárquica (combinación de ambas) como se muestra en la **Figura S5**, mimetizando ejemplos que ofrece la naturaleza como las hojas de Lotus (124).

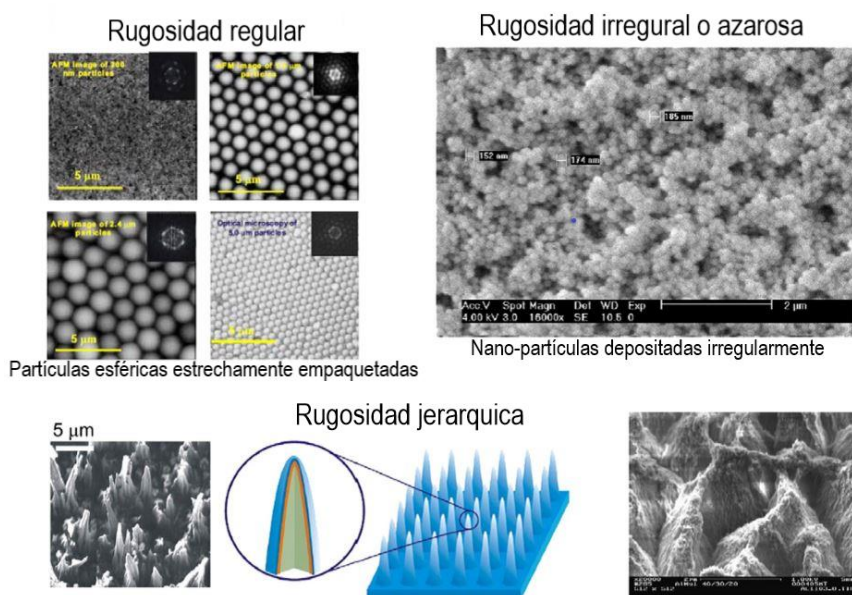


Figura S5: Diferentes estrategias para el diseño de superficies poliméricas rugosas para investigar los efectos de rugosidad y mojabilidad (124).

Estas estructuras físicas pueden tener dos efectos diferentes que dependen de la química de superficie. Si ésta es hidrofóbica, la rugosidad ayuda a la formación de espacios donde el agua no penetra, pero el aire sí, formando interfaces con espacios líquido-aire intercaladas con la interfaz sólido-líquido, dando como resultado un sustrato de tipo compuesto, casos descritos por las ecuaciones de Cassie-Baxter (**Figura S6b**). En caso contrario, si la superficie es hidrofílica el líquido se desplazará por las paredes de la rugosidad penetrando en los huecos, teniendo una mayor superficie de contacto y por lo tanto mayor adherencia, casos descritos por la ecuación de Wenzel (125) (**Figura S6a**). De acuerdo con la fórmula

de Cassie-Baxter el factor rugosidad potencializa el carácter hidrofílico o hidrofóbico de la superficie, según sea el caso (126).

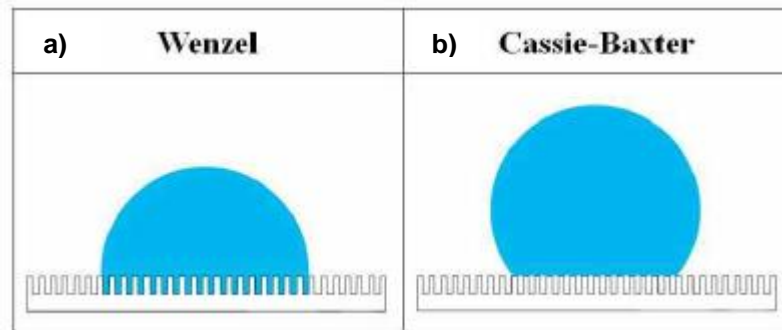


Figura S6: Efecto de microestructuras, a) en el caso Wenzel el líquido penetra entre las microestructuras, b) en el caso Cassie -Baxter la gota se mantiene suspendida sobre los espacios de aire.

La presencia de rugosidad tiene efecto no solo en el ángulo de contacto, sino también en la histéresis, al aumentar el anclaje de la línea de contacto, considerándose que es la histéresis y no la hidrofobicidad en sí la que determina el valor del ángulo de contacto (51).

Cuando la geometría de las rugosidades es regular, es posible determinar la fuerza de anclaje de la línea de contacto mediante fórmulas basadas en las ecuaciones de Young y Cassie-Baxter cambiando la fracción de área de superficie en contacto (127), pero esto se complica para rugosidad irregular.

La aplicación de los modelos de Wenzel a superficies con ángulo de contacto de histéresis elevado ha presentado errores, ya que la ecuación de Young (Ec.1.1) que ha sido utilizada como un modelo básico para medir la mojabilidad de una superficie no considera la histéresis sino una superficie ideal.

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (\text{S8})$$

Donde γ_{SV} , γ_{SL} y γ_{LV} (N/m) representan la tensión superficial en las interfaces sólido-vapor, sólido-líquido y líquido vapor, respectivamente.

El modelo de Wenzel considera superficies rugosas, pero químicamente homogéneas (125),

$$\cos \theta_{\text{rugoso}} = r \theta_{\gamma} \quad (\text{S9})$$

Donde r , es el factor de rugosidad determinado por la superficie aparente entre la real y θ_Y es el ángulo de contacto de Young. Mientras que el modelo de Cassie-Baxter considera superficie plana con heterogeneidad química (128), donde f_1 y f_2 representan las fracciones de área de sólido y aire debajo de la gota respectivamente. De acuerdo con esta fórmula a mayor fracción de área de aire mayor ángulo de contacto

$$\cos \theta^* = f_1 \cos \theta_1 - f_2 \cos \theta_2 \quad (S10)$$

En años más recientes se ha planteado que estas ecuaciones no fueron derivadas correctamente desde un punto de vista físico, pero pueden ser re-derivadas desde un punto de vista termodinámico considerando la minimización de energía y la rugosidad o heterogeneidad química (52) (129).

Por otro lado, se ha encontrado que los parámetros utilizados durante la creación de rugosidad en PMMA afectan las propiedades de mojabilidad, aunque la química de superficie permanezca sin aparente cambio, creando la posibilidad de la transición del estado Cassie al Wenzel (130).

Apéndice C

I. Efecto del tamaño del pilar (diámetro) en el tiempo de evaporación de la gota

Durante la evaporación limitada por difusión a 47% H.R para diferentes volúmenes en pilares de diferentes diámetros se observó una disminución del volumen con una pendiente muy similar para volúmenes de 1, 2 y 3 μl , sin embargo, se puede observar en la **Figura S7** que, al reducir el diámetro del pilar se presenta un ligero aumento en el tiempo de evaporación de la gota.

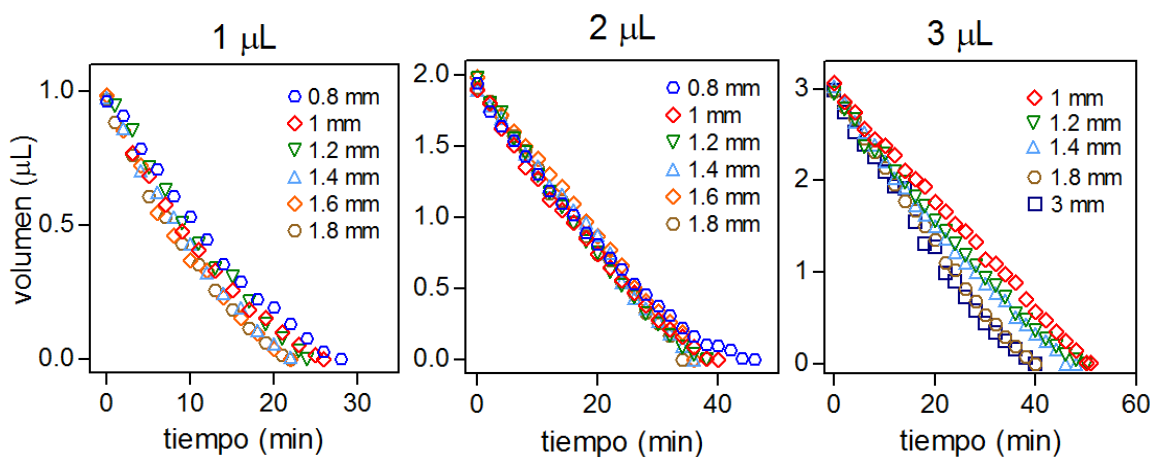


Figura S7: Evaporación de gotas de diferentes volúmenes iniciales sobre pilares de diferentes diámetros.

II. Singularidades durante la evaporación de diferentes sustancias

En la fase final de la evaporación se pueden presentar diferentes escenarios donde la condición de anclaje al pilar o la forma esférica se pierde, por ejemplo:

Agua. – Al ser una sustancia pura de alta tensión superficial, los bordes del pilar mantienen fijo el radio de contacto excepto en la última fase donde la barrera de energía es superada por las fuerzas de cohesión molecular llevándola a un estado de equilibrio (AC 68°-73°) con el correspondiente radio y altura. Los volúmenes y momentos pueden variar de una gota a otra debido a que la rugosidad del borde es irregular (**Figura S8a**).

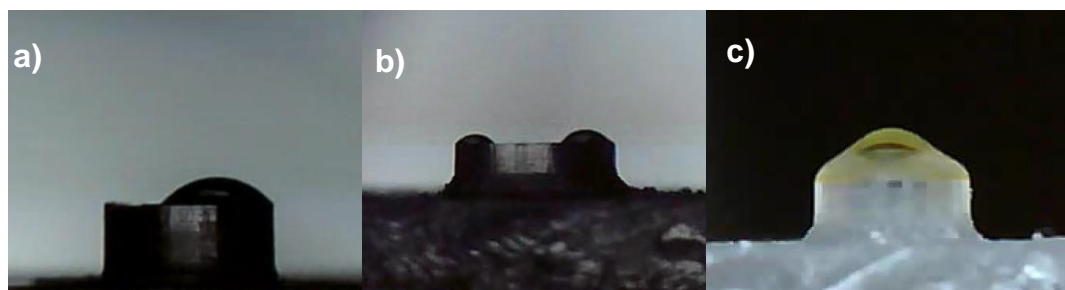


Figura S8: Ejemplos en donde se pierden condiciones de radio de contacto constante o esfericidad en gotas durante la fase final de la evaporación para: a) agua, b) agua-etanol 70% y c) plasma sanguíneo.

Mezcla agua etanol. - Al tener una mezcla de dos componentes, la tensión superficial de la solución se reduce en la proporción del componente de menor

tensión superficial. Como consecuencia, el volumen de las gotas debe ser reducido para poder sostenerlas sobre el pilar. El anclaje de la gota al borde del pilar prevalecía y la gota se dividía en dos gotas pequeñas, no necesariamente iguales, pero cada una de ellas fija a algún sitio del borde (**Figura S8b**), esto deriva de la evaporación preferencial del etanol.

Mezcla agua/PEG. – El PEG es empleado para reducir la tensión superficial en algunos ensayos, al agregar un componente con grupos hidrofóbicos de metileno a lo largo de la cadena de polímero intercalados con los grupos hidrofílicos éter o alcohol, proporciona una aparente disminución de polaridad en la disolución. Sin embargo, en nuestros experimentos de evaporación las condiciones de esfericidad y radio de contacto constante se mantienen hasta el final.

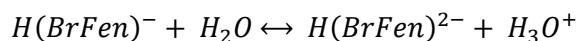
Plasma sanguíneo. - Aunque su principal componente es el agua, contiene un gran número de proteínas, sales y compuestos orgánicos. La tensión superficial permite tener gotas de volúmenes y ángulos de contacto iniciales similares a los del agua, al evaporarse ésta los componentes disueltos favorecen el anclaje, aunque estos se van acumulando en el centro de la gota formando un montículo que se desvía de la forma esférica (**Figura S8c**).

Debido a estas anomalías las curvas de evolución del ángulo de contacto y altura presentaron valores desviados de la curva solo en la última fase. Por lo demás se encontró factible la elaboración de un modelo que sirva para predecir la evaporación en la mayor parte del proceso.

Apéndice D

I. Reacción de conjugación de BSA a cromógeno en gotas

El sistema albúmina de suero bovino (BSA) y Bromofenol azul (BPB) ha sido elegido modelo de bioensayo por evaporación de gotas para demostrar la facilidad del análisis colorimétrico usando un pilar. Un resultado positivo en este caso es indicado por un cambio de color del BPB de amarillo a azul (90), ya que su cinética ha sido bien caracterizada desde hace décadas (131). El bromofenol azul es una molécula orgánica de carácter ácido débil al disolverlo en agua, este indicador tiene dos formas de equilibrio: $H(BrFen)^-$ y $H(BrFen)^{2-}$, la primera de color amarillo y la segunda azul púrpura, o un color verdoso en la mezcla de ambas. El equilibrio es:



El BPB interactúa con BSA en soluciones ácidas por fuerzas electrostáticas no específicas (132), ya que el BSA molecular está cargado positivamente (133). El cambio de color durante la combinación se debe a la transformación de especies colorantes de la forma acídica libre a la forma básica enlazada, así como a los efectos batocrómicos (la longitud de onda de absorción se desplaza hacia longitudes de orden mayor o de menor energía por efecto del solvente o por la presencia de distintos sustituyentes químicos) e hipercrómicos de conjugación (incremento de absorbancia en un material).

II. Prueba de detección de BSA en papel y en superficie plana de PMMA

En la prueba sobre papel se delimitó una zona donde se colocó la solución base permitiendo evaporar, al colocar la solución de BSA un cambio de color de amarillo a azul fue observado inmediatamente indicando la reacción. La mancha amarilla corresponde a la solución de BPB donde el principal solvente es el etanol. Las gotas de esta solución tienden a ser más aplanadas por lo que su extensión es mayor. La capilaridad y baja viscosidad del alcohol permitió un mayor desplazamiento por las fibras del papel (**Figura S9a**).

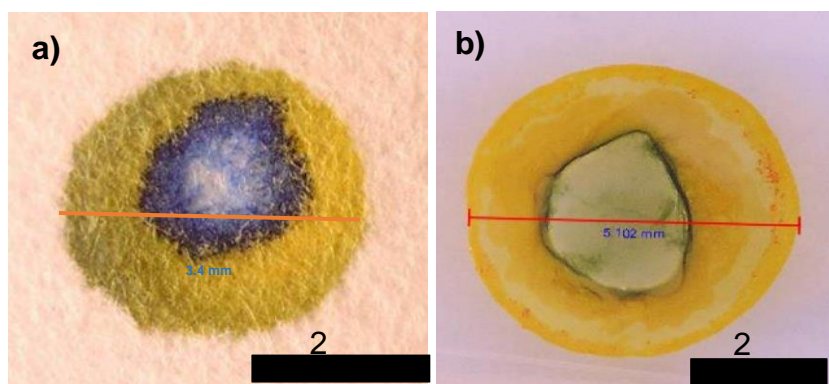


Figura S9: Prueba de detección de BSA a) en papel y b) en superficie plana de PMMA.

La segunda gota que contiene el BSA disuelto principalmente en agua abarca un espacio menor por lo que no toda la mancha amarilla alcanza a teñirse de azul. Aunque la intensidad de color alcanzada en esta prueba es muy buena, no se

observa uniformidad. El efecto de capilaridad de la solución en el papel arrastró los colorantes de manera radial por lo que se observa carencia de color en el centro (**Figura S9a**).

Al realizar el mismo procedimiento, pero en una superficie plana de PMMA la gota a base de solución etílica se extendió más de 5 mm, dejando una mancha amarilla no homogénea que se observa en la **Figura S9b**. La segunda gota que, aunque es del mismo volumen, corresponde a la solución proteica a base de agua, no se extiende con la misma amplitud, sino aproximadamente 2 mm, mismos que abarcaría una gota de agua pura de volumen similar.

Para determinar los volúmenes de gotas a utilizar en los pilares primero se realizaron pruebas de mojabilidad sobre una superficie plana de PMMA (**Figura S10**). Ya que la presencia de etanol en la solución no permite tener gotas “altas”, éstas se extienden sobre la superficie. Al colocar una gota de 1 μl sobre una superficie plana infinita de PMMA esta abarca más de 5 mm de diámetro a diferencia de las gotas sin alcohol que solo se extienden 2 mm.

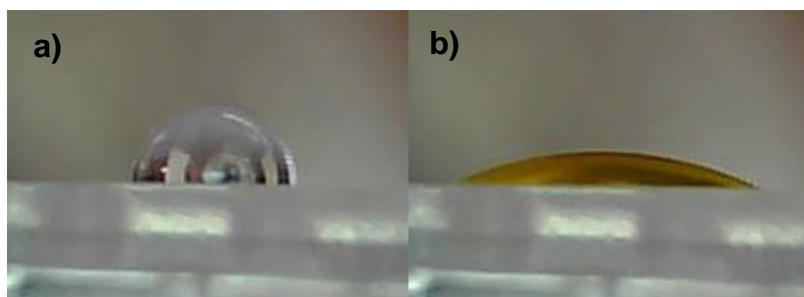


Figura S10: Perfil de gotas de 1 μl sobre una superficie de PMMA plana infinita de a) solución acuosa de BSA y b) solución base con etanol.

Si una gota de este mismo volumen se intenta colocar sobre uno de los pilares, el efecto de anclaje por la rugosidad del borde no es suficiente, las gotas se derraman del pilar, tanto al colocar la solución base, como en la colocación de la muestra de BSA, aun al aumentar el diámetro del pilar de 0.8 mm a 1.8 mm. En la **Figura S11** se observan las huellas de dicho derrame, sin embargo, el cambio de color fue observado lo que indica que hay que hacer el ajuste de volumen.

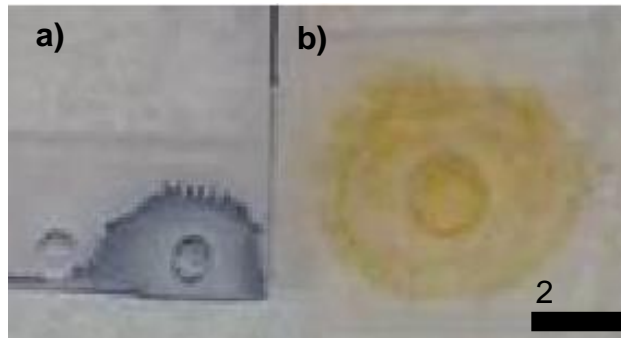


Figura S11: Derramamiento de gotas de 1 μ l de solución para la prueba de detección de BSA, en pilares de a) 0.8 mm y b) 1.8 mm.

La tensión superficial de una solución depende de la tensión superficial de sus componentes individuales y la proporción de estos, por lo tanto, una reducción en la fracción del componente más volátil ayudaría a tener una mayor tensión superficial. Los cambios en las proporciones deben considerar la química de la reacción para no afectar los resultados.

Apéndice E

I. Desplazamiento de células muertas hacia el centro del pilar

Después de esperar tres días posteriores a la siembra de las células, en pilares tratados con Poli-L-Lisina se observó que las células no habían conseguido adherirse, sin embargo, en la superficie de PMMA sin tratamiento las células THP-1 (y también monocitos primarios) fueron adheridas y se mostraban distribuidas a lo largo de la superficie del pilar (**Figura S12a**). En cambio, en la superficie tratada con PLL las células mostraron un acomodo preferencial en la zona central de los pilares (**Figura S12b**).

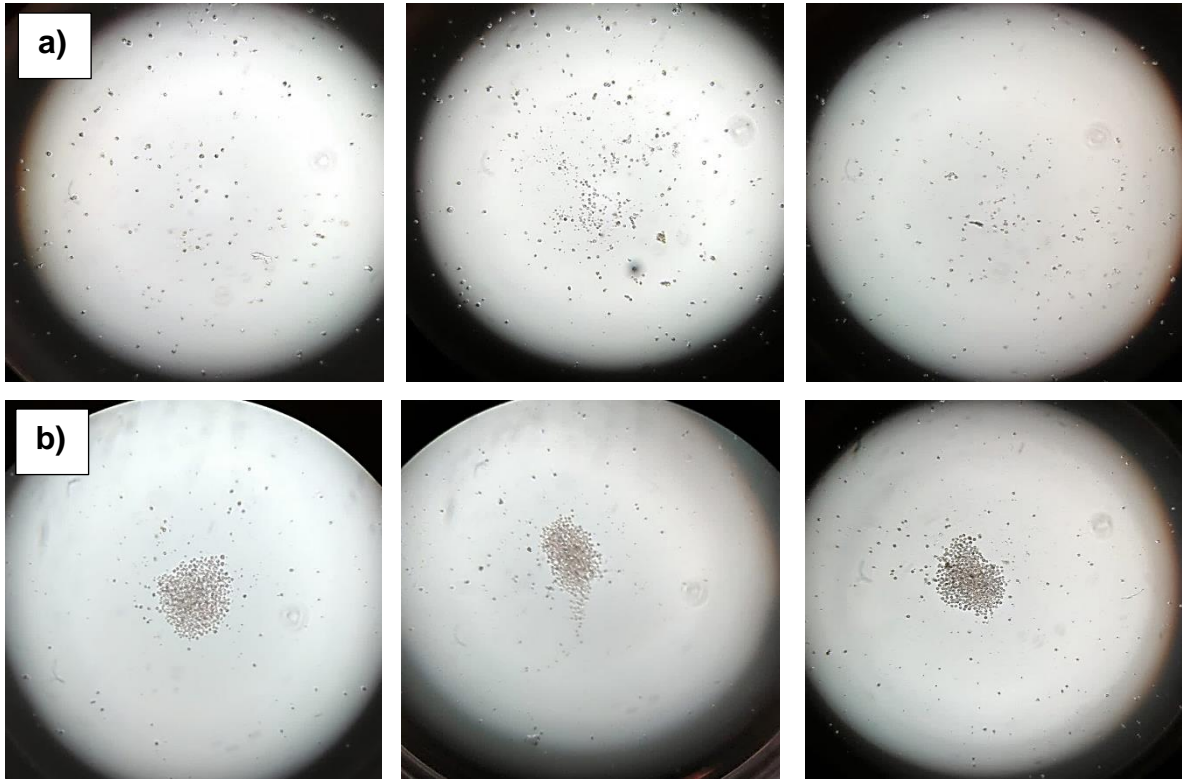


Figura S12: Distribución de células THP-1 diferenciadas a adherentes sobre pilares a) sin tratamiento y b) con tratamiento de PLL. Las células no adheridas se concentran en el centro del pilar.

11. Bibliografía

1. H. Song, D. L. Chen, R. F. Ismagilov, Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2006), , doi:10.1002/anie.200601554.
2. T. A. H. Nguyen, A. V. Nguyen, M. A. Hampton, Z. P. Xu, L. Huang, V. Rudolph, Theoretical and experimental analysis of droplet evaporation on solid surfaces. *Chem. Eng. Sci.* (2012), doi:10.1016/j.ces.2011.11.009.
3. X. Chen, R. Ma, J. Li, C. Hao, W. Guo, B. L. Luk, S. C. Li, S. Yao, Z. Wang, Evaporation of droplets on superhydrophobic surfaces: Surface roughness and small droplet size effects. *Phys. Rev. Lett.* (2012), doi:10.1103/PhysRevLett.109.116101.
4. O. Carrier, N. Shahidzadeh-Bonn, R. Zargar, M. Aytouna, M. Habibi, J. Eggers, D. Bonn, Evaporation of water: Evaporation rate and collective effects. *J. Fluid Mech.* (2016), doi:10.1017/jfm.2016.356.
5. P. Calvert, Inkjet printing for materials and devices. *Chem. Mater.* (2001), , doi:10.1021/cm0101632.
6. I. S. Khattab, F. Bandarkar, M. Khoubnasabjafari, A. Jouyban, Density, viscosity, surface tension, and molar volume of propylene glycol + water mixtures from 293 to 323 K and correlations by the Jouyban–Acree model. *Arab. J. Chem.* (2017), doi:10.1016/j.arabjc.2012.07.012.
7. Y. S. Yu, Z. Wang, Y. P. Zhao, Experimental and theoretical investigations of evaporation of sessile water droplet on hydrophobic surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* (2012), doi:10.1016/j.jcis.2011.09.007.
8. L. B. Pinheiro, V. A. Coleman, C. M. Hindson, J. Herrmann, B. J. Hindson, S. Bhat, K. R. Emslie, Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal. Chem.* (2012), doi:10.1021/ac202578x.
9. D. Brutin, B. Sobac, B. Loquet, J. Sampol, Pattern formation in drying drops of blood. *J. Fluid Mech.* (2011), doi:10.1017/S0022112010005070.
10. A. Cerf, T. Alava, R. A. Barton, H. G. Craighead, Transfer-printing of single dna molecule arrays on graphene for high-resolution electron imaging and analysis. *Nano Lett.* (2011), doi:10.1021/nl202219w.
11. K. Tang, A. Gomez, Generation by electrospray of monodisperse water droplets for targeted drug delivery by inhalation. *J. Aerosol Sci.* (1994), doi:10.1016/0021-8502(94)90212-7.
12. J. L. Garcia-Cordero, Z. H. Fan, Sessile droplets for chemical and biological assays. *Lab Chip* (2017), , doi:10.1039/c7lc00366h.
13. A. J. D. Shaikkea, S. Basu, A. Tyagi, S. Sharma, R. Hans, L. Bansal, Universal representations of evaporation modes in sessile droplets. *PLoS One* (2017), doi:10.1371/journal.pone.0184997.
14. H. Hu, R. G. Larson, Analysis of the effects of marangoni stresses on the microflow in an evaporating sessile droplet. *Langmuir* (2005), doi:10.1021/la0475270.

15. G. Laghezza, E. Dietrich, J. M. Yeomans, R. Ledesma-Aguilar, E. S. Kooij, H. J. W. Zandvliet, D. Lohse, Collective and convective effects compete in patterns of dissolving surface droplets. *Soft Matter* (2016), doi:10.1039/c6sm00767h.
16. W. Satoh, H. Hosono, H. Suzuki, On-chip microfluidic transport and mixing using electrowetting and incorporation of sensing functions. *Anal. Chem.* (2005), doi:10.1021/ac050821s.
17. E. Kreit, M. Dhindsa, S. Yang, M. Hagedon, K. Zhou, I. Papautsky, J. Heikenfeld, Laplace barriers for electrowetting thresholding and virtual fluid confinement. *Langmuir* (2010), doi:10.1021/la104090t.
18. É. Lorenceau, C. Clanet, D. Quéré, Capturing drops with a thin fiber. *J. Colloid Interface Sci.* (2004), doi:10.1016/j.jcis.2004.06.054.
19. H. Chen, N. Tabatabaei, A. Amirfazli, Liquid bridge as a tunable-focus cylindrical liquid lens. *Appl. Phys. Lett.* (2017), doi:10.1063/1.4974324.
20. Z. F. Zhu, J. Y. Jia, H. Z. Fu, Y. L. Chen, Z. Zeng, D. L. Yu, Shape and force analysis of capillary bridge between two slender structured surfaces. *Mech. Sci.* (2015), doi:10.5194/ms-6-211-2015.
21. M. Bäumer, Book Review: Surface Science—An Introduction. By K. Oura, V. G. Lifshits, A. A. Saranin, A. V. Zotov and M. Katayama. *ChemPhysChem* (2004), doi:10.1002/cphc.200490017.
22. J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces: Third Edition* (2011).
23. J. R. ed. Rumble, *Handbook of Chemistry and Physics 99th Edition* (2018).
24. S. R. Palit, Thermodynamic interpretation of the eötvös constant. *Nature* (1956), , doi:10.1038/1771180a0.
25. A. Alexeev, T. Gambaryan-Roisman, P. Stephan, Marangoni convection and heat transfer in thin liquid films on heated walls with topography: Experiments and numerical study. *Phys. Fluids* (2005), doi:10.1063/1.1936933.
26. K. Szymczyk, A. Zdziennicka, B. Jańczuk, W. Wójcik, The wettability of polytetrafluoroethylene and polymethyl methacrylate by aqueous solution of two cationic surfactants mixture. *J. Colloid Interface Sci.* (2006), doi:10.1016/j.jcis.2005.06.038.
27. F. Ravera, E. Santini, G. Loglio, M. Ferrari, L. Liggieri, Effect of nanoparticles on the interfacial properties of liquid/liquid and liquid/air surface layers. *J. Phys. Chem. B* (2006), doi:10.1021/jp0636468.
28. N. Alon, V. D. Milman, λ_1 , Isoperimetric inequalities for graphs, and superconcentrators. *J. Comb. Theory, Ser. B* (1985), doi:10.1016/0095-8956(85)90092-9.
29. J. Berthier, K. A. Brakke, *The Physics of Microdroplets* (2012).
30. P. K. Notz, O. A. Basaran, Dynamics of drop formation in an electric field. *J. Colloid Interface Sci.* (1999), doi:10.1006/jcis.1999.6136.
31. E. Berthier, D. J. Beebe, Flow rate analysis of a surface tension driven passive micropump. *Lab Chip* (2007), doi:10.1039/b707637a.
32. J. J. Hegseth, N. Rashidnia, A. Chai, Natural convection in droplet evaporation. *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* (1996), doi:10.1103/PhysRevE.54.1640.
33. E. Berthier, J. Warrick, H. Yu, D. J. Beebe, Managing evaporation for more

- robust microscale assays. Part 1. Volume loss in high throughput assays. *Lab Chip* (2008).
34. S. A. Kulinich, M. Farzaneh, Effect of contact angle hysteresis on water droplet evaporation from super-hydrophobic surfaces. *Appl. Surf. Sci.* (2009), doi:10.1016/j.apsusc.2008.10.109.
 35. K. S. Birdi, D. T. Vu, A. Winter, A study of the evaporation rates of small water drops placed on a solid surface. *J. Phys. Chem.* (1989), doi:10.1021/j100346a065.
 36. R. A. Meric, H. Y. Erbil, Evaporation of Sessile Drops on Solid Surfaces: Pseudospherical Cap Geometry. *Langmuir* (2002), doi:10.1021/la970147c.
 37. H. Y. Erbil, G. McHale, M. I. Newton, Drop evaporation on solid surfaces: Constant contact angle mode. *Langmuir* (2002), doi:10.1021/la011470p.
 38. H. Hu, R. G. Larson, Evaporation of a sessile droplet on a substrate. *J. Phys. Chem. B* (2002), doi:10.1021/jp0118322.
 39. R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* (1997), doi:10.1038/39827.
 40. A. Marmur, Solid-Surface Characterization by Wetting. *Annu. Rev. Mater. Res.* (2009), doi:10.1146/annurev.matsci.38.060407.132425.
 41. A. Marmur, in *Contact Angle, Wettability and Adhesion, Volume 6* (2010).
 42. V. D. Ta, A. Dunn, T. J. Wasley, J. Li, R. W. Kay, J. Stringer, P. J. Smith, E. Esenturk, C. Connaughton, J. D. Shephard, Laser textured superhydrophobic surfaces and their applications for homogeneous spot deposition. *Appl. Surf. Sci.* (2016), doi:10.1016/j.apsusc.2016.01.019.
 43. E. Duval, M. Kozanecki, L. Saviot, L. David, S. Etienne, V. A. Bershtein, V. A. Ryzhov, Nanostructure and low-frequency vibrations in plasticized poly(methyl methacrylate). *Europhys. Lett.* (1998), doi:10.1209/epl/i1998-00535-4.
 44. A. Laganà, I materiali plastici: poliuretano, polimetilmetacrilato e polivinilcloruro: tre casi di studio TT - Plastic materials: polyurethane, polymethylmetacrylate and polyvinyl chloride: three case studies. *Boll. ICR* (2008).
 45. Y. Ma, X. Cao, X. Feng, Y. Ma, H. Zou, Fabrication of super-hydrophobic film from PMMA with intrinsic water contact angle below 90°. *Polymer (Guildf)*. (2007), doi:10.1016/j.polymer.2007.10.038.
 46. X. Li, Y. Han, L. An, Surface morphology control of immiscible polymer-blend thin films. *Polymer (Guildf)*. (2003), doi:10.1016/j.polymer.2003.10.012.
 47. A. Nakajima, K. Hashimoto, T. Watanabe, in *Monatshefte fur Chemie* (2001).
 48. B. Cortese, S. D'Amone, M. Manca, I. Viola, R. Cingolani, G. Gigli, Superhydrophobicity due to the hierarchical scale roughness of PDMS surfaces. *Langmuir* (2008), doi:10.1021/la702764x.
 49. M. He, D. Liao, H. Qiu, Multicomponent Droplet Evaporation on Chemical Micro-Patterned Surfaces. *Sci. Rep.* (2017), doi:10.1038/srep41897.
 50. F. C. Wang, H. A. Wu, Pinning and depinning mechanism of the contact line during evaporation of nano-droplets sessile on textured surfaces. *Soft Matter* (2013), doi:10.1039/c3sm50530h.
 51. S. Wu, *Polymer interface and adhesion* (2017).

52. K. Seo, M. Kim, D. H. Kim, in *Surface Energy* (2015).
53. W. Z. Yuan, L. Z. Zhang, Pinning-Depinning Mechanisms of the Contact Line during Evaporation of Microdroplets on Rough Surfaces: A Lattice Boltzmann Simulation. *Langmuir* (2018), doi:10.1021/acs.langmuir.8b00857.
54. B. Samuel, H. Zhao, K. Y. Law, Study of wetting and adhesion interactions between water and various polymer and superhydrophobic surfaces. *J. Phys. Chem. C* (2011), doi:10.1021/jp2032466.
55. M. E. Buzoverya, Y. P. Shcherbak, I. V. Shishpor, Experimental investigation of the serum albumin fascia microstructure. *Tech. Phys.* (2012), doi:10.1134/s1063784212090071.
56. M. A. Kadhim, N. Kapur, J. L. Summers, H. Thompson, Experimental and Theoretical Investigation of Droplet Evaporation on Heated Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* (2019), doi:10.1021/acs.langmuir.8b03601.
57. T. A. H. Nguyen, A. V. Nguyen, On the lifetime of evaporating sessile droplets. *Langmuir* (2012), doi:10.1021/la2036955.
58. J. M. Stauber, S. K. Wilson, B. R. Duffy, K. Sefiane, On the lifetimes of evaporating droplets. *J. Fluid Mech.* (2014), doi:10.1017/jfm.2014.94.
59. T. W. G. Van Der Heijden, A. A. Darhuber, P. Van Der Schoot, Macroscopic Model for Sessile Droplet Evaporation on a Flat Surface. *Langmuir* (2018), doi:10.1021/acs.langmuir.8b02374.
60. X. Man, M. Doi, Ring to Mountain Transition in Deposition Pattern of Drying Droplets. *Phys. Rev. Lett.* (2016), doi:10.1103/PhysRevLett.116.066101.
61. P. G. de Gennes, Wetting: statistics and dynamcis. *Rev. Mod. Phys.* (1985), doi:10.1016/j.juro.2012.02.243.
62. A. A. Amooey, M. Fazlollahnejad, Study of Surface Tension of Binary Mixtures of Poly (Ethylene Glycol) in Water and Poly (Propylene Glycol) in Ethanol and its Modeling Using Neural Network. *Iran. J. Chem. Eng.* (2014).
63. W. J. Massman, A review of the molecular diffusivities of H₂O, CO₂, CH₄, CO, O₃, SO₂, NH₃, N₂O, NO, and NO₂ in air, O₂ and N₂ near STP. *Atmos. Environ.* (1998), , doi:10.1016/S1352-2310(97)00391-9.
64. R. G. Larson, Transport and deposition patterns in drying sessile droplets. *AIChE J.* (2014), doi:10.1002/aic.14338.
65. R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, Contact line deposits in an evaporating drop. *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* (2000), doi:10.1103/PhysRevE.62.756.
66. E. C., "Vortices and Streams Caused By Sound Waves" (1948).
67. M. R. Barmi, C. Andreou, M. R. Hoonejani, M. Moskovits, C. D. Meinhart, Aggregation kinetics of SERS-active nanoparticles in thermally stirred sessile droplets. *Langmuir* (2013), doi:10.1021/la400949x.
68. A. K. Thokchom, S. K. Majumder, A. Singh, Internal fluid motion and particle transport in externally heated sessile droplets. *AIChE J.* (2016), doi:10.1002/aic.15098.
69. C. Diddens, Detailed finite element method modeling of evaporating multi-component droplets. *J. Comput. Phys.* (2017), doi:10.1016/j.jcp.2017.03.049.
70. Y. Li, C. Diddens, P. Lv, H. Wijshoff, M. Versluis, D. Lohse, Gravitational Effect in Evaporating Binary Microdroplets. *Phys. Rev. Lett.* (2019),

- doi:10.1103/PhysRevLett.122.114501.
71. R. Bhardwaj, Analysis of an Evaporating Sessile Droplet on a Non-Wetted Surface. *Colloids Interface Sci. Commun.* (2018), doi:10.1016/j.colcom.2018.02.004.
 72. M. R. Barmi, C. D. Meinhart, Convective flows in evaporating sessile droplets. *J. Phys. Chem. B.* **118**, 2414–2421 (2014).
 73. J. Berthier, *Chapter 3 - The Physics of Droplets* (2013).
 74. X. Ding, P. Li, S. C. S. Lin, Z. S. Stratton, N. Nama, F. Guo, D. Slotcavage, X. Mao, J. Shi, F. Costanzo, T. J. Huang, Surface acoustic wave microfluidics. *Lab Chip* (2013), , doi:10.1039/c3lc50361e.
 75. A. J. D. Shaikkea, S. Basu, Evaporating sessile droplet pair: Insights into contact line motion, flow transitions and emergence of universal vaporisation pattern. *Appl. Phys. Lett.* (2016), doi:10.1063/1.4953836.
 76. R. Hernandez-Perez, Z. H. Fan, J. L. Garcia-Cordero, Evaporation-Driven Bioassays in Suspended Droplets. *Anal. Chem.* (2016), doi:10.1021/acs.analchem.6b01657.
 77. A. S. Levey, K. U. Eckardt, Y. Tsukamoto, A. Levin, J. Coresh, J. Rossert, D. De Zeeuw, T. H. Hostetter, N. Lameire, G. Eknoyan, K. Willis, Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* (2005), doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00365.x.
 78. A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, G. M. Whitesides, Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal. Chem.* (2008), doi:10.1021/ac800112r.
 79. N. M. Neris, R. D. Guevara, A. Gonzalez, F. A. Gomez, 3D Multilayered paper- and thread/paper-based microfluidic devices for bioassays. *Electrophoresis* (2019), doi:10.1002/elps.201800383.
 80. J. H. Yu, S. G. Jeong, C. S. Lee, J. Y. Hwang, K. T. Kang, H. Kang, S. H. Lee, Fabrication of a paper-based analytical device for multiple colorimetric analysis via inkjet-printing and paper-cutting. *Biochip J.* (2015), doi:10.1007/s13206-015-9207-2.
 81. S. Ainsworth, M. T. Flanagan, The effects that the environment exerts on the spectroscopic properties of certain dyes that are bound by bovine serum albumin. *BBA - Protein Struct.* (1969), doi:10.1016/0005-2795(69)90196-2.
 82. A. Denizli, E. Pişkin, Dye-ligand affinity systems. *J. Biochem. Biophys. Methods* (2001), , doi:10.1016/S0165-022X(01)00209-3.
 83. U. Kragh-Hansen, J. V. Møller, Protein binding of small molecules. II. Role of electrostatic forces for binding of phenol red by human serum albumin. *BBA - Protein Struct.* (1973), doi:10.1016/0005-2795(73)90040-8.
 84. C. E. Williamson, A. H. Corwin, The nature of some protein microenvironmental effects. *J. Colloid Interface Sci.* (1972), doi:10.1016/0021-9797(72)90391-8.
 85. A. A. A. Halim, H. A. Kadir, S. Tayyab, Bromophenol blue binding as a probe to study urea and guanidine hydrochloride denaturation of bovine serum albumin. *J. Biochem.* (2008), doi:10.1093/jb/mvn036.
 86. S. Kreft, M. Kreft, Quantification of dichromatism: a characteristic of color in

- transparent materials. *J. Opt. Soc. Am. A* (2009), doi:10.1364/josaa.26.001576.
87. J. O. Maryadele, Neil. The Merck Index: An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Merck and Co. Inc. *Whitehouse Station. New Jersey* (2006).
 88. J. McLane, C. Wu, M. Khine, Superhydrophobic Surfaces: Enhanced Detection of Protein in Urine by Droplet Evaporation on a Superhydrophobic Plastic (Adv. Mater. Interfaces 1/2015). *Adv. Mater. Interfaces* (2015), doi:10.1002/admi.201570002.
 89. A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, G. M. Whitesides, Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2007), doi:10.1002/anie.200603817.
 90. Y. SUZUKI, Guidance for Selecting the Measurement Conditions in the Dye-binding Method for Determining Serum Protein: Theoretical Analysis Based on the Chemical Equilibrium of Protein Error. *Anal. Sci.* (2005), doi:10.2116/analsci.17.1263.
 91. H. Hu, R. G. Larson, Evaporation of a sessile droplet on a substrate. *J. Phys. Chem. B* (2002), doi:10.1021/jp0118322.
 92. C. Diddens, J. G. M. Kuerten, C. W. M. van der Geld, H. M. A. Wijshoff, Modeling the evaporation of sessile multi-component droplets. *J. Colloid Interface Sci.* (2017), doi:10.1016/j.jcis.2016.10.030.
 93. E. Postnikova, Y. Cong, L. E. DeWald, J. Dyall, S. Yu, B. J. Hart, H. Zhou, R. Gross, J. Logue, Y. Cai, N. Deiuliis, J. Michelotti, A. N. Honko, R. S. Bennett, M. R. Holbrook, G. G. Olinger, L. E. Hensley, P. B. Jahrling, Testing therapeutics in cell-based assays: Factors that influence the apparent potency of drugs. *PLoS One* (2018), doi:10.1371/journal.pone.0194880.
 94. E. Michelini, L. Cevenini, L. Mezzanotte, A. Coppa, A. Roda, Cell-based assays: Fuelling drug discovery. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010), , doi:10.1007/s00216-010-3933-z.
 95. D. L. Taylor, J. R. Haskins, K. A. Giuliano, *High Content Screening: A Powerful Approach to Systems Cell Biology and Drug Discovery* (2007).
 96. W. F. An, N. Tolliday, Cell-based assays for high-throughput screening. *Mol. Biotechnol.* (2010), , doi:10.1007/s12033-010-9251-z.
 97. P. Concus, R. Finn, ON THE BEHAVIOR OF A CAPILLARY SURFACE IN A WEDGE. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1969), doi:10.1073/pnas.63.2.292.
 98. Y. S. Yu, Z. Wang, Y. P. Zhao, Experimental and theoretical investigations of evaporation of sessile water droplet on hydrophobic surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **365**, 254–259 (2012).
 99. C. Y. Jiang, L. Dong, J. K. Zhao, X. Hu, C. Shen, Y. Qiao, X. Zhang, Y. Wang, R. F. Ismagilov, S. J. Liu, W. Du, High-throughput single-cell cultivation on microfluidic streak plates. *Appl. Environ. Microbiol.* (2016), doi:10.1128/AEM.03588-15.
 100. L. Bansal, S. Chakraborty, S. Basu, Confinement-induced alterations in the evaporation dynamics of sessile droplets. *Soft Matter* (2017), doi:10.1039/C6SM02429G.
 101. E. Berthier, J. Warrick, H. Yu, D. J. Beebe, Managing evaporation for more robust microscale assays. Part 1. Volume loss in high throughput assays.

- Lab Chip*. **8**, 852–859 (2008).
102. A. A. Khalili, M. R. Ahmad, A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int. J. Mol. Sci.* (2015), , doi:10.3390/ijms160818149.
 103. G. Sagvolden, I. Giaever, E. O. Pettersen, J. Feder, Cell adhesion force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1999), doi:10.1073/pnas.96.2.471.
 104. R. J. Crawford, H. K. Webb, V. K. Truong, J. Hasan, E. P. Ivanova, Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Adv. Colloid Interface Sci.* (2012), , doi:10.1016/j.cis.2012.06.015.
 105. K. Bazaka, M. V. Jacob, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2012), , doi:10.1007/s00253-012-4144-7.
 106. P. Thevenot, W. Hu, L. Tang, Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr. Top. Med. Chem.* (2008).
 107. A. Nouri, C. Wen, in *Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials* (2015).
 108. P. K. Chu, J. Y. Chen, L. P. Wang, N. Huang, Plasma-surface modification of biomaterials. *Mater. Sci. Eng. R Reports* (2002), , doi:10.1016/S0927-796X(02)00004-9.
 109. D. T. K. Kwok, H. Wang, Y. Zhang, K. W. K. Yeung, P. K. Chu, Effects of long pulse width and high pulsing frequency on surface superhydrophobicity of polytetrafluoroethylene in quasi-direct-current plasma immersion ion implantation. *J. Appl. Phys.* (2009), doi:10.1063/1.3082122.
 110. D. Daineka, P. Bulkin, G. Girard, J.-E. Bourée, B. Drévilion, High density plasma enhanced chemical vapor deposition of optical thin films. *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* (2004), doi:10.1051/epjap:2004013.
 111. Y. Lee, S. H. Park, K. B. Kim, J. K. Lee, Fabrication of hierarchical structures on a polymer surface to mimic natural superhydrophobic surfaces. *Adv. Mater.* (2007), doi:10.1002/adma.200700820.
 112. T. Nuutinen, M. Silvennoinen, K. Päiväsaari, P. Vahimaa, Control of cultured human cells with femtosecond laser ablated patterns on steel and plastic surfaces. *Biomed. Microdevices* (2013), doi:10.1007/s10544-012-9726-8.
 113. W. Wang, B. Qi, H. Lv, F. Wu, L. Liu, W. Wang, Q. Wang, L. Hu, Y. Hao, Y. Wang, A new method of isolating spinal motor neurons from fetal mouse. *J. Neurosci. Methods* (2017), doi:10.1016/j.jneumeth.2017.06.014.
 114. R. Hernandez-Perez, J. L. García-Cordero, J. V. Escobar, Simple scaling laws for the evaporation of droplets pinned on pillars: Transfer-rate- and diffusion-limited regimes. *Phys. Rev. E* (2017), doi:10.1103/PhysRevE.96.062803.
 115. E. Berthier, J. Warrick, H. Yu, D. J. Beebe, Managing evaporation for more robust microscale assays. Part 2. Characterization of convection and diffusion for cell biology. *Lab Chip* (2008).
 116. G. S. Du, J. Z. Pan, S. P. Zhao, Y. Zhu, J. M. J. Den Toonder, Q. Fang, Cell-based drug combination screening with a microfluidic droplet array system. *Anal. Chem.* (2013), doi:10.1021/ac400688f.
 117. A. K. uma. Thokchom, R. Swaminathan, A. Singh, Fluid flow and particle

- dynamics inside an evaporating droplet containing live bacteria displaying chemotaxis. *Langmuir* (2014), doi:10.1021/la502491e.
118. Topology. *Pure Appl. Math.* (1985), doi:10.1016/S0079-8169(08)60833-8.
 119. F. Giorgiutti-Dauphiné, L. Pauchard, Drying drops: Drying drops containing solutes: From hydrodynamical to mechanical instabilities. *Eur. Phys. J. E* (2018), , doi:10.1140/epje/i2018-11639-2.
 120. H. A. Wege, J. A. Holgado-Terriza, M. J. Gálvez-Ruiz, M. A. Cabrerizo-Vílchez, Development of a new Langmuir-type pendant-drop film balance. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (1999), doi:10.1016/S0927-7765(98)00088-5.
 121. L. M. Pismen, B. Y. Rubinstein, I. Bazhlekov, Spreading of a wetting film under the action of van der Waals forces. *Phys. Fluids* (2002), doi:10.1063/1.870253.
 122. Q. Yuan, Y. P. Zhao, Precursor film in dynamic wetting, electrowetting, and electro-elasto-capillarity. *Phys. Rev. Lett.* (2010), doi:10.1103/PhysRevLett.104.246101.
 123. Y. Y. Lin, F. G. Tseng, D. J. Yao, in *2010 IEEE 5th International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, NEMS 2010* (2010).
 124. F. Schellenberger, N. Encinas, D. Vollmer, H. J. Butt, How Water Advances on Superhydrophobic Surfaces. *Phys. Rev. Lett.* (2016), doi:10.1103/PhysRevLett.116.096101.
 125. R. N. Wenzel, Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind. Eng. Chem.* (1936), doi:10.1021/ie50320a024.
 126. S. H. Hsu, K. Woan, W. Sigmund, Biologically inspired hairy structures for superhydrophobicity. *Mater. Sci. Eng. R Reports* (2011), , doi:10.1016/j.mser.2011.05.001.
 127. C. Priest, T. W. J. Albrecht, R. Sedev, J. Ralston, Asymmetric wetting hysteresis on hydrophobic microstructured surfaces. *Langmuir* (2009), doi:10.1021/la804246a.
 128. A. B. D. Cassie, S. Baxter, Wettability of porous surfaces. *Trans. Faraday Soc.* (1944), doi:10.1039/tf9444000546.
 129. L. Gao, T. J. McCarthy, How Wenzel and Cassie were wrong. *Langmuir* (2007), doi:10.1021/la062634a.
 130. S. F. Toosi, S. Moradi, S. Hatzikiriakos, Fabrication of Micro/Nano Patterns on Polymeric Substrates Using Laser Ablation Methods to Control Wettability Behaviour: A Critical Review. *Rev. Adhes. Adhes.* (2017), doi:10.7569/raa.2017.097302.
 131. K. Murakami, T. Sano, T. Yasunaga, Kinetic Studies of the Interaction of Bromophenol Blue with Bovine Serum Albumin by Pressure-jump Method. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (2006), doi:10.1246/bcsj.54.862.
 132. Y. J. Wei, K. A. Li, S. Y. Tong, The interaction of Bromophenol Blue with proteins in acidic solution. *Talanta* (1996), doi:10.1016/0039-9140(95)01683-X.
 133. W. G. Cao, Q. C. Jiao, Y. Fu, L. Chen, Q. Liu, Mechanism of the interaction between Bromophenol Blue and Bovine Serum Albumin. *Spectrosc. Lett.* (2003), doi:10.1081/SL-120024351.