



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIAPAS



FACULTAD DE CIENCIAS EN FÍSICA
Y MATEMÁTICAS

CAMPUS I

**FORMACIÓN DE PATRONES EN GOTAS
COLGANTES DE SANGRE.**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Físicas

PRESENTA:

Ricardo Herrera Sandoval X140060

Director de Tesis:

Dr. Jorge González Gutiérrez

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Mayo de 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS EN FÍSICA Y MATEMÁTICAS
DIRECCIÓN



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
26 de Mayo de 2023
Oficio No. FCFM/0238/23

Dr. Jorge González Gutiérrez
Director de Tesis
Presente

Por este medio me permito informarle que una vez efectuada la revisión de la tesis denominada:

“FORMACIÓN DE PATRONES EN GOTAS COLGANTES DE SANGRE”.

Ha sido aceptado para sustentar el Examen de Grado de Maestría en Ciencias Físicas del Lic. **Ricardo Herrera Sandoval** con matrícula escolar X140060.

Se autoriza su impresión en virtud de cumplir con los requisitos correspondientes.

Atentamente

“Por la conciencia de la necesidad de servir”

DIRECCIÓN
FCFM

Dra. Karen Salomé Caballero Mora
Directora

C.c.p. Dr. Florencio Corona Vázquez, Secretario Académico de la FCFM.
CP. Juan Manuel Aguiar Gámez.- Encargado de Posgrado FCFM
Archivo / Minutario
KSCM /jmag



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
SECRETARÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE DESARROLLO BIBLIOTECARIO



Código: FO-113-09-05

Revisión: 0

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LA TESIS DE TÍTULO Y/O GRADO.

El (la) suscrito (a) Ricardo Herrera Sandoval ,

Autor (a) de la tesis bajo el título de " FORMACIÓN DE PATRONES EN GOTAS COLGANTES DE SANGRE.

"

presentada y aprobada en el año 2023 como requisito para obtener el título o grado de Maestro en ciencias físicas ,

autorizo a la Dirección del Sistema de Bibliotecas Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), a que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para que contribuya a la divulgación del conocimiento científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Consulta del trabajo de título o de grado a través de la Biblioteca Digital de Tesis (BIDITE) del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH) que incluye tesis de pregrado de todos los programas educativos de la Universidad, así como de los posgrados no registrados ni reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.
- En el caso de tratarse de tesis de maestría y/o doctorado de programas educativos que sí se encuentren registrados y reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), podrán consultarse en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Chiapas (RIUNACH).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 29 días del mes de mayo del año 20 23 .

Ricardo Herrera Sandoval

Nombre y firma del Tesista o Tesistas

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

a todos mis amigos y compañeros de la generación.

a todos los profesores que me llenaron de conocimientos y que en algún punto me aconsejaron y orientaron.

al asesor, Dr. Jorge González, a los sinodales y los profesores miembros de la academia de la Maestría en Física que me enseñaron tanto y alimentaron las ganas de seguir en la ciencia.

a los miembros del Grupo Colegiado de Sistemas Dinámicos y Complejidad por su valioso apoyo.

a la Universidad Autónoma de Chiapas y a la Facultad de Ciencias en Física y Matemáticas por permitirme ser parte de su institución en donde conocí nuevas amistades.

al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM, por acogerme en una estancia de investigación.

al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo a través del programa de Becas Conacyt Nacionales.

Índice general

| | |
|---|-------------|
| Resumen | VI |
| Introducción | VIII |
| Planteamiento del Problema | XII |
| Hipótesis | XIII |
| Objetivos | XIV |
| 1 Antecedentes | 1 |
| 1.1 Propiedades de la sangre | 1 |
| 1.2 Albúmina de suero bovino | 2 |
| 1.3 Formación de patrones por la evaporación de gotas | 2 |
| 2 Materiales y Métodos | 5 |
| 2.1 Dispositivo Experimental | 5 |
| 2.2 Preparación de soluciones de sangre | 5 |
| 2.3 Preparación de soluciones de Proteínas | 6 |
| 2.4 Secado de gotas | 7 |
| 2.5 Adquisición de imágenes | 7 |
| 2.6 Análisis de imágenes | 8 |
| 2.6.1 Análisis de textura basado en Estadística de Primer Orden (FOS) | 8 |
| 2.6.2 Matriz de co-ocurencia de Nivel de Gris (GLCM) | 10 |
| 2.6.3 Perfil Radial de Intensidad y la Intensidad Integrada | 13 |
| 2.6.4 Lagunaridad | 14 |

| | |
|--|-----------|
| <i>ÍNDICE GENERAL</i> | v |
| 3 Gotas sésiles de sangre | 16 |
| 3.1 Reproducibilidad | 16 |
| 3.2 Depósitos con diferente concentración de hematocrito | 18 |
| 3.3 Formación de patrones en gotas sésiles de sangre | 21 |
| 4 Gotas colgantes de sangre | 29 |
| 4.1 Resultados | 29 |
| 5 Gotas colgantes de proteínas | 42 |
| 5.1 Resultados | 43 |
| 6 Conclusiones | 70 |
| 7 Productos científicos | 72 |

Resumen

Las diferentes estrategias para el secado de gotas de biofluidos y el análisis de los patrones en depósitos han permitido la detección de moléculas de relevancia, el control de calidad de medicamentos, la detección de consumibles líquidos adulterados, y el diagnóstico de patologías y desórdenes de la salud. En este trabajo, se reporta el estudio del efecto del volumen inicial de gota sobre la formación de patrones en gotas colgantes de sangre y proteínas con diferente concentración. Nuestro objetivo es generar estrategias para el secado de gotas que permitan producir patrones capaces de incrementar la efectividad de los protocolos de diagnóstico. Estimamos el perfil radial de intensidad de imágenes digitales de gotas sésiles de sangre para encontrar las mejores condiciones de reproducibilidad. Además, llevamos a cabo un análisis de textura basado en la Estadística de Primer Orden (FOS) y la Matriz de Co-ocurrencia de Nivel de Gris (GLCM) que permitió determinar que el valor medio de intensidad de píxeles y la Entropía son los parámetros más eficientes para diferenciar entre grupos de depósitos. Estos parámetros caracterizan correctamente el proceso de formación de patrones durante el secado de gotas de sangre. El ángulo de contacto, altura y diámetro de la gota muestran que el secado de gotas sésiles de sangre sigue el modo de Radio de Contacto Constante (CCR), en el que el área de contacto se mantiene constante a lo largo del proceso de secado. Interesantemente, los depósitos de sangre de pacientes Post COVID-19 presentan una significativa reducción en el número de grietas y en las partes móviles, y un menisco bien definido en la región central.

Encontramos que gotas colgantes de sangre generan dos grupos de depósitos: gotas secas con simetría radial (Grupo I) y gotas secas con deposición lateral (Grupo II). En ambos grupos, los depósitos muestran una mayor concentración de eritrocitos

en la región central que en la corona. En la región central, un conjunto de grietas negras emergen desde el centro de la gota hacia la corona, formando una estructura ramificada en forma de dendrita. La corona contiene largas grietas radiales coexistiendo con grietas negras ortonormales. La diferencia más evidente entre los grupos de depósitos es una deposición lateral de suero sanguíneo presente en los elementos del Grupo II. La microscopía óptica revela que este recubrimiento se debe a que la aglomeración de eritrocitos en el ápice de la gota produce su colapso. Encontramos que, sin importar el volumen inicial de gota, el ángulo de contacto crítico es 11° menor en comparación al ángulo de contacto inicial. Explorando la frecuencia de aparición de depósitos del Grupo II a diferentes volúmenes de gota y analizando del secado gotas diluidas con agua ultrapura, probamos que la masa contenida en una gota favorece a la aparición del modo de secado inestable.

Finalmente, reportamos el estudio de la formación de patrones en gotas colgantes de Albumina de suero Bovino (BSA, por sus siglas en inglés) con diferente volumen inicial ($V= 3-12 \mu\text{L}$). Esto debido a que la literatura muestra que un punto de partida para comprender los complejos mecanismos detrás de la formación de patrones en gotas de fluidos biológicos complejos, como la sangre, son las soluciones de proteínas modelo. Encontramos que emerge una gran diversidad de patrones en el interior de los depósitos: crucetas, crucetas con helechos, estructuras en forma de agujas y estaca de cristal en forma de prisma (unidas al anillo), agujas con helechos, agujas internas, agujas con agregado amorfo, cristales arborescentes ramificado, semi-estrellas de cristales, agregados amorfos, agujas ramificadas y estacas de cristales en forma de prisma. Sobre la base del perfil radial de intensidad, la compacidad y la intensidad media de pixeles probamos que en gotas colgantes existe un incremento en la concentración de masa en la región central de los depósitos. El ángulo de contacto, el radio y la altura permite probar que las gotas colgantes de proteína sigue el modo de Radio de Contacto Constante (CCR) sin importar el volumen inicial de gota.

Introducción

El estudio de la formación de patrones en gotas secas de biofluidos sobre sustratos es relevante para el desarrollo de pruebas forenses y plataformas de diagnóstico de patologías. En 1983, se fundó la Asociación Internacional de Analistas de Patrones de Manchas de Sangre (IABPA) y la interpretación de los patrones de las gotas de sangre se ha convertido en una herramienta eficaz en los laboratorios forenses modernos. Desde entonces, el análisis de patrones sanguíneos en la ciencia forense se ha desarrollado rápidamente, y algunas teorías incluso se han aplicado a la reconstrucción de la escena del crimen, la educación y la formación forenses [1]. Por otra parte, en 2001, Kulyabina et al. utiliza espectros de Wiener y Fourier para analizar los patrones cristalinos del plasma humano seco y sugirió que el análisis de dichos patrones podría ser una de las formas más prometedoras para el diagnóstico de enfermedades [2]. Rapis también estudió el patrón morfológico en gotas secas de plasma e indicó el uso potencial de estos patrones para el diagnóstico de enfermedades en 2002 [3]. Hoy en día se sabe que el análisis morfológico de patrones en gotas secas de sangre puede develar dislipidemia [4], talasemia [5], anemia e ictericia [6]. Esto ocurre porque cambios celulares y macromoleculares de los componentes de la sangre causan cambios en los patrones de depósitos de plasma y de sangre.

La morfología final de los agregados en gotas secas sobre sustratos depende de complejos procesos de agregación y mecanismos de transporte de masa. Los flujos capilares son un mecanismo de transporte de masa prácticamente universal en el secado de una gota sobre un sustrato. Durante este proceso, se produce una alta tasa de evaporación de moléculas en la línea de contacto debido a que, en esta región, la interacción entre moléculas solventes es más débil. Para compensar esta

pérdida de masa emergen los flujos capilares que transportan partículas del interior de la gota hacia el exterior. Si en una gota se encuentran partículas coloidales, estas también son arrastradas a la orilla formando una estructura en forma de anillo que se forma sobre la línea de contacto de una gota anclada. Esta estructura es el así llamado, anillo de café. Por otra parte, los flujos de Marangoni surgen debido a gradientes de viscosidad que son producidos por gradientes de temperatura y concentración de masa. Durante el secado de una gota, estos flujos recirculan las partículas coloidales hacia el interior de la gota, evitando la formación del anillo de café. Por lo tanto, hay tres condiciones esenciales para la formación de anillos: fijación de la línea de contacto líquido-sustrato, mayor tasa de evaporación en la línea de contacto, y supresión del flujo de Marangoni [7, 8]. Las características morfológicas de los patrones en gotas secas dependerán de las fuerzas electrostáticas, y de adhesión entre partículas-partículas y sustrato partículas.

La simetría azimutal típicamente observada en la distribución de partículas en gotas secas sésiles, se rompe en depósitos de gotas colocadas sobre sustratos inclinados [9]. Típicamente, una gota colgante forma un depósito más complejo que consiste de un delgado anillo de café que rodea una protuberancia formada por una alta concentración de coloides [10]. Estos patrones, conocidos como ojos de café, se forman debido a que las partículas coloidales se adsorben interfacialmente en el borde de la gota y luego se depositan en el fondo donde la curvatura de la gota es más alta [11]. Este mecanismo no requiere el flujo radial de partículas coloidales a lo largo de la línea de contacto, sino que utiliza la curvatura de gota variable para recolectar partículas [12]. No hay una regla general que pueda predecir las diferentes etapas de formación de patrones en gotas de soluciones de interés, Por ejemplo, en gotas colgantes de partículas coloidales de poliestireno (PS) de 300 a 6000nm, en la primera etapa de transporte de masa, la sedimentación compite con la captura de partículas de la interfase descendente. En una segunda etapa, domina el flujo capilar y lleva a las partículas del interior de la gota hacia la línea de contacto [13]. En gotas de proteínas globulares concentradas se observan tres etapas dinámicas claramente definidas por la pérdida de masa y la evolución de las formas internas y externas de

la gota [14].

El análisis de patrones en gotas secas de sangre han permitido el desarrollo de alternativas para el diagnóstico médico y técnicas forenses [15, 16, 17, 18, 19, 5, 20, 21]. Por la gran diversidad de componentes que contiene la sangre resulta extremadamente complejo predecir las interacciones entre componentes y las características estructurales de los patrones en gotas secas. Sin embargo, se ha reportado que las características de los patrones dependen de mecanismos de transporte de masa y agregación gobernados por parámetros de control tales como el ángulo de contacto [22], humectabilidad del sustrato [23, 24], la concentración de células [25, 26], y la humedad relativa (HR) [27, 28]. Aunque una gran diversidad de patrones pueden emerger dentro de estos depósitos, en general, estos contienen una región central compuesta por una alta diversidad de grietas y placas, una corona que se caracteriza por contener una alta concentración de eritrocitos, y una región periférica de suero sanguíneo donde no se observa la presencia de células rojas [20, 29].

El estudio de soluciones de proteínas modelo es un buen punto de partida para comprender los mecanismos de transporte y agregación que determinan la morfología de patrones en gotas de biofluidos complejos. Dependiendo el parámetro de control, el secado de una gota de solución de proteínas puede generar un depósito uniforme, un anillo de café y patrones de grietas ortonormales y radiales. Interesantemente, dos proteínas diferentes en una gota de solución acuosa producen estructuras fractales en el centro de un depósito uniforme [30, 31]. Gotas de proteínas y cristales líquidos incrementan la complejidad de los patrones de grietas. Las sales disueltas en una gota de proteínas produce la formación de una alta diversidad de patrones complejos tales como anillos periféricos amorfos, formas dendríticas, rosetas, festones, flechas chinas y patrones en zigzag [32].

Aunque en la literatura se ha reportado que los patrones en gotas secas de sangre pueden servir como marcadores para el diagnóstico de patologías; se desconoce el efecto del secado de gotas de biofluidos en superficies inclinadas sobre la formación de agregados. Extraer nuevas características morfológicas en depósitos de biofluidos podría aumentar la eficiencia en el diagnóstico y la detección de problemas en la

salud de pacientes. En este trabajo, se reporta el estudio experimental del efecto del volumen inicial de gota sobre la formación de patrones producido por el secado de gotas colgantes de sangre y proteínas. Nuestro objetivo es encontrar una estrategia para producir depósitos secos capaces de incrementar la efectividad de la detección de moléculas de relevancia y el diagnóstico de enfermedades.

Este documento está organizado de la siguiente manera: en el Capítulo 1 se describen la composición química de la sangre, dislipidemia, COVID-19, la formación de patrones por la evaporación de gotas, y la estadística de segundo orden. En el Capítulo 2 se presenta el método experimental desarrollado para el estudio de la formación de patrones producidos por la evaporación de gotas. En el Capítulo 3 se muestran los resultados y conclusiones del estudio experimental de la formación de patrones en gotas sésiles de sangre. En el Capítulo 4 se presentan los resultados y conclusiones sobre el estudio en la formación de patrones por el secado de gotas colgantes de sangre. En el Capítulo 5 se muestran los resultados y conclusiones sobre la investigación concerniente al estudio de la formación de patrones en gotas colgantes de proteínas. En el capítulo 6 se presentan los productos científicos y las galerías de imágenes generadas durante la realización del proyecto de tesis.

Planteamiento del Problema

Aunque el estudio estructural en patrones de gotas secas de bio-fluidos ha permitido detectar moléculas de relevancia y el diagnóstico de enfermedades, la efectividad de estos estudios se reduce enormemente en depósitos formados con baja concentración de analitos. Por lo tanto, generar nuevas características morfológicas en gotas secas capaces de actuar como marcadores podría aumentar la eficiencia en la detección de analitos de relevancia.

Hipótesis

La inclinación del sustrato y el volumen inicial de gota inducen la formación de una alta diversidad de patrones.

Objetivos

Objetivo General.

Estudiar la formación de patrones generados por el secado de gotas colgantes de sangre y proteínas.

Objetivos Específicos.

1. Encontrar las condiciones experimentales óptimas para alcanzar una alta reproducibilidad en la formación de patrones en gotas sésiles de sangre.
2. Utilizar FOS y GLCM para realizar un análisis de textura a los patrones en gotas sésiles de sangre diluida.
3. Estudiar la formación de patrones en gotas sésiles de sangre.
4. Estudiar el efecto del volumen inicial de gota sobre la formación de patrones en gotas de sangre diluida sobre superficies inclinadas.
5. Estudiar el efecto del volumen inicial de gota sobre la formación de patrones en gotas de proteínas sobre superficies inclinadas.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Propiedades de la sangre

En el cuerpo humano, la sangre equivale al 7% del peso total de este. La sangre es un fluido conformado principalmente por agua, por lo cual tiene un peso de $1Kg/L$ [1]. A través de un análisis hematológico se ha demostrado que alrededor del 43% del volumen de la sangre pura está conformada por células rojas de la sangre. Los coloides que componen la sangre pura representan el 23% del peso total de este biofluido. El volumen de estos coloides se distribuyen de la siguiente manera: Los eritrocitos representan el 97% del volumen, con un tamaño típico de $8\mu m$; los leucocitos representan el 2% del volumen, con un tamaño de alrededor de $15\mu m$ y las plaquetas, con un tamaño de $3\mu m$ representa 1% del volumen de los coloides [21]. Alrededor del 55% del volumen total de la sangre está compuesto de plasma sanguíneo y el 7% del peso de este está compuesto de proteína disuelta. Otros coloides se encuentran suspendidos en la sangre, y son éstos los que permanecen en el sustrato al final del proceso de secado [1].

La sangre es un tipo de evidencia física más importante en una investigación forense de una muestra o algún crimen violento. El análisis de patrones de manchas de sangre, a través del uso de metodologías y principios científicos, puede revelar información importante en el estudio de una escena del crimen. El estado final de una gota

completa de sangre revela patrones regulares con una buena reproducibilidad para una persona sana. Se han realizado otros experimentos sobre personas con anemia (afección que disminuye el número de glóbulos rojos en la sangre) o hiperlipidemia (alteración del metabolismo la cual produce una o varias fracciones lipídicas en la sangre) revelando diferentes patrones.

1.2. Albúmina de suero bovino

El estudio de la formación de gotas secas de proteínas son un buen punto de partida para comprender la formación de patrones en depósitos de biofluidos complejos. La Albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) se encuentra en aproximadamente el 60% de todas las proteínas en suero animal. Es utilizada en experimentos de cultivo celular, generalmente cuando es necesario suplementar con proteínas y se requiere de evitar a otro componente no deseado del suero. En este tipo de técnicas su uso principal es como portador de pequeñas moléculas. Puesto que esta molécula tiene carga negativa, la Albúmina de suero bovino se une fácilmente al agua, a las sales, a los ácidos grasos, a las vitaminas y a las hormonas, y estos componentes son transportados, unidos a la proteína, entre las células y los tejidos [33].

1.3. Formación de patrones por la evaporación de gotas

El análisis de patrones de gotas secas ha sido utilizado en diversas áreas de la ciencia y el arte. Por ejemplo, el estudio de gotas secas de medicamentos permite generar patrones útiles para detectar la adulteración de fármacos [15]. En ciencias forenses, el análisis de manchas de sangre permite mejorar la comprensión de escenas del crimen [1]. En el arte existe la necesidad de optimizar la calidad de los pigmentos, por lo cual el análisis de gotas secas ha sido utilizado para estudiar las característi-

cas estructurales de depósitos con acuarelas en distintas concentraciones de agua y pigmento. Además, esta técnica se ha utilizado como plataforma de diagnóstico de patologías, a través del estudio de gotas secas de biofluidos [5], [6], [4].

La gota sésil es una gota que presenta simetría axial y está sobre un sustrato sólido horizontal, mientras que una gota colgante a una gota simétrica suspendida hacia abajo. La línea de contacto de triple fase (TPLC) de una gota son las líneas donde coinciden el sólido (sustrato), el líquido (fluido de la gota) y el gas (aire ambiente y vapor) [11]. El ángulo de contacto de una gota θ es uno de los parámetros más simples para cuantificar la mojabilidad (la capacidad que tiene un líquido de extenderse y dejar una traza sobre un sólido) entre la gota y el sustrato. Este parámetro se define geoméricamente como el ángulo formado por un líquido en la línea de contacto trifásico (TPLC) donde se encuentran el líquido, el vapor y el sólido [13].

Los patrones finales, en un depósito seco de biofluido, dependen de los flujos de transporte de masa, los cuales surgen a partir del proceso de evaporización de la gota. Este proceso está determinado por parámetros de control tales como la temperatura, la humedad relativa del ambiente, la tensión superficial, la gravedad, el tamaño de las partículas que conforman el fluido, entre otros. El proceso de evaporización de la gota se produce debido a que la presión de vapor (humedad relativa del ambiente) no puede contener las moléculas de agua de la gota [13]. La tasa de evaporación, i.e. pérdida de moléculas de agua, es mayor en el punto triple. Para compensar esta pérdida de masa se genera un flujo que lleva partículas coloidales desde el centro de la gota hacia la línea de contacto, llamados flujos capilares o flujos de Deegan [34]. Dependiendo de los gradientes de tensión superficial de la gota, el efecto de la gravedad y el tamaño de las partículas, se genera otro flujo que inicia en la línea de contacto hacia el centro de la gota, de modo que hay una recirculación de los coloides en el interior de la gota, este tipo de flujos son denominados flujos de Marangoni [8]. Los flujos más predominantes, en los experimentos que se presentan en este trabajo, fueron los flujos capilares. Las gotas cuyos flujos predominantes son los capilares, presentarán una alta concentración de coloides en la orilla del depósito, denominada como anillo de café. Mientras que los depósitos formados bajo la influencia de flu-

jos de Marangoni presentan homogeneidad en las características conformacionales finales.

Durante el proceso de evaporización de la gota, se generan gradientes de tensión superficial, debido a que la gravedad tiene un papel importante en el secado del depósito. Por tanto, las características estructurales de los patrones de las gotas secas dependerán del ángulo de inclinación del sustrato, el cual se relaciona directamente con la ecuación de Young. Para una gota sésil esta ecuación describe el valor de equilibrio, el radio w y la altura z iniciales de una gota. Estas están descritos a través de un equilibrio de fuerzas dado por: $\sigma_{sv} = \sigma_{sl} + \sigma_{lv}\cos(\theta)$, donde σ_{sl} , σ_{lv} y σ_{sv} son las tensiones superficiales sólido-líquido, líquido-vapor y sólido-vapor, respectivamente; y θ , es el ángulo de contacto.

En la naturaleza se encuentran dos principales modos de secado. el primero es denominado Ángulo de Contacto Constante (CCA) y consiste en que el radio (r) de contacto de la gota con el sustrato disminuye con el tiempo, pero el ángulo de contacto permanece invariable. En palabras simples: el ángulo de contacto se mantiene constante y la gota sigue siendo esférica, mientras que la (r) y la altura (h) disminuyen. En general, este modo se observa en gotas con un ángulo de contacto inicial superior a 90° . El segundo modo es el denominado, Área de Contacto Constante, ó Radio de contacto constante (CCR). En este, el área de contacto sólido-líquido se mantiene constante, mientras que el ángulo de contacto disminuye gradualmente. En general, este modo emerge en gotas con un ángulo de contacto inicial inferior a 90° [11].

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Dispositivo Experimental

En la Fig. 2.1 se muestra el arreglo experimental utilizado para estudiar el secado de gotas colgantes. Este consiste en dos microscopios digitales, uno lateral y otro frontal (a), mini elevadores atados a cada microscopio (b), una lámpara de leds para iluminar detrás de la muestra (c), superficie de acrílico con capacidad de giro a 180° (d), contenedores de gel de sílice para controlar la actividad del agua, i.e., la presión de vapor (e), un sensor de temperatura y de humedad relativa (f) y un dispositivo para la captura de datos (g). Todos estos componentes están dentro de una bolsa transparente que sirve para aislar al sistema manteniendo visibilidad del exterior (h). La información capturada por ambos microscopios fue registrada en una computadora cada 10s con imágenes con una resolución de 640x480 píxeles.

2.2. Preparación de soluciones de sangre

Se utilizó sangre humana y agua ultrapura para preparar soluciones. La sangre se tomó de pacientes con un ayuno de alrededor de 8 horas (los parámetros clínicos de los donadores se ilustran en la Tabla 2.1). Posterior a la toma de la muestra, esta se almacenó en tubos Edta y se mantuvo en refrigeración a una temperatura aproximada

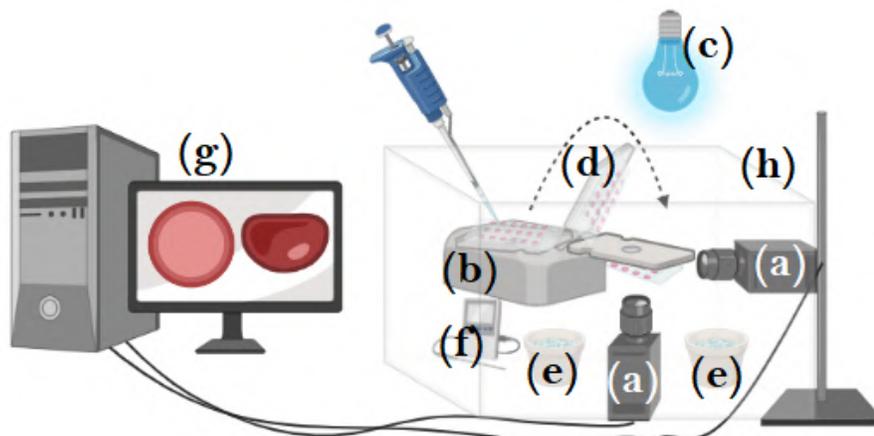


Figura 2.1: **Arreglo experimental.** (a) Microscopios, (b) mini elevadores, (c) lámpara de leds, (d) superficie de acrílico giratoria, (e), contenedores de gel de sílice, (f) sensor de temperatura y de humedad relativa (g) computadora, (h) bolsa transparente.

de $6^{\circ}C$. Las soluciones estuvieron compuestas de sangre y agua ultrapura con una concentración de 40 %, 36 %, 28 %, 20 %, 12 % y 4 % de hematocrito (HCT); lo que equivale a una concentración de 100 % : 0 %, 90 % : 10 %, 70 % : 30 %, 50 % : 50 %, 30 % : 70 % y 10 % : 90 % de sangre y agua ultrapura. Por ejemplo: Para una solución de $1mL$ al 4 % de hematocrito, es decir, 10 % sangre y 90 % agua ultrapura, se requiere un volumen de $900\mu L$ de agua y $100\mu L$ de sangre. Una vez realizada la solución se realizó el depósito de las gotas en el arreglo experimental, bajo las condiciones que se especifiquen en los respectivos experimentos.

2.3. Preparación de soluciones de Proteínas

Se prepararon dos soluciones de stock: una de Albumina de Suero Bovino (BSA, por sus siglas en inglés) y una de Cloruro de Sodio (NaCl), ambas a una concentración de $2wt\%$. Éstas se mantuvieron en refrigeración, en tubos de centrífuga, a una temperatura aproximada de $6^{\circ}C$. En un vial se realizó la mezcla, de modo que la concentración de la BSA y el NaCl fueron de $1wt\%$. Para obtener la mezcla requerida, se consideró la siguiente ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2. \quad (2.1)$$

Donde C_1 y V_1 es la concentración y el volumen de la muestra que se extraerá de la solución de stock, respectivamente. C_2 y V_2 es la concentración y el volumen de la mezcla final, respectivamente. Por ejemplo, para una mezcla de, $1mL$, con una concentración de $1wt\%$, de BSA o NaCl, el volumen extraído de la solución de stock se calculó a través de la solución de la ecuación para V_1 :

$$V_1 = \frac{C_2}{C_1} V_2 = \frac{1}{2} 1mL = 0.5mL$$

De modo que para obtener el volumen de la mezcla, a esa concentración, se requirió extraer un volumen de $0.5mL$ de la solución de stock. Una vez obtenida la mezcla se realizó el depósito de las gotas en el arreglo experimental.

2.4. Secado de gotas

Utilizando una micropipeta, 21 gotas de las soluciones se colocaron sobre un portaobjetos de Polimetilmetacrilato (PMMA) con una inclinación de 0° . Una vez realizada la deposición, el dispositivo puede rotar al sustrato hasta llegar a una inclinación de 180° . Las gotas se evaporaron en condiciones controladas: la temperatura del sistema se fijó en un rango de $T = 25^\circ-35^\circ C$; y humedad relativa (HR) de $30\%-40\%$.

2.5. Adquisición de imágenes

La dinámica del secado de gotas se videograbó con dos microscopios digitales conectados a una PC. Un microscopio digital colocado frontalmente capturó el proceso de formación de patrones en gotas secas. Un segundo microscopio se colocó lateralmente y midió el ángulo de contacto, el diámetro de la gota y su altura durante el secado. La información captada a través de estas cámaras fue recopilada en la PC mediante el programa *Imagej*.

La adquisición de imágenes se realizó con una cámara Nikon (D3200) acoplada a un microscopio (VELAB- VE-M4). La resolución de las imágenes se colocó en 300

ppp, creando imágenes de aproximadamente 4000 píxeles de longitud para el lado más largo. Las imágenes digitales completas de los patrones de gotas secas fueron reconstruidas utilizando el software *Autostitch*. El secado de gotas fue analizado con base en el ángulo de contacto, y altura, y radio de la gota a través del programa *Imagej*.

2.6. Análisis de imágenes

Se estudiaron cualitativamente las estructuras de los patrones a través de proyecciones tridimensionales y tratamiento de imágenes.

2.6.1. Análisis de textura basado en Estadística de Primer Orden (FOS)

Los parámetros de textura de la estadística de primer orden (FOS) permiten explorar la formación de patrones en gotas secas de biofluidos. Estos parámetros de textura se calculan a través de una herramienta matemática denominada como histograma de valores de intensidad de grises, la cual indica cuántos píxeles tiene una imagen por cada tono de gris; el histograma está definido por la siguiente ecuación [15]:

$$H(g) = \frac{n_g}{N}; \quad g = 0, 1, \dots, N_g - 1, \quad (2.2)$$

donde N es el número de píxeles en una imagen, n_g es la frecuencia para un nivel de gris g , es decir es el número de píxeles con valor de gris de g . Los valores de nivel de gris van desde 0 hasta el valor $N_g - 1$, donde 0 representa al valor mínimo de tono de gris y $N_g - 1$ el nivel de gris más alto en una imagen.

La estadística de primer orden utiliza los siguientes parámetros de textura:

Promedio

Normalmente la intensidad de una imagen se representa con un valor medio de pixeles; esta cantidad se define a través de la siguiente expresión matemática:

$$\mu = \sum_{i=0}^{N_g-1} gH(g) = \sum_{i=0}^{N_g-1} g_i \frac{n_i}{N} = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N_g-1} i n_i. \quad (2.3)$$

Desviación Estándar

A la variación de la intensidad alrededor del valor promedio de los pixeles se denomina como Desviación Estándar y está dada por la siguiente ecuación:

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=0}^{N_g-1} (g - \mu)^2 H(g)} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N_g-1} (i - \mu)^2 n_i}. \quad (2.4)$$

Frecuentemente, valores altos de rugosidad en una imagen están asociados con altos valores de desviación estándar.

Densidad Integrada

La Densidad Integrada de una imagen captura la intensidad total de los pixeles y matemáticamente está definida por la siguiente ecuación:

$$I = \mu \cdot N. \quad (2.5)$$

Asimetría

Este parámetro cuantifica la asimetría de una distribución relativa al valor promedio de la intensidad de los pixeles en una imagen. Matemáticamente se define de la siguiente manera:

$$\mu_3 = \frac{\sum_{i=0}^{N_g-1} (g - \mu)^3 H(g)}{(\sigma)^3} = \frac{\sum_{i=0}^{N_g-1} (i - \mu)^3 \frac{n_i}{N}}{(\sigma)^3} = \frac{\sum_{i=0}^{N_g-1} (i - \mu)^3 n_i}{N(\sigma)^3}. \quad (2.6)$$

curtosis

Este parámetro se utiliza para calcular la planitud del histograma de valores de intensidad de gris. Y se calcula a través de la siguiente expresión:

$$\mu_4 = \frac{\sum_{i=0}^{N_g-1} (g - \mu)^4 H(g)}{(\sigma)^4} - 3 = \frac{\sum_{i=0}^{N_g-1} (i - \mu)^4 \frac{n_i}{N}}{(\sigma)^4} - 3 = \frac{\sum_{i=0}^{N_g-1} (i - \mu)^4 n_i}{N(\sigma)^4} - 3. \quad (2.7)$$

2.6.2. Matriz de co-ocurrencia de Nivel de Gris (GLCM)

Una como matriz de co-ocurrencia de niveles de gris (GLCM) es una matriz que asocia los niveles de gris de una imagen con los elementos de la matriz. El número de filas y columnas de la matriz es igual al número de niveles de gris N_g . Los parámetros de este análisis se basan en la correlación entre píxeles en una imagen [15]. Matemáticamente, esta información se ingresa en los elementos $p(i, j)$ de la matriz, y cada uno de los elementos representan los valores de probabilidad para cambios entre el nivel de gris i y j de un desplazamiento particular d y un ángulo (ϕ) en una imagen. Esta probabilidad se define mediante la siguiente ecuación:

$$p(i, j) = \frac{C(i, j)}{\sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} C(i, j)}, \quad (2.8)$$

donde $C(i, j)$ es el número de ocurrencias de niveles de gris i y j dentro de la ventana, a un par particular de desplazamiento (d) y un ángulo (ϕ). El denominador es el número total de pares de niveles de gris (i, j) dentro de la ventana y se encuentra debajo de un límite superior de $N_g \times N_g$. Las siguientes expresiones son utilizadas para calcular el promedio y la desviación estándar para las columnas y filas de la matriz, usando la ecuación de arriba,

$$u_x = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} i \cdot p(i, j), \quad u_y = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} j \cdot p(i, j), \quad (2.9)$$

$$\sigma_x = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} (i - u_x)^2 \cdot p(i, j), \quad \sigma_y = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} (j - u_y)^2 \cdot p(i, j), \quad (2.10)$$

Donde u_x y u_y representan los promedios para las columnas y filas, respectivamente; σ_x y σ_y representan la variación estándar para las columnas y filas respectivamente. Los parámetros de textura de este análisis pueden ser calculados con las ecuaciones anteriores y se definen como sigue a continuación:

Segundo Momento Angular

Este parámetro es también conocido como la Energía y mide la homogeneidad global en una imagen. Captura el grado de uniformidad y la tosquedad de la textura. Matemáticamente, este parámetro se define con la siguiente expresión:

$$E = ASM = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} p(i, j)^2. \quad (2.11)$$

En una imagen, valores altos de Energía indican homogeneidad, mientras que valores bajos de este parámetro indica heterogeneidad en la textura de la imagen.

Momento de Inercia

Este parámetro, mejor conocido como Inercia, captura la rugosidad y la complejidad de la textura en una imagen. Esta cantidad puede calcularse a través de la siguiente ecuación:

$$I = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} (i - j)^2 p(i, j). \quad (2.12)$$

Cuantos más píxeles haya en alto contraste, más significativo será el momento de inercia en una imagen.

Correlación

Este parámetro captura el grado de similitud entre los elementos de la matriz en una dirección de fila o columna. Se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$COR = U = \frac{\sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} (ij) \cdot p(i, j) - u_x u_y}{\sigma_x \sigma_y}. \quad (2.13)$$

Los valores más altos de este parámetro están relacionados con regiones de nivel de gris similares. Mientras que valores más bajos de correlación indican regiones de nivel de gris diferentes.

Homogeneidad

Los valores del parámetro IDM indican la homogeneidad local de una imagen. La siguiente ecuación define de manera matemática este parámetro de textura:

$$IDM = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} \frac{1}{1 + (i - j)^2} p(i, j). \quad (2.14)$$

Valores de IDM más altos se asocian a imágenes con alta homogeneidad local, mientras que valores de IDM más bajos son característicos de imágenes que no son homogéneas.

Entropía

Este parámetro se utiliza para estudiar la aleatoriedad de la textura de una imagen. Matemáticamente se expresa de la siguiente manera:

$$H = - \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} p(i, j) \log(p(i, j)). \quad (2.15)$$

Valores altos de este parámetro indican regiones grandes heterogéneas, mientras que los valores más bajos indican regiones pequeñas heterogéneas en una imagen.

El análisis cuantitativo en los patrones se realizó de la siguiente manera: Las imágenes seleccionadas se descompondrán en escala de grises. Aplicaremos el procesamiento de datos estándar en 2 píxeles e inclinación de 0 grados para cubrir toda la imagen. Usaremos *ImageJ* para obtener los parámetros de textura GLCM.

2.6.3. Perfil Radial de Intensidad y la Intensidad Integrada

LLevamos a cabo el análisis estructural usando un perfil radial de intensidad $I(r)$. Esto se debe a la capacidad de esta cantidad para describir sistemas con simetría polar como depósitos de partículas de virus, macromoléculas, coloides, granos y gotas secas. $I(r)$ da un perfil de intensidades integradas producidas por círculos concéntricos en función de la distancia radial. En otras palabras, cada valor de $I(r)$ representa la suma de la intensidad de píxeles al rededor del círculo de radio r . Para objetos 2D esta cantidad está dada por la siguiente expresión:

$$I(r) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} i(r, \theta) d\theta, \quad (2.16)$$

donde $i(r, \theta)$ es la intensidad local de la luz contenida en un círculo de radio r . El procedimiento práctico para determinar $I(r)$ es el siguiente: dibujamos numéricamente un número de círculos concéntricos igualmente separados. El número de píxeles contenidos en un elemento de área abarcado por las partículas es proporcional a la masa contenida en ese elemento. Evaluamos este número de píxeles para cajas de diferentes tamaños. Este procedimiento se sigue en varios sitios diferentes de la imagen digital. Luego, tomamos el promedio de la cantidad de píxeles para el valor correspondiente de r . Este promedio nos permite evitar los efectos de pequeñas inhomogeneidades locales y posibilita capturar las correlaciones estadísticas de la estructura [35].

La integral del perfil de intensidad radial es comúnmente conocida como la “intensidad total” o la “intensidad integrada”. Esta integral se calcula sumando los valores de intensidad de todos los píxeles dentro de un radio determinado alrededor del centro de una imagen. El resultado es una medida de la cantidad total de intensidad de la imagen que se concentra en la región circular centrada en el objeto de interés. La intensidad total es una medida útil para caracterizar la distribución de la intensidad de una imagen y puede ser utilizada en diversas aplicaciones en campos como la ingeniería [36]. En este documento llamamos a la “intensidad integrada” como “compacidad”.

2.6.4. Lagunaridad

La “lagunaridad” λ es una cantidad que mide, a diferentes escalas, la heterogeneidad y rugosidad de una superficie. Matemáticamente se define como:

$$\lambda = 1 + \left(\frac{\sigma}{\mu} \right)^2, \quad (2.17)$$

donde σ y μ representan, respectivamente, la desviación estándar y la media de la intensidad de los píxeles en una región específica de una imagen digital. La “lagunaridad” es estimada a través del método de conteo de cajas deslizantes. Esta técnica, aplicada a imágenes digitales, se utiliza en el campo de la visión artificial para contar el número de píxeles dentro de una caja de lado L . El método consiste en deslizar la caja para capturar información de toda la imagen digital.

Nosotros analizamos imágenes de 250x250 píxeles utilizando cajas de lado $L= 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 40, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220,$ y 240 píxeles. Para cubrir la imagen completamente utilizamos el correspondiente número total de cajas: 2069, 2069, 1980, 1980, 1892, 1806, 1806, 1482, 930, 702, 506, 342, 210, 110, 42, 6, y 1.

| BIOQUÍMICA | Paciente Sano | Paciente sano (Post COVID-19) |
|-------------------------------------|---------------|-------------------------------|
| GLUCOSA(mg/dL) | 93 | 93.7 |
| UREA(mg/dL) | 30 | 20.2 |
| NITRÓGENO URÉICO(BUN)(mg/dL) | 14.08 | 9.4 |
| CREATINA EN SUERO(mg/dL) | 0.59 | 0.91 |
| COLESTEROL TOTAL(mg/dL) | 129 | 99.1 |
| TRIGLICÉRIDOS(mg/dL) | 66 | 91.8 |
| COLESTEROL HDL(mg/dL) | 47.5 | 44.4 |
| COLESTEROL LDL(mg/dL) | 66.83 | 48.9 |
| BIOMETRÍA HEMÁTICA | | |
| LEUCOCITOS(mL) | 4500 | 4920 |
| ERITROCITOS(mL) | 4300 | 5420 |
| HEMOGLOBINA(g/dL) | 12.9 | 15.50 |
| HEMATOCRITO(%) | 40 | 43 |
| VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIA(fl) | 93 | 80.80 |
| HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA(pg) | 30 | 28.6 |
| CONC. MEDIA DE HB CORPUSCULAR(g/dL) | 32.3 | 35.4 |
| PLAQUETAS(mL) | 310000 | 195000 |
| VOLUMEN PLAQUETARIO MEDIO(fl) | 7.1 | 11.20 |
| LINFOCITOS(%) | 46 | 40 |
| NEUTRÓFILOS(%) | 42 | 46.6 |
| MONOCITOS(%) | 12 | 9.6 |
| EOSINÓFILOS(%) | 0 | 3 |
| BASÓFILOS(%) | 0 | 0.6 |
| LINFOCITOS(mL) | 2070 | 1970 |
| MONOCITOS(mL) | 540 | 470 |
| EOSINÓFILOS(mL) | 0 | 150- |
| BASÓFILOS(mL) | 0 | 30 |
| NEUTRÓFILOS(mL) | 1890 | 2290 |

Tabla 2.1: **Análisis clínicos de los donadores de sangre.** Los valores de los parámetros de la Bioquímica y Biimetría Hemática corresponden a dos donadores; el *Paciente Sano* fue una mujer de 32 años de edad, mientras que el *Paciente sano (COVID-19)* fue un hombre de 23 años de edad, que presentó un cuadro de infección por COVID-19 tres meses antes de que se tomara la muestra de sangre.

Capítulo 3

Gotas sésiles de sangre

En este capítulo, presentamos el estudio del efecto de la concentración de hematocrito, dispersión de luz y volumen inicial de gota para alcanzar una alta reproducibilidad en la formación de patrones por el secado de gotas sésiles. Para encontrar las mejores condiciones de reproducibilidad, estimamos el perfil radial de intensidad de imágenes de gotas sésiles de sangre. Realizamos un análisis de textura basado en la Estadística de Primer Orden (FOS) y la Matriz de Co-ocurrencia de Nivel de Gris (GLCM) para determinar los parámetros más eficientes para diferenciar entre grupos de depósitos. Además, encontramos que, sin importar la concentración de hematocrito, el área de contacto de gotas de sangre se mantiene constante a lo largo del proceso de secado, por lo que ellas siguen el modo de Radio de Contacto Constante (CCR). Finalmente, encontramos que un menisco bien definido en la región central en los depósitos de sangre surge en pacientes Post COVID-19.

3.1. Reproducibilidad

Para alcanzar una alta reproducibilidad en los patrones de los depósitos, se realizó el secado de gotas de $3\mu L$, a una temperatura entre $20 - 25^{\circ}C$ y a una humedad relativa entre $25 - 35\%$. En la Fig. 3.1 se observa un patrón de gota seca formado con una concentración de $40\%HCT$ (0% agua- 100% sangre). Los patrones en gotas secas están compuestos por una región central con pequeñas grietas aleatorias que rodean

placas móviles. Esta región está rodeada por una corona gruesa formada por una alta concentración de eritrocitos. En ella emergen grandes grietas que se prolongan hasta la región central. Una región periférica de suero sanguíneo rodea la corona. En esta región no se observa la presencia de eritrocitos.

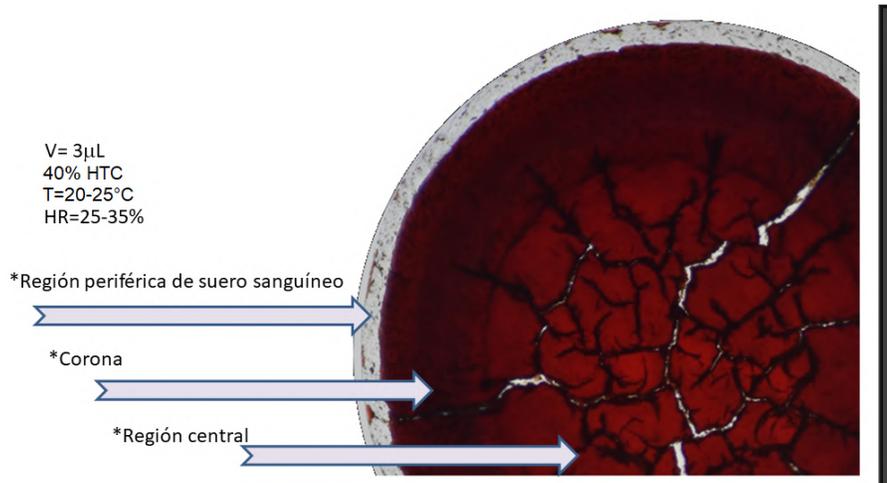


Figura 3.1: **Patrón de gota seca de sangre.** Diferentes regiones de un patrón generado por el secado de una gota sécil de sangre ($V = 3 \mu L$, 40% HCT, $T = 20 - 25^\circ C$, $HR = 25 - 35 \%$). La barra en color negro tiene una longitud de $2 mm$.

En la Fig.3.2 se observa que gotas de sangre con igual volumen inicial de gota ($3 \mu L$), concentración de hematocrito (40% HCT), y secadas bajo las mismas condiciones de temperatura $T = 20 - 25^\circ C$ y humedad relativa, $HR = 25 - 35 \%$ generan patrones son muy similares. Todo ellos presentan similares estructuras contenidas en la región central, la corona y la región periférica de suero.

De manera cuantitativa se realizó el perfil radial de intensidad de pixeles de los depósitos para estudiar la reproducibilidad, ver Fig. 3.3. Este análisis muestra que existe una alta correlación en la distribución de masa de todos los depósitos de sangre generados bajo las mismas condiciones físicas. La correlación entre perfiles de distribución de masa es mayor a 0.97 para todos los casos. Lo que implica que con la metodología, el diseño experimental y bajo las condiciones físicas antes mencionadas se alcanza una alta reproducibilidad en los patrones de gotas secas de sangre con un ángulo de inclinación de 0° .

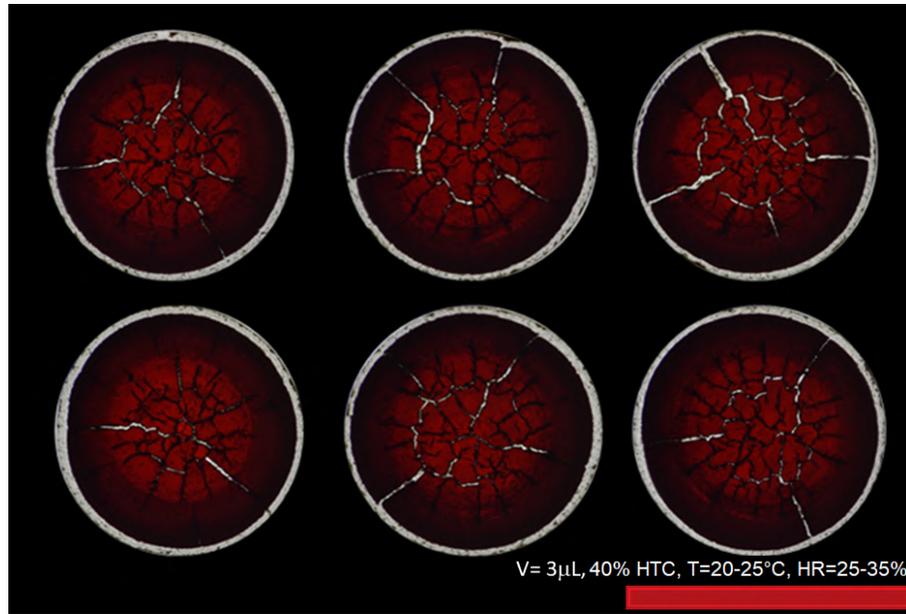


Figura 3.2: **Patrones de gotas secas de sangre.** Seis depósitos de sangre generados bajo las mismas condiciones físicas ($V= 3\mu L$, 40% HCT, $T= 20 - 25^{\circ}C$, $HR= 25 - 35\%$). La barra en color rojo tiene una longitud de $2.98mm$.

3.2. Depósitos con diferente concentración de hematocrito

En la Fig.3.4 se muestran los patrones obtenidos en gotas secas a diferente concentración de hematocrito (40 %, 36 %, 28 %, 20 %, 12 % y 4 % HCT), con un volumen inicial de $3\mu L$. Cualitativamente permite estudiar el efecto de la concentración de hematocrito sobre la formación de los patrones de los depósitos. Las estructuras (región central, corona y región periférica de suero sanguíneo) están presentes en los depósitos a distinta concentración de hematocrito. Cualitativamente, observamos que el grosor de la corona incrementa con la concentración de hematocrito, ver la Fig. 3.5. En contraste, el número de grietas, el área de la región central y el número de placas decrecen. Interesantemente, la región periférica de suero sanguíneo desaparece a bajas concentraciones de hematocrito.

Con un análisis realizado a través de la Estadística de Primer Orden (FOS) se caracterizaron los patrones de gotas secas. En la Fig.3.6 se muestran los parámetros de esta estadística (Promedio, Desviación Estándar, Densidad Integrada, Asimetría y

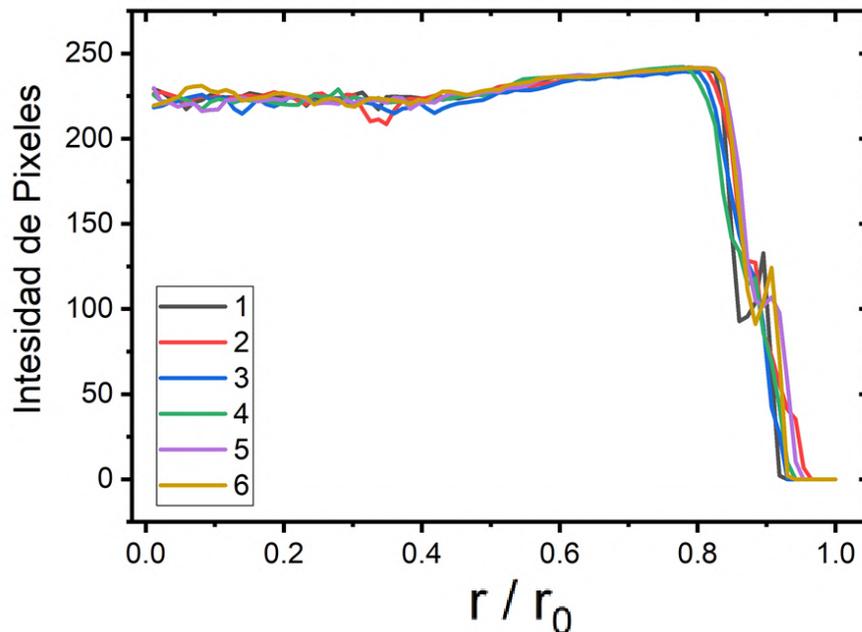


Figura 3.3: **Perfil Radial de Intensidad.** El Perfil Radial de Intensidad para seis depósitos de sangre generados bajo las mismas condiciones físicas ($V= 3\mu L$, 40 %HCT, $T=20 - 25^{\circ}C$, HR= 25 - 35 %).

Curtosis) como función de la concentración de hematocrito. Se observa que las barras de error de todos los parámetros de textura son relativamente pequeñas. En general, los depósitos generados con 50 % de agua bidestilada y 50 % sangre (20 %HCT) presentan la mayor magnitud en las barras de error para la mayoría de parámetros de textura. El primer parámetro, Promedio, genera los mejores resultados para diferenciar entre patrones. En general, para este parámetro las barras de error no se traslapan. El parámetro Desviación Estándar no puede diferenciar entre grupos de depósito. Para este parámetro todas las barras de error se traslapan.

Utilizamos los parámetros de textura de la Matriz de Co-ocurrencia de escala de gris (GLCM) para la caracterización de los patrones de gotas secas de sangre. La Fig.3.7 muestra los parámetros de textura de GLCM (Energía, Inercia, Correlación, Homogeneidad y Entropía) como función de la concentración de hematocrito. Se observa que las barras de error de todos los parámetros de textura son ligeramente mayores que las observadas con los parámetros de la Estadística de Primer Orden (FOS). Además, los depósitos generados con 50 % de agua ultrapura y 50 % san-

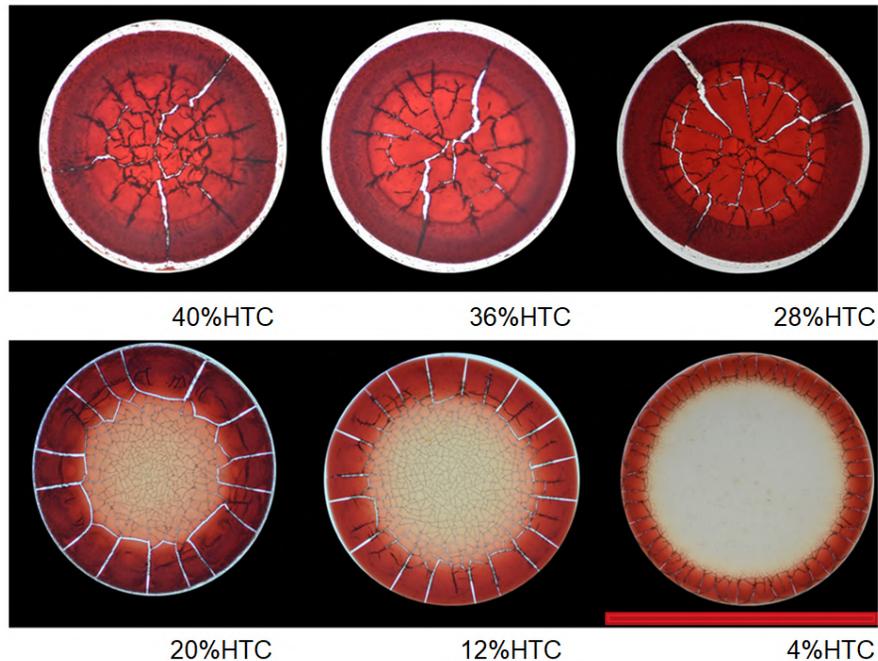


Figura 3.4: **Gotas secas a diferente concentración de hematocrito.** Depósitos de sangre generados a diferente concentración de hematocrito 40 %, 36 %, 28 %, 20 %, 12 % y 4 % HCT, ($V= 3\mu L$, $T=20 - 25^{\circ}C$, $HR= 25 - 35 \%$). La barra en color rojo tiene una longitud de $2.88mm$.

gre (20 %HCT) presentan la mayor magnitud en las barras de error para la mayoría de parámetros de textura. Para este conjunto de parámetros de textura, la Entropía Configuracional genera los mejores resultados para diferenciar entre patrones. Los depósitos generados tanto con 28 % HCT (30 % agua ultrapura y 70 % sangre) y 4 % HCT(90 % agua ultrapura y 10 % sangre) tienen los mismos valores de Entropía. Este es un resultado que está en concordancia con la literatura, la cual dice que un mismo valor de un parámetro de textura puede ser encontrado para patrones completamente diferentes, por lo que existe la necesidad de medir más de un parámetro de textura para poder diferenciar entre grupos.

De los resultados anteriores se concluye que los parámetros de textura de Entropía y Promedio son excelentes candidatos para caracterizar y diferenciar entre grupos de depósitos de sangre.

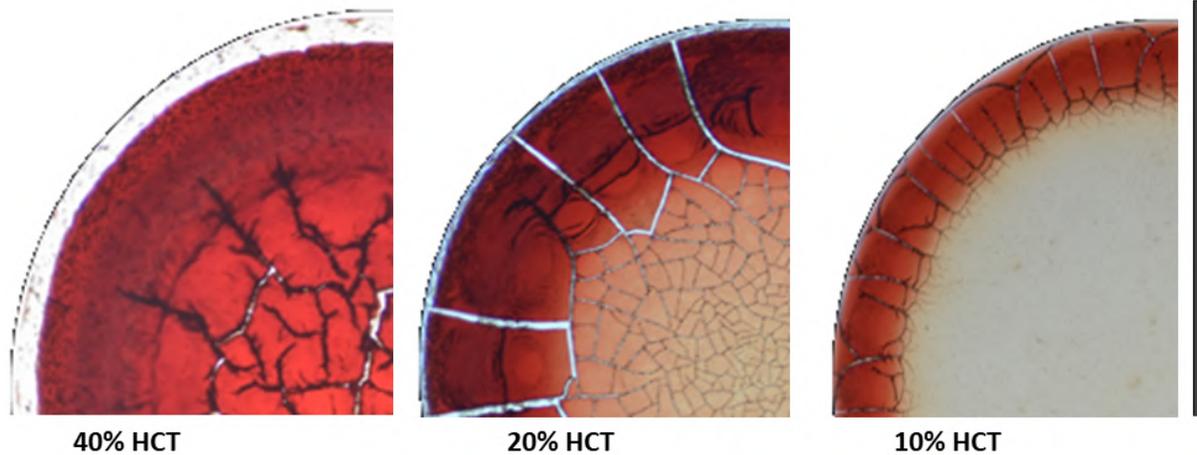


Figura 3.5: **Patrones en gotas secas a diferente concentración de hematocrito.** Acercamiento a depósitos generados con 40 %, 20 %, y 4 % HCT, ($V= 3\mu L$, $T=20-25^{\circ}C$, $HR= 25-35\%$). La barra en color negro tiene una longitud de $1.41mm$.

3.3. Formación de patrones en gotas sésiles de sangre

En la Fig. 3.8 se presenta el proceso de secado de una gota de sangre, con una concentración de 0 % agua y 100 % sangre (40 %HCT). La formación de patrones tiene tres etapas. En la primera, la gota se ancla al sustrato e inicia su proceso de evaporación. En los instantes finales de esta etapa, se observa la formación de la corona derivado de los flujos Capilares. En la segunda etapa se produce una reducción rápida sobre el interior del depósito. Finalmente, en la tercera etapa se puede ver la formación de grietas y de placas móviles.

Los parámetros de la Estadística de Primer Orden (FOS) permiten explorar la formación de los patrones durante el tiempo de secado de las gotas de sangre. En la Fig. 3.9. se observan los parámetros de textura (Promedio, Desviación Estándar, Densidad Integrada, Asimetría y Curtosis) en función del tiempo total de secado de los depósitos de sangre, de una solución de 40 %HCT (0 % agua bidestilada y 100 % sangre). Los parámetros Promedio, Densidad Integrada y Asimetría cuantifican el proceso de formación de patrones durante el secado de gotas.

Análogamente, los parámetros de la estadística basada en la Matriz de Co-ocurrencia

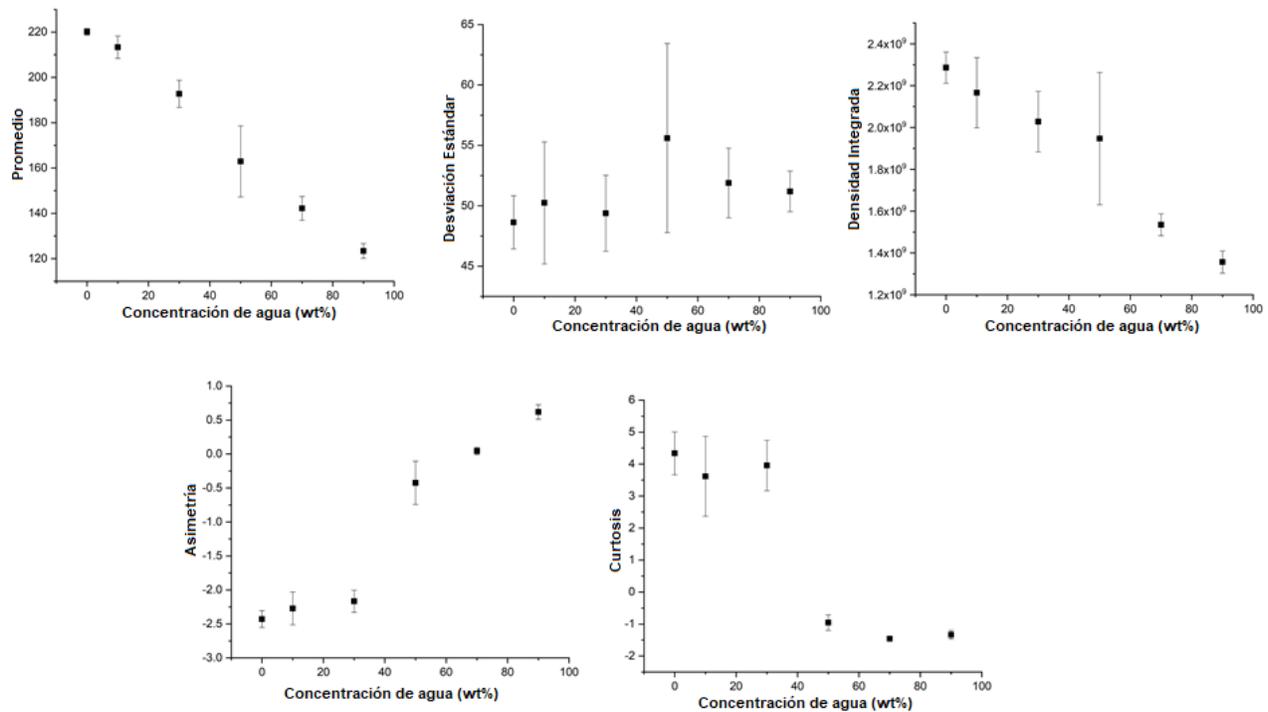


Figura 3.6: **Estadística de Primer Orden (FOS)**. Parámetros de textura de FOS (Promedio, Desviación Estándar, Densidad Integrada, Asimetría y Curtosis) como función de la concentración de hematocrito ($V = 3\mu L$, $T = 20 - 25^\circ C$, $HR = 25 - 35\%$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 6$.

de escala de Grises (GLCM) permiten explorar la formación de los patrones en las gotas secas de sangre. En la Fig. 3.10 se muestra la dinámica de estos parámetros de textura como función del tiempo total de secado de un depósito de sangre a una concentración de 0% agua bidestilada y 100% sangre (40% HCT). En este análisis se observa que la Entropía configuracional es el parámetro más sensible para cuantificar el proceso de formación de patrones. Este parámetro tiene la capacidad de develar el proceso de remoción, el cual consiste en la separación del depósito con el sustrato. Además, tiene una alta sensibilidad a la aparición de la corona que surge en los instantes finales de la segunda etapa. Para todos los conjuntos de depósitos formados con diferente concentración de agua ultrapura se observaron resultados similares.

Por otro lado, en la Fig. 3.11 se observa la dinámica del ángulo de contacto, la altura y el diámetro de la gota. El ángulo de contacto y la altura de la gota disminuyen, mientras que el radio del depósito permanece constante durante el proceso de

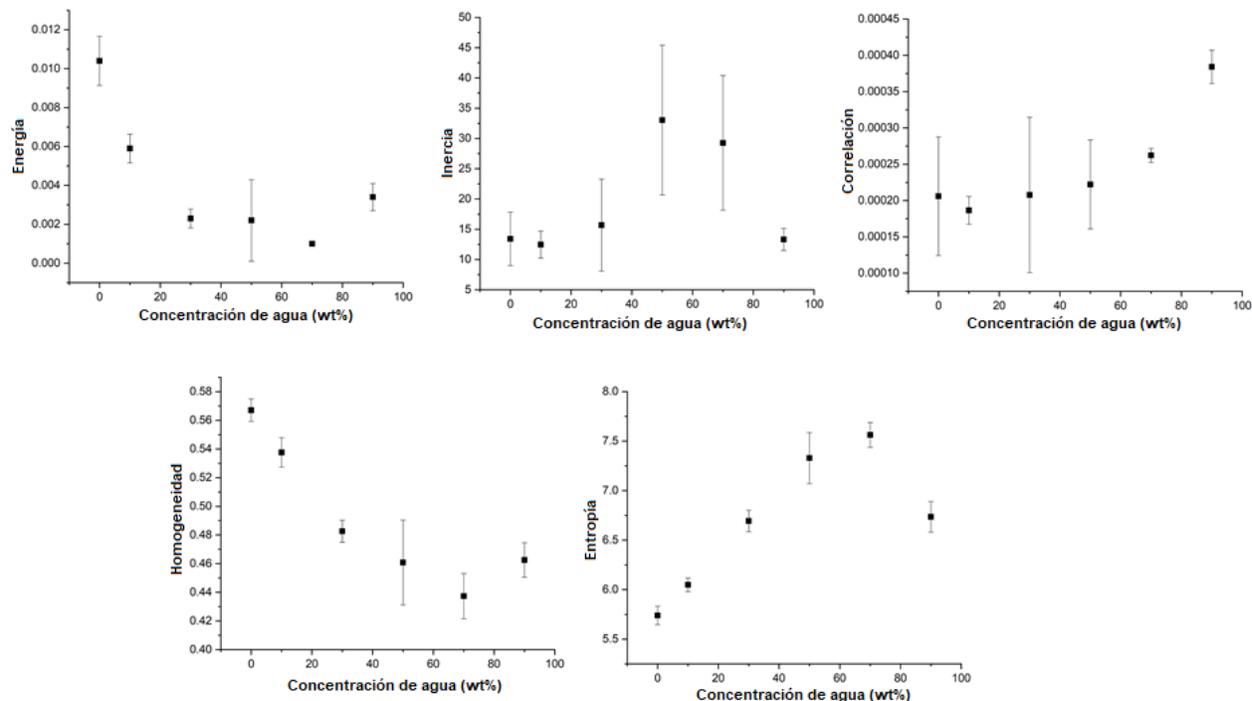


Figura 3.7: **Matriz de Co-ocurrencia de escala de gris (GLCM)**. Parámetros de textura de GLCM (Energía, Inercia, Correlación, Homogeneidad y Entropía) como función de la concentración de hematocrito ($V=3\mu L$, $T=20-25^{\circ}C$, $HR=25-35\%$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n=6$.

secado. Eso cumple con el modelo de secado CCR, el cual surge para gotas con un ángulo de contacto menor a noventa grados, lo que favorece la formación de flujos capilares y el efecto de anillo de café.

Finalmente, como prueba de concepto para validar nuestra metodología de secado de gotas, se realizaron depósitos de gotas de sangre de pacientes clínicamente sanos. Se encontró que las gotas de sangre de los donadores que padecieron COVID-19 tres meses antes del experimento, mostraban un menisco bien definido en la región central de la gota, así como diferencias en las estructuras generadas durante el proceso de secado de gotas, ver la Fig.3.12. Además, se encontró que estos depósitos presentan una significativa reducción entre el número de grietas y en las partes móviles. Una posible explicación para este fenómeno son los desórdenes de coagulación asociados con la infección de COVID-19.

El efecto del volumen inicial de gota sobre la formación de patrones en gotas

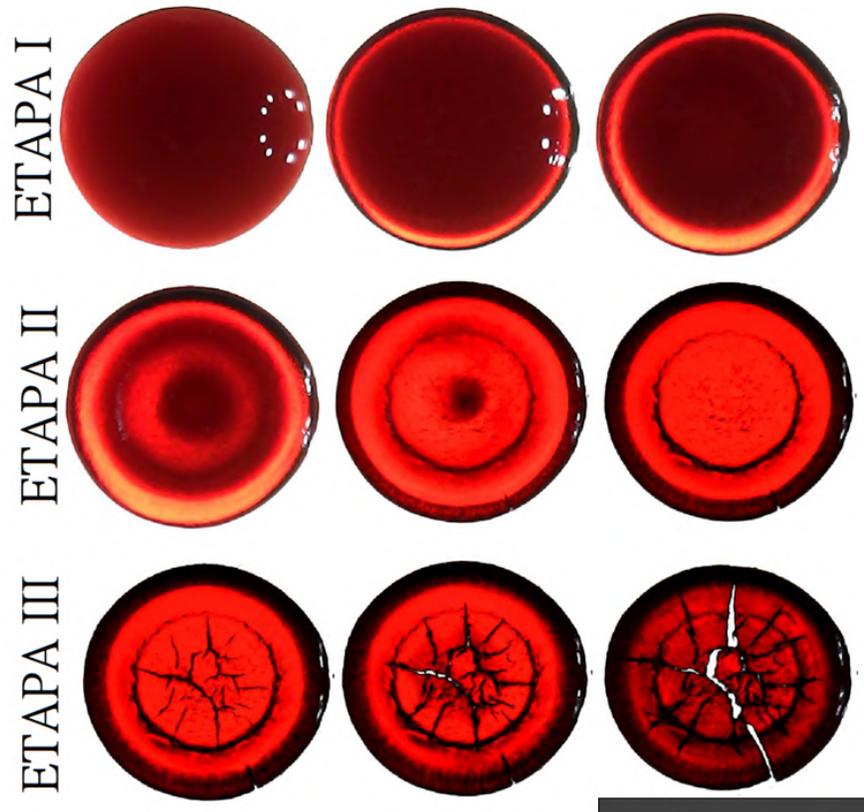


Figura 3.8: **Formación de patrones a partir del secado de gotas sésiles de sangre.** Diferentes etapas del proceso de secado de una gota de sangre ($V= 3\mu L$, 40 %HCT, $T=20 - 25^{\circ}C$, HR= 25 - 35 %). La barra en color negro tiene una longitud de 3.2mm.

secas de sangre, para un paciente que padeció COVID-19, se muestra en la Fig.3.13. Claramente, no hay diferencias significativas en la estructura de depósitos generados en un amplio intervalo de volúmenes 3 – 12 μL . El menisco se preserva en todos los depósitos, mientras que el número de grietas y de partes móviles solo incrementan con un alto volumen de gota (6 μL).

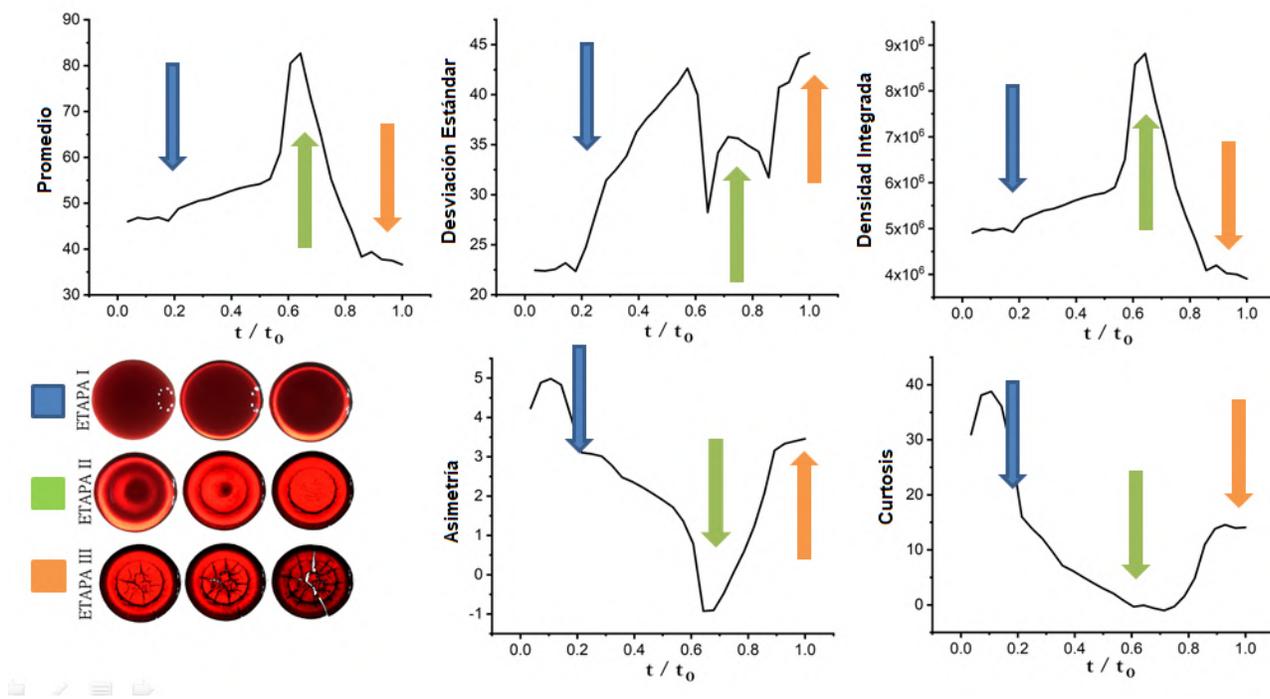


Figura 3.9: **Análisis del secado de gotas usando FOS.** Evolución temporal de los parámetros de textura de FOS (Promedio, Desviación Estándar, Densidad Integrada, Asimetría y Curtosis) durante el secado de gotas de sangre ($V=3\mu L$, 40% HCT, $T=20-25^{\circ}C$, HR= 25 – 35 %).

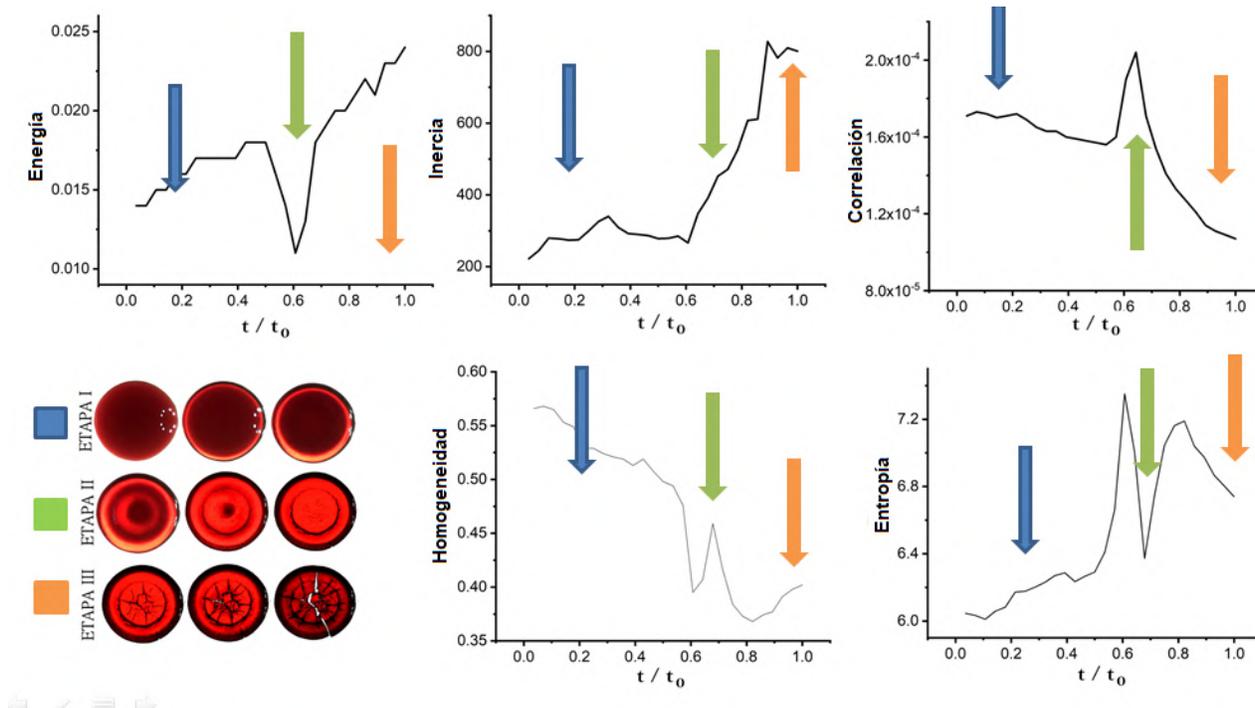


Figura 3.10: **Análisis del secado de gotas usando GLCM.** Evolución temporal de los parámetros de textura de GLCM (Energía, Inercia, Correlación, Homogeneidad y Entropía) durante el secado de gotas de sangre ($V=3\mu\text{L}$, 40 %HCT, $T=20-25^\circ\text{C}$, HR= 25 – 35 %).

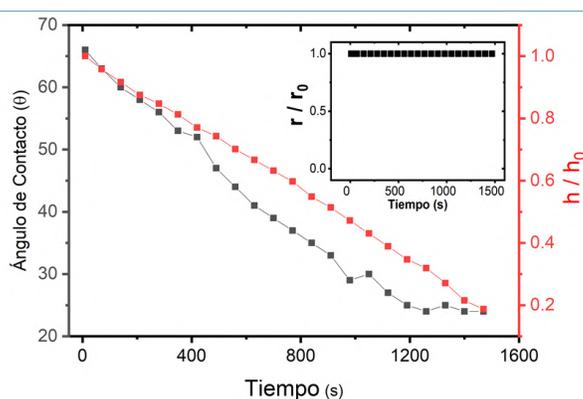


Figura 3.11: **Modo de secado.** Ángulo de contacto y la altura como función del tiempo durante el secado de una gota de sangre ($V=3\mu\text{L}$, 40 %HCT, $T=20-25^\circ\text{C}$, HR= 25 – 35 %). Recuadro: La correspondiente evolución temporal del radio de la gota.

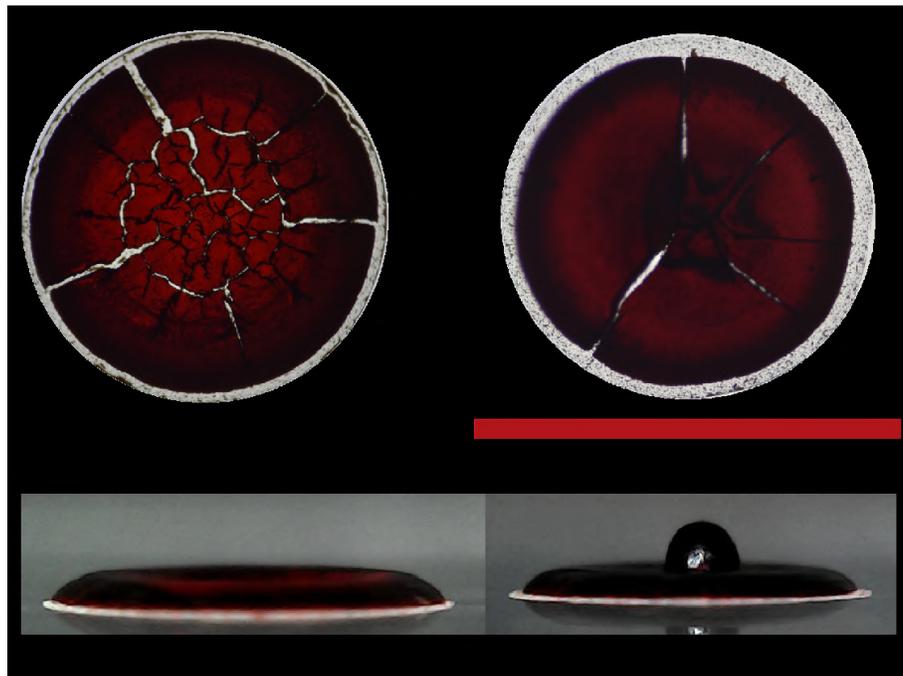


Figura 3.12: **Depósitos de sangre de donadores que padecieron Covid-19.** (a) Gotas secas de paciente sano. (b) Gotas secas de paciente Post COVID-19 ($V= 3\mu L$, $40\%HCT$, $T=20 - 25^{\circ}C$, $HR= 25 - 35\%$). La barra en color rojo tiene una longitud de $3.23mm$.

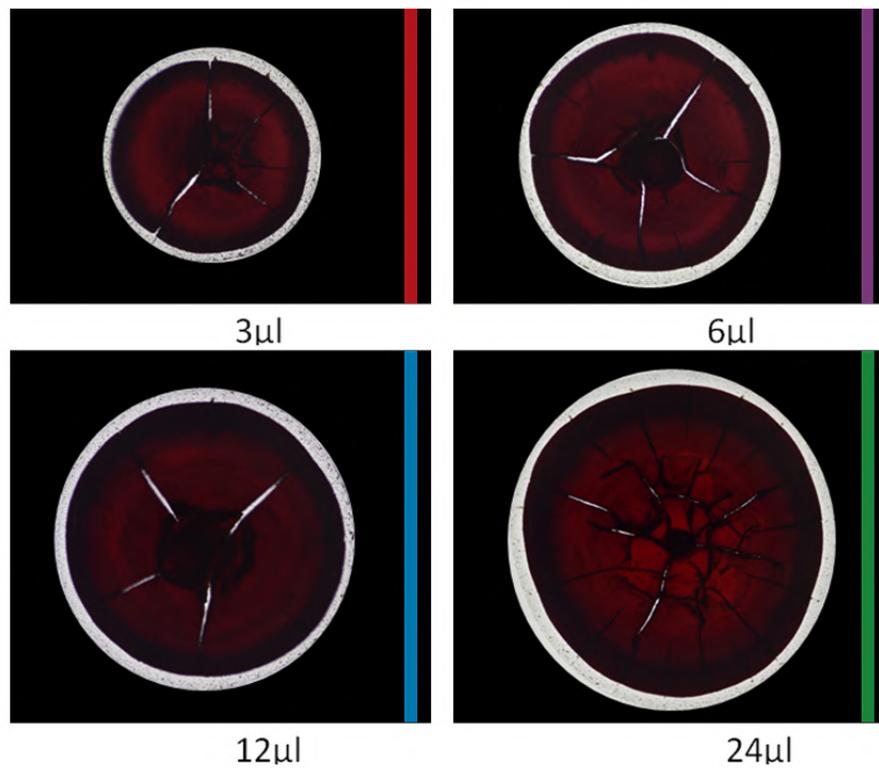


Figura 3.13: **Patrones formados a diferente volumen inicial de gota.** Depósitos de paciente Post COVID-19 producidos a diferente a volumen ($V= 3 - 24\mu L$, 40% HCT, $T=20 - 25^{\circ}C$, HR= 25 - 35 %). Las barras en color rojo, morado, azul y verde tienen una longitud de 3.59, 3.49, 5 y 5.66mm, respectivamente.

Capítulo 4

Gotas colgantes de sangre

En este Capítulo, presentamos el estudio de la formación de patrones generados por el secado de gotas colgantes de sangre con diferente volumen inicial ($V = 3 - 24 \mu L$). Encontramos que emergen dos grupos de depósitos: gotas secas con simetría radial (Grupo I) y gotas secas con deposición lateral de suero sanguíneo (Grupo II). La deposición lateral surge del colapso de la gota inducido por la aglomeración de hematocrito en el ápice de la gota. Sin importar el volumen inicial de gota, el ángulo de contacto crítico para el colapso es 11 grados menor al ángulo de contacto inicial. Finalmente, probamos que la masa contenida en una gota favorece a la aparición del modo de secado inestable.

4.1. Resultados

El secado de gotas colgantes de sangre induce la formación de dos grupos de depósitos que comparten muchas similitudes estructurales, ver la Fig.4.1. Ambos están compuestos por una región central de alta concentración de eritrocitos, y una corona de baja concentración. La región central se produce una estructura, en forma de dendrita, compuesta por grietas negras interconectadas. La corona contiene grietas radiales blancas y grietas negras ortonormales. Interesantemente, no observamos la formación de placas móviles en la región central. La mayor diferencia entre los grupos de gotas secas de sangre es una deposición lateral compuesta mayormente por

suero sanguíneo, ver imágenes de grupo II en la Fig.4.1b.

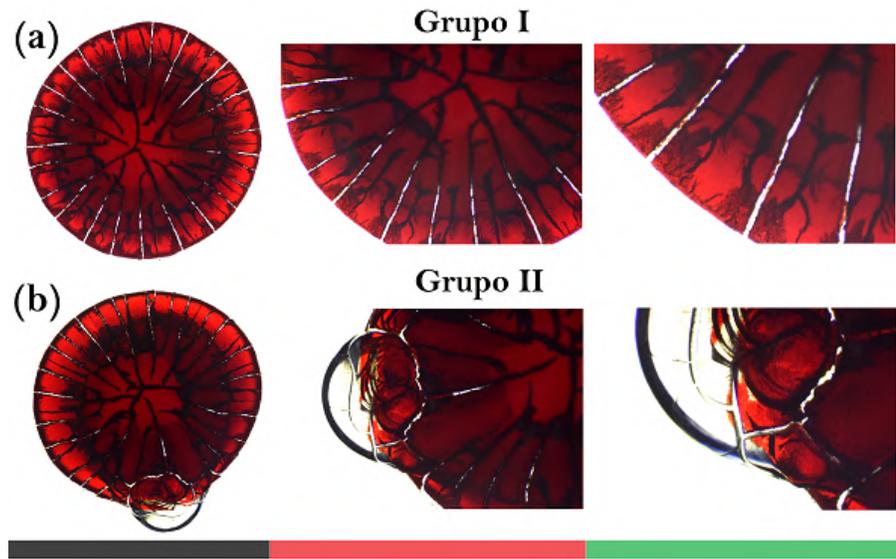


Figura 4.1: **Depósitos formados por el secado de gotas colgantes de sangre.** (a) Grupo I. Gotas secas que no presenta colapso. (b) Grupo II. Gotas secas que presentan colapso. $V= 3\mu L$, 40% HCT, $T=20 - 25^\circ C$, $HR= 25 - 35\%$. las barras en color negro, rojo y verde tienen una longitud de 2.92, 2.06 y 1.09mm, respectivamente.

La Fig.4.2a muestra la proyección tridimensional de los depósitos de sangre. Las regiones en color rojo muestran la formación de estructuras dendríticas en la región central, mientras que las regiones en verde corresponden a zonas de baja concentración de eritrocitos en la corona. La protuberancia del depósito del grupo II en color azul confirma la ausencia de eritrocitos. Para cuantificar la distribución espacial de eritrocitos, medimos el perfil de intensidad radial. La Fig.4.2b. muestra que, aunque las curvas de $I(r)$ de ambos depósitos tienen una distribución de masa muy semejante, los perfiles muestran diferencias estructurales en la región central de las dendritas (de $r/r_0 = 0$ a $r/r_0 = 0.2$). Además, cerca de $r/r_0 = 1$ observamos un menisco, en el perfil correspondiente a la gota seca colapsada. Interesantemente, este pequeño menisco y la similitud entre las curvas de la compacidad de ambos depósitos confirman una baja concentración de eritrocitos en la deposición lateral (ver recuadros de la Fig.4.2b).

La Fig.4.3 muestra el proceso de formación de patrones del Grupo I. Primero, la gota se ancla al sustrato, los flujos capilares arrastran a las células del centro de la

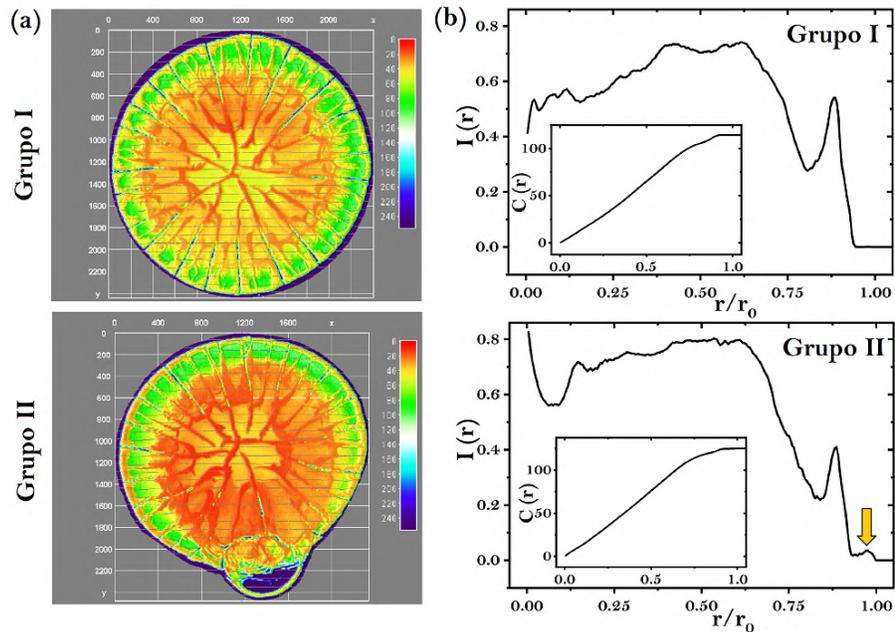


Figura 4.2: **Análisis estructural de gotas secas de sangre.** (a) Proyección tridimensional de depósitos de gotas colgantes de sangre. Izquierda: Grupo I. Gota seca que no presenta colapso. Derecha: Grupo II. Gota seca que presenta colapso. $V = 3\mu L$, $40\% \text{HCT}$, $T = 20 - 25^\circ C$, $HR = 25 - 35\%$. (b) El correspondiente Perfil de Densidad Radial $I(r)$ de los depósitos en (a). La línea amarilla indica la deposición lateral. En el recuadro se muestra la compacidad $C(r)$ correspondiente a las gotas secas en (a).

gota hacia la periferia (imagen a) i y ii). Al mismo tiempo, las células rojas se aglomeran en el ápice de la gota (imagen b) i y ii). La evaporación genera una reducción de la tensión superficial, permitiendo que la fuerza de gravedad actúe con mayor influencia sobre la gota. Como resultado de este proceso, la gota colgante adquiere la típica forma de campana (ver imagen c) i y ii). Simultáneamente, la gelación permite la formación de grietas negras radiales que emergen de la periferia hacia la región central de la gota (imagen c)-d) i y ii). Las grietas blancas surgen de la separación de placas móviles de la corona (imagen e)-f) i y ii). Después, el líquido de la región central se evapora (imagen g) i y ii) y las grietas ortonormales emergen abruptamente. Finalmente, la estructura dendrítica aparece durante el proceso de desecación (imagen h) i y ii).

La Fig.4.4 muestra que el proceso de la formación de los depósitos del Grupo II es muy similar al del grupo I. La gota colgante se ancla al sustrato, y los eritrocitos

se aglomeran en la línea de contacto triple (imagen a) i y ii). Sin embargo, durante la evaporación, la reducción de la tensión superficial genera un desbalance con la fuerza de gravedad. Esto puede resultar en una aglomeración no uniforme de eritrocitos en el ápice de la gota y la formación de un menisco (imagen b) i y ii). Durante la evaporación, el menisco crece hasta que colapsa (imagen c) i y ii), generando un flujo radial de suero sanguíneo sobre el sustrato (imagen d)-e) i y ii). Después, la gelación permite la formación de grietas, mientras que el recubrimiento lateral de suero incrementa (imagen f)-g) i y ii). Finalmente, durante la desecación observamos la formación del resto de estructuras que dan las características únicas a cada depósito (imagen h) i y ii).

La Fig.4.5a muestra patrones formados en gotas secas de sangre con diferente volumen inicial de gota. Ambos grupos de depósitos presentan estructuras similares sin importar el volumen. Se observa que el número de grietas blancas radiales de la corona incrementa a medida que incrementa el volumen inicial de la gota, mientras que el número de placas en la región central disminuye. Interesantemente, la protuberancia del suero sanguíneo de las gotas del Grupo II incrementa de tamaño como el volumen inicial. Caracterizamos la textura de los depósitos de ambos grupos a través de la lagunaridad. La Fig.4.5b muestra que el logaritmo natural de la lagunaridad $\ln(\lambda)$ decrece como función del logaritmo natural del tamaño de caja normalizado $\ln(\epsilon)$. En la gráfica, se pueden observar dos grupos de cuatro curvas claramente diferenciables correspondientes a los dos grupos de depósitos. La curva a $3\mu L$ muestra la lagunaridad máxima ($\ln(\lambda) = 1.89$) para depósitos del grupo 2 a $\ln(\epsilon) = -3.68$, mientras que la curva a $12\mu L$ alcanza el menor valor ($\ln(\lambda) = 1.56$). El valor máximo de $\ln(\lambda)$ se observa a $6\mu L$ ($\ln(\lambda) = 2.08$), mientras que el menor se obtiene a $24\mu L$ ($\ln(\lambda) = 1.82$).

Exploramos el proceso de secado de gotas a través del ángulo de contacto, el diámetro y la altura de la gota. Encontramos que es posible medir un conjunto de parámetros críticos antes de que se produzca la inestabilidad en la gota que genera su colapso. La Fig.4.6a muestra, en negro, los valores calculados del ángulo de contacto inicial como función del volumen inicial de gota para los depósitos colgantes del Grupo II. El valor máximo del ángulo de contacto inicial es de 61.0833° y se alcanza a un

volumen inicial de gota de $V = 6\mu L$, mientras que el valor mínimo es de 51.125° y se logra a un volumen $V = 24\mu L$. En contraste, en color rojo, se presentan los valores del ángulo de contacto crítico en función del volumen inicial de gota de los depósitos colgantes del Grupo II. El valor máximo de ángulo de contacto crítico 49.4° se alcanza a un volumen inicial de gota de $V = 6\mu L$, mientras que el valor mínimo 40.5° del ángulo crítico se logra a un volumen $V = 24\mu L$.

En la Fig.4.6b se ilustra el comportamiento de la diferencia entre los valores del ángulo de contacto inicial con los valores del ángulo de contacto crítico ($\theta_i - \theta_c$) como función del volumen inicial de gota. Este valor indica que entre el ángulo de contacto inicial y el ángulo de contacto crítico existe una diferencia de alrededor de 12° , entre depósitos del mismo volumen inicial. El ángulo de contacto inicial el de mayor valor e indica que antes de que se presente la inestabilidad en el secado de gota, el ángulo de contacto inicial disminuye en función del tiempo de secado, hasta alcanzar el valor del ángulo de contacto crítico.

Definimos a la altura crítica y al diámetro crítico como la longitud de la altura y el diámetro correspondientes antes de que inicie la inestabilidad en la gota. La Fig.4.7a muestra que la altura de la gota incrementa en función del volumen inicial (negro). Mientras que, la altura crítica reduce. En la Fig.4.7b se muestra que, para los depósitos del Grupo II, el diámetro inicial de la gota incrementa como función del volumen inicial de gota (color negro). En contraste, los valores del diámetro crítico de la gota incrementan (color rojo). Se observa que no hay diferencias significativas entre el diámetro inicial y el diámetro crítico de gota, lo que implica que para cada conjunto de depósitos del mismo volumen, el diámetro inicial se mantiene constante durante el secado.

Una pregunta interesante es conocer la ocurrencia del fenómeno de colapso durante la formación de patrones por el secado de gotas de sangre colgantes. La Fig.4.8 muestra que la frecuencia relativa de aparición de depósitos del Grupo II incrementa con el volumen inicial de gota. Gotas de sangre de $3\mu L$ presentan muy poca baja probabilidad de colapso, mientras que a $24\mu L$ prácticamente todas las gotas presentan este fenómeno.

Finalmente, exploramos el efecto de la concentración de componentes en sangre sobre el fenómeno de colapso de la gota. La Fig.9a muestra los depósitos de sangre con dos concentraciones de hematocrito (20 % y 4 %) a diferente volumen inicial de gota. La Fig.9b muestra el perfil de intensidad radial de las estructuras en la Fig.9a. Encontramos que en estos depósitos no se observa la deposición lateral de suero sanguíneo. En cambio, se observa que las estructuras de depósitos al 20 % de hematocritos presentan grandes grietas que emergen del anillo de café hacia el centro de la gota. A simple vista se observa que el número de estas estructuras y de placas móviles incrementa con el volumen inicial de gota. Las curvas de $I(r)$ en la región central (de $r/r_0 = 0$ a 0.8) confirman una alta diferencia morfológica entre patrones de gotas secas con 20 % HCT. En contraste, depósitos con 4 % son similares, ver los correspondientes perfiles de $I(r)$ en la Fig.9b. Estos depósitos están compuestos por un anillo de café y una región central la cual contiene un conglomerado circular de eritrocitos. Ambos conjuntos de gotas secas no muestran la deposición lateral de suero sanguíneo.

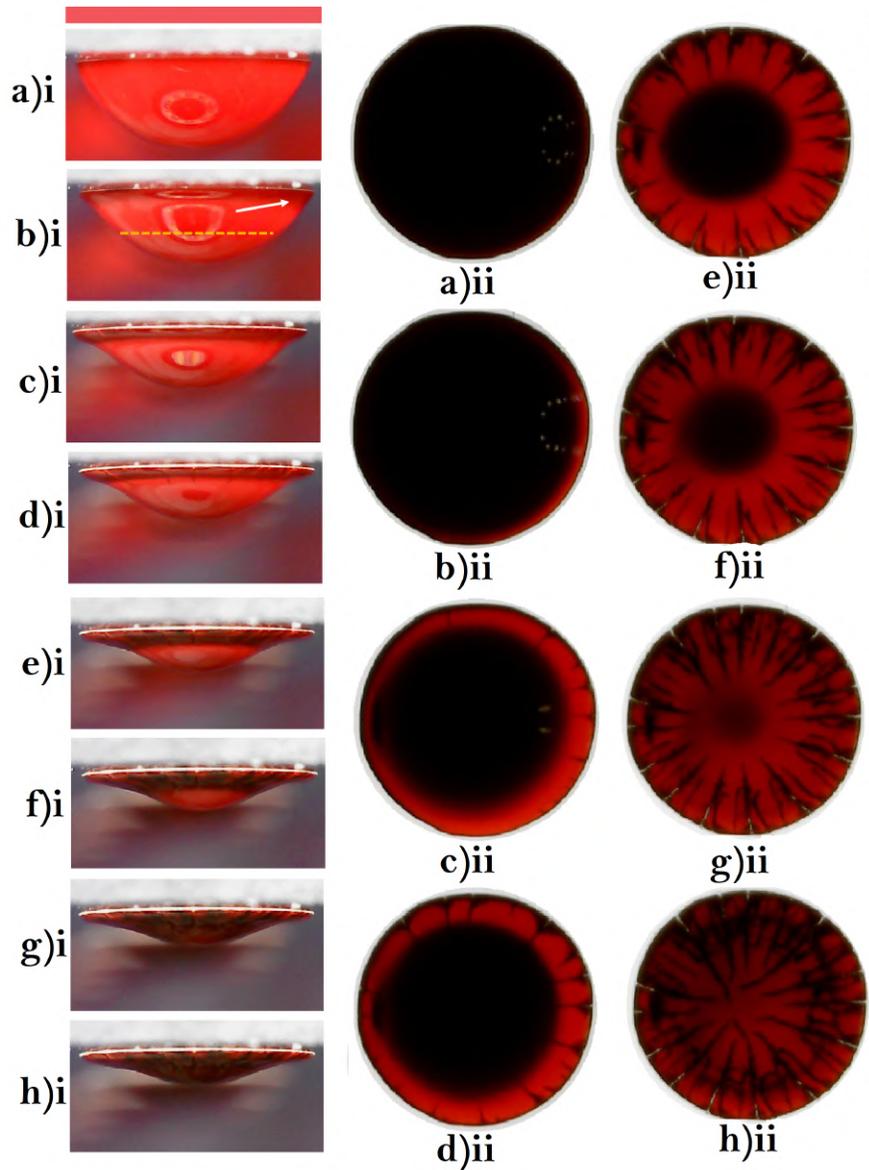


Figura 4.3: **Formación de depósitos de gotas colgantes de sangre. Grupo I** (a) Imágenes laterales del proceso de secado de una gota que no presenta colapso. (b) Las correspondientes imágenes frontales del proceso de secado. $V= 6\mu L$, 40% HCT, $T=20 - 25^{\circ}C$, HR= 25 - 35 %. Las barras en color negro y rojo tienen una longitud de 3.73 y 3.08mm, respectivamente.

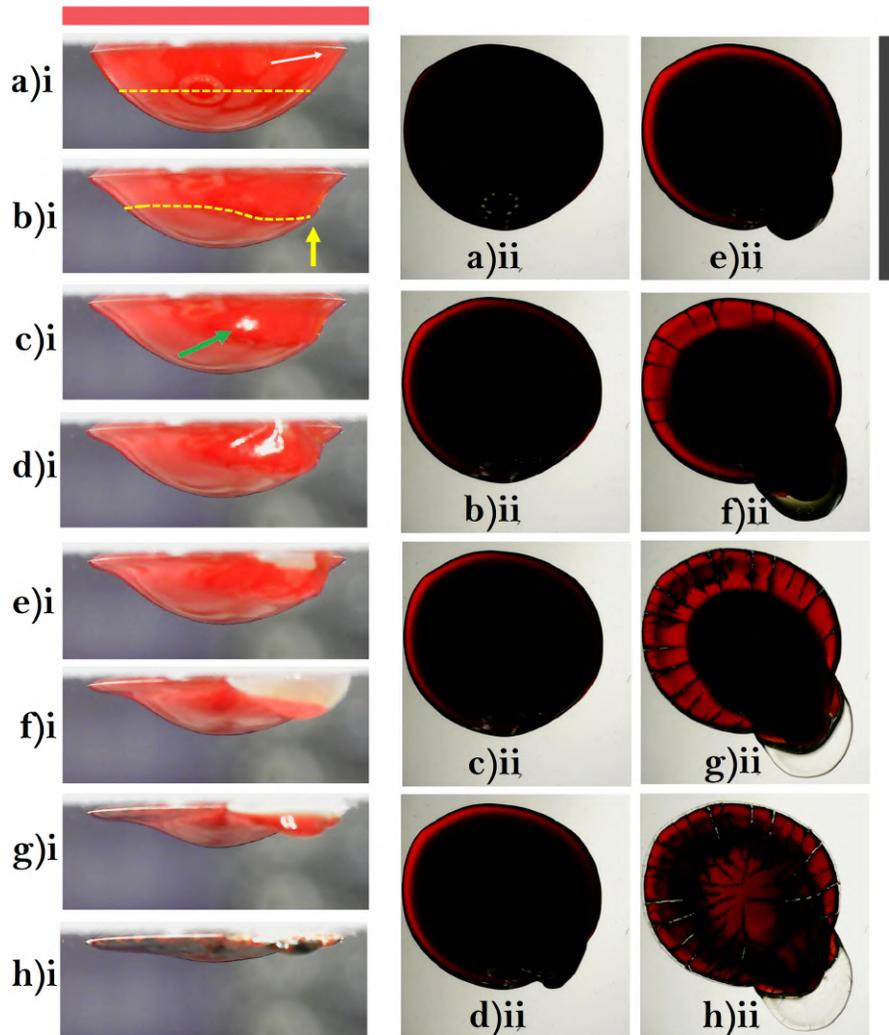


Figura 4.4: **Formación de depósitos de gotas colgantes de sangre. Grupo II** (a) Imágenes laterales del proceso de secado de una gota que presenta colapso. (b) Las correspondientes imágenes frontales del proceso de secado. $V= 12\mu L$, 40% HCT, $T=20 - 25^{\circ}C$, $HR= 25 - 35\%$. Las barras en color negro y rojo tienen una longitud de 5.19 y 4.85mm, respectivamente.

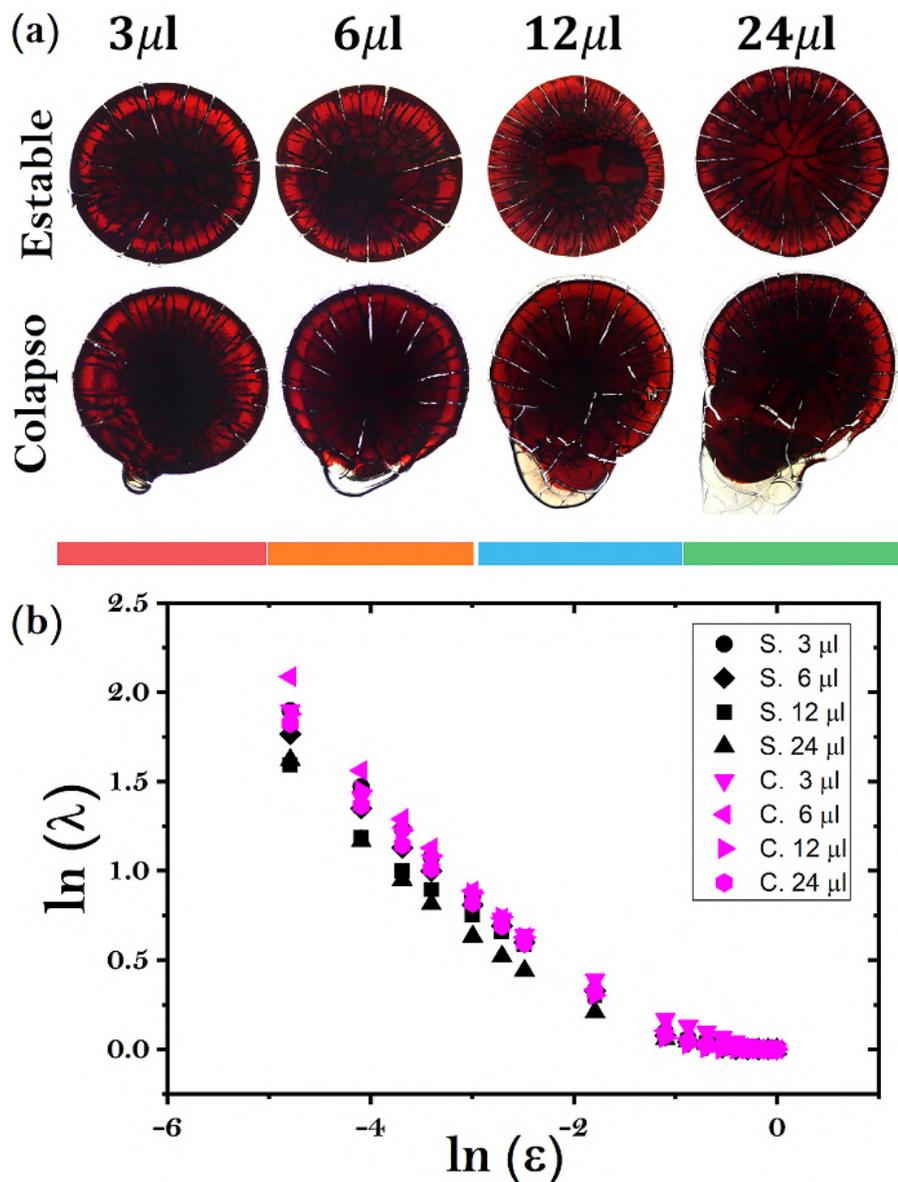


Figura 4.5: **Depósitos de gotas colgantes de sangre con diferente volumen inicial.** Panel superior: Imágenes frontales de gotas de Grupo I. Panel Inferior: Imágenes frontales de gotas de Grupo II. $V = 3, 6, 12$ y $24\mu\text{L}$; $40\% \text{HCT}$, $T = 20 - 25^\circ\text{C}$, $\text{HR} = 25 - 35\%$. Las barras en color rojo, morado, azul y verde tienen una longitud de $2.98, 3.77, 4.4$ y 5.8mm respectivamente. (b) El logaritmo natural de la lagunaridad $\ln(\lambda)$ como función del logaritmo natural del tamaño de caja normalizado $\ln(\epsilon)$. El color negro y violeta corresponden a las lagunaridades del Grupo I y II, respectivamente.

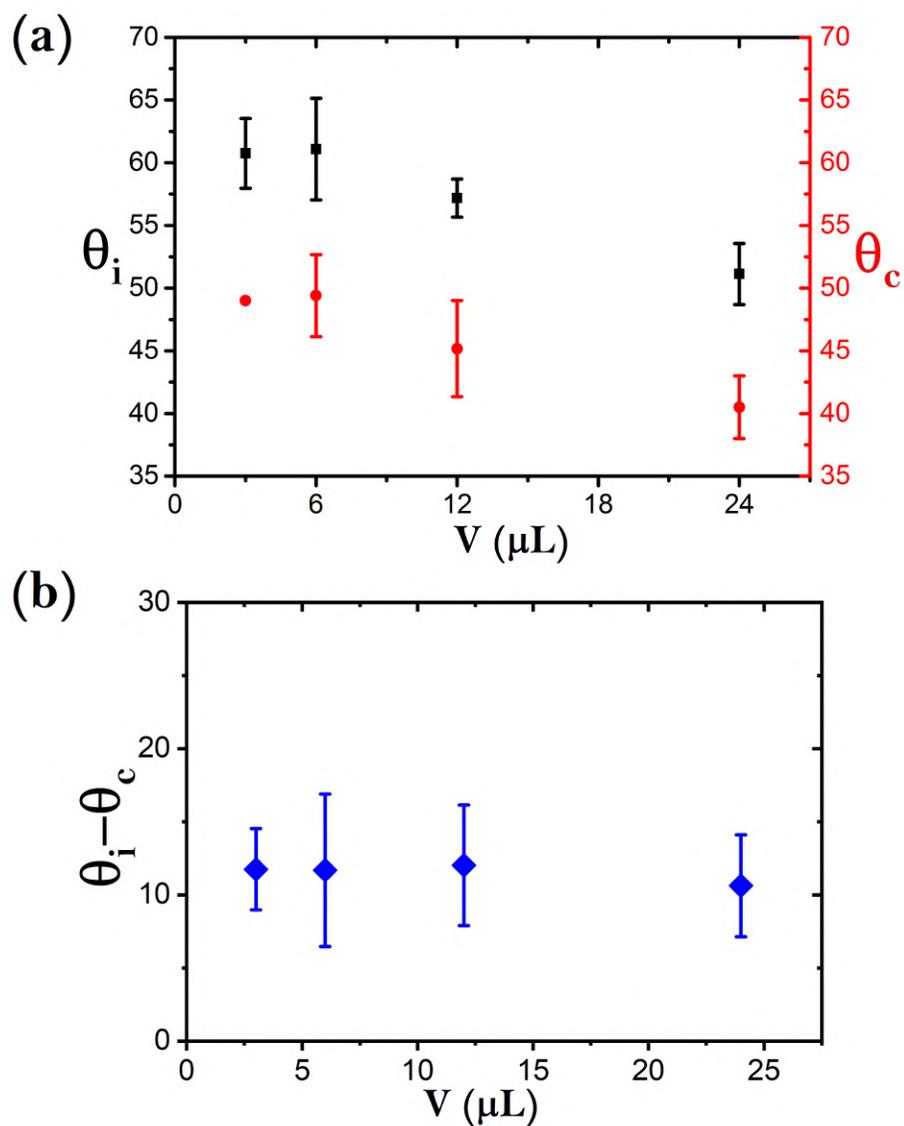


Figura 4.6: **Ángulo de contacto inicial.** (a) Ángulo de contacto inicial (negro) y ángulo de contacto crítico (rojo) como función del volumen inicial de gota. (b) Diferencia relativa entre ángulos de contacto como función del volumen inicial de gota (40 %HCT, $T=20 - 25^\circ\text{C}$, $\text{HR}= 25 - 35\%$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 4$.

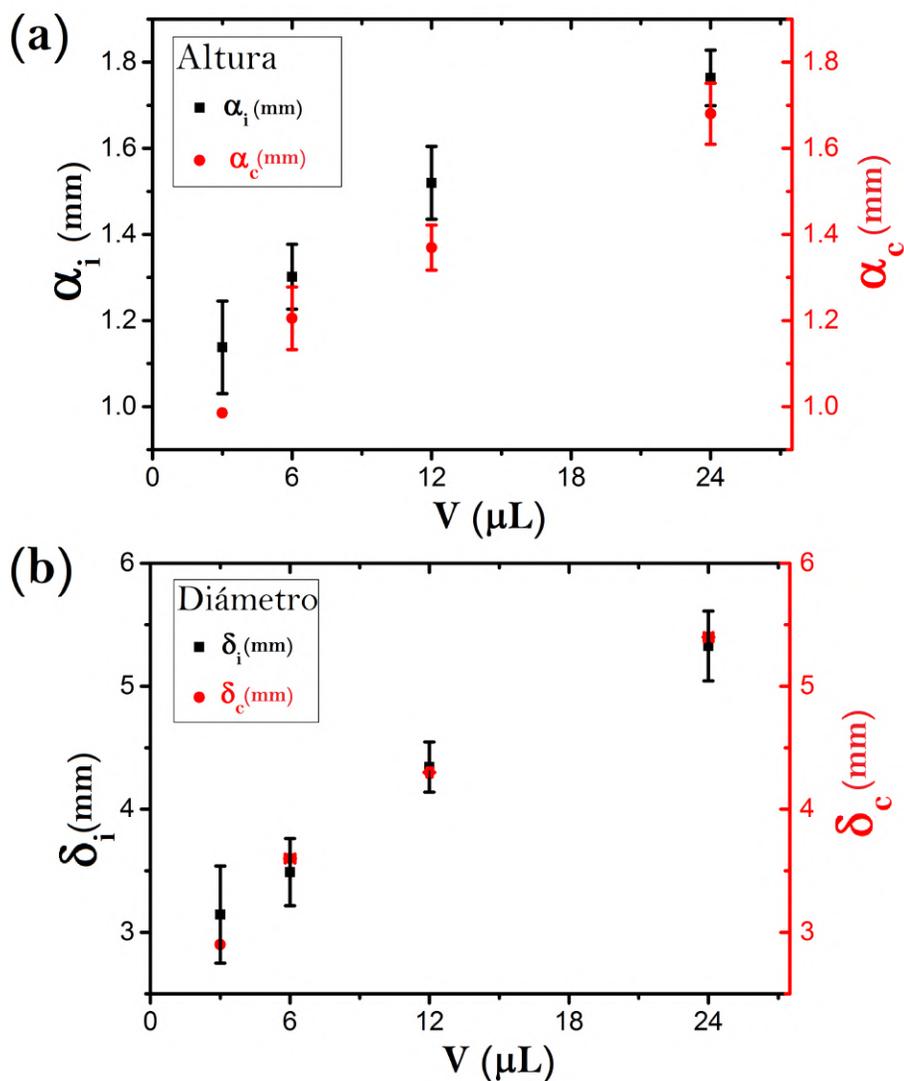


Figura 4.7: **Altura y diámetro de gota.** (a) Altura inicial de la gota (negro) y altura crítica (rojo) como función del volumen inicial de gota. (b) Diámetro inicial de la gota (negro) y Diámetro crítico (rojo) como función del volumen inicial de gota (40 %HCT, $T=20 - 25^\circ\text{C}$, $\text{HR}= 25 - 35\%$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 4$.

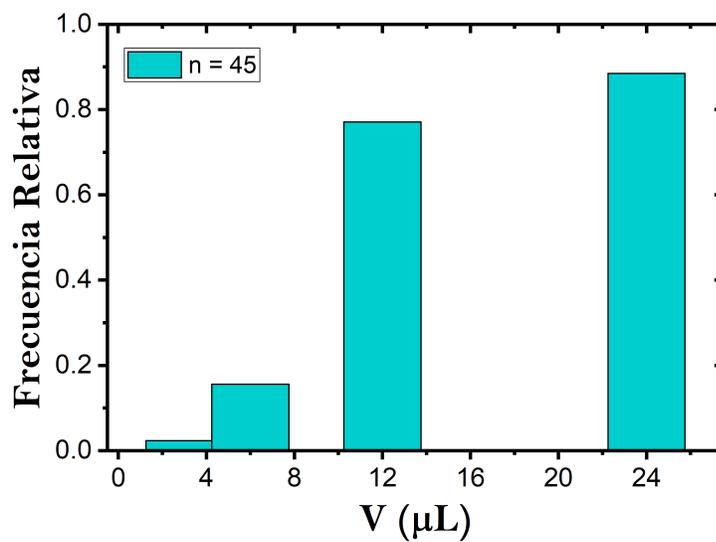


Figura 4.8: **Frecuencia relativa de aparición de depósitos del Grupo II** Frecuencia relativa de aparición de colapso durante el secado de gotas colgantes de sangre (40 %HCT, T=20 – 25°C, HR= 25 – 35 %).

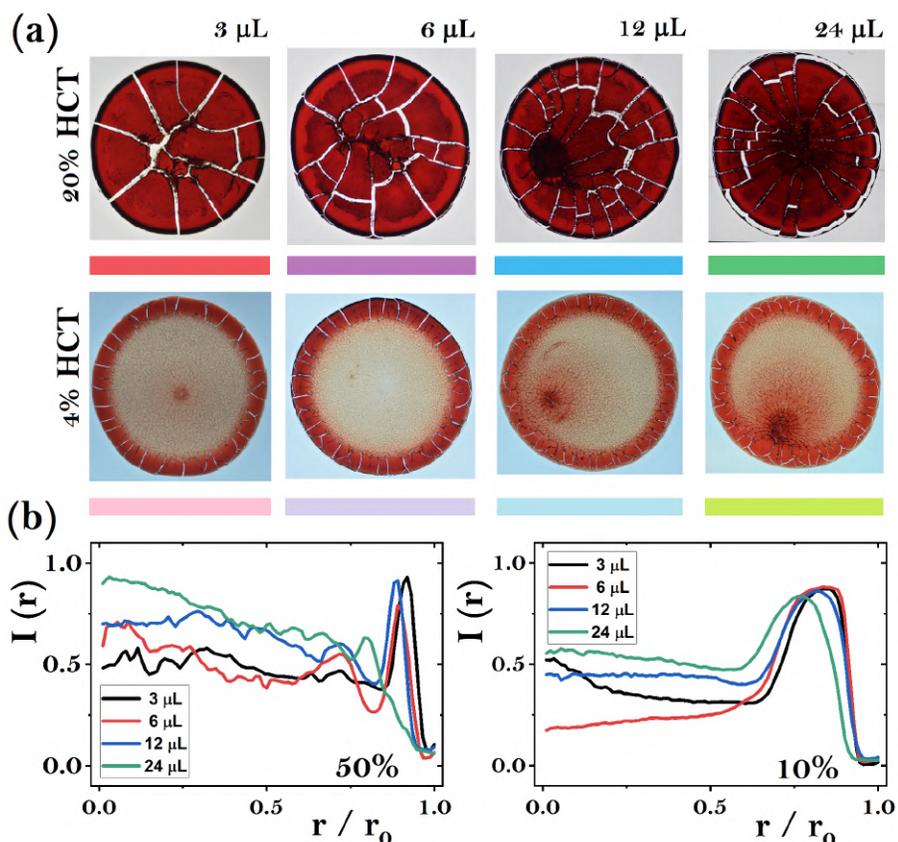


Figura 4.9: **Depósitos con diferente concentración de hematocrito** Panel superior: Depósitos de gotas colgantes de sangre con 20 %HCT. Panel Inferior: Depósitos de gotas colgantes de sangre con 4 %HCT ($T=20 - 25^\circ\text{C}$, $\text{HR}= 25 - 35 \%$). Para los depósitos secos con una concentración de 20 % HCT las barras de color rojo, morado, azul y verde tienen una longitud de 2.99, 3.54, 4.69 y 5.49mm, respectivamente. Las gotas secas con una concentración de 4 %HCT. Las barras en rosa, morado claro, celeste y verde claro tienen una longitud de 2.89, 3.68, 4.68 y 5.48mm, respectivamente. (b) Las correspondientes curvas de $I(r)$ de (a).

Capítulo 5

Gotas colgantes de proteínas

La literatura prueba que es el estudio de soluciones de proteínas es un buen punto de partida para comprender los complejos procesos que emergen durante el secado de gotas de biofluidos. En este Capítulo, reportamos el estudio de la formación de patrones en gotas colgantes de Albumina de Suero Bovino (BSA, por sus siglas en inglés) con diferente volumen inicial ($V = 3 - 12 \mu L$). Una gran diversidad de patrones surge en el interior de los depósitos: crucetas, crucetas con helechos, estructuras en forma de agujas y estaca de cristal en forma de prisma (unidas al anillo), agujas con helechos, agujas internas, agujas con agregado amorfo, cristales arborescentes ramificado, semi-estrellas de cristales, agregados amorfos, agujas ramificadas y estacas de cristales en forma de prisma. El perfil radial de intensidad y la compacidad muestran un incremento en la concentración de masa en la región central de los depósitos, mientras que la intensidad media de píxeles muestra un incremento en depósitos generados en gotas colgantes. A través del ángulo de contacto, el radio y la altura caracterizamos el secado de gotas. Encontramos que, sin importar el volumen inicial de gota, el área de contacto de gotas de proteína se mantiene constante a lo largo del proceso de secado, por lo que ellas siguen el modo de Radio de Contacto Constante (CCR).

5.1. Resultados

La Fig.5.1 muestra los depósitos formados a partir del secado de gotas sésiles y colgantes de proteínas. Encontramos una alta diversidad de estructuras en ambos grupos de depósitos.

Las gotas sésiles de proteínas a $V = 3\mu L$ producen crucetas, estructuras en forma de agujas (unidas al anillo de café), crucetas con helechos, agujas con helechos, agujas internas, cristales arborescentes ramificados, agujas con agregados amorfos, semi-estrellas de cristales, agujas ramificadas, estacas de cristales en forma de prismas y agregados amorfos; mientras que las gotas colgantes generan crucetas, estructuras en forma de agujas (unidas al anillo de café), crucetas con helechos, agujas con helechos, agujas internas y agregados amorfos.

Los patrones en depósitos de gotas sésiles a $V = 6\mu L$ están formados por crucetas, estructuras en forma de agujas (unidas al anillo de café), agujas internas, cristales arborescentes ramificados, semi-estrellas de cristales, agujas ramificadas, estacas de cristales en forma de prisma y agregados amorfos; mientras que los patrones en depósitos de gotas colgantes contienen crucetas, estructuras en forma de agujas (unidas al anillo de café), crucetas con helechos, agujas internas, cristales arborescentes ramificados, agujas con agregados amorfos y agregados amorfos.

En gotas secas sésiles a $V = 9\mu L$ se observan estructuras en forma de agujas, crucetas, semi-estrellas de cristales, estacas de cristales en forma de prisma y agregados amorfos; mientras que en gotas secas colgantes encontramos crucetas y estacas de cristal en forma de prisma (unidas al anillo), agujas con helechos, cristales arborescentes ramificados, agujas con agregado amorfo, semi-estrellas de cristales y agregados amorfos.

Las gotas sésiles a $V = 12\mu L$ promueven la formación de crucetas, estacas de cristal en forma de prisma (unidas al anillo), crucetas con helechos, cristales arborescentes ramificados, semi-estrellas de cristales, estacas de cristales en forma de prisma y agregados amorfos; mientras que en depósitos generados por gotas colgantes observamos crucetas, estructuras en forma de agujas y estacas de cristal en forma

de prisma (unidas al anillo), agujas con helechos, cristales arborescentes ramificados, agujas con agregado amorfo, semi-estrellas de cristales y agregados amorfos.

A altos volúmenes iniciales de gota sésil ($V = 15\mu L$) se induce la formación de crucetas, estructuras en forma de agujas (unidas al anillo), agujas con helechos, agujas internas, cristales arborescentes ramificados, agujas con agregado amorfo, semi-estrellas de cristales, estacas de cristales en forma de prisma y agregados amorfos; mientras que gotas colgantes producen crucetas, estructuras en forma de agujas (unidas al anillo), crucetas con helechos, agujas con helechos, agujas internas, cristales arborescentes ramificados, agujas con agregado amorfo, semi-estrellas de cristales y agregados amorfos.

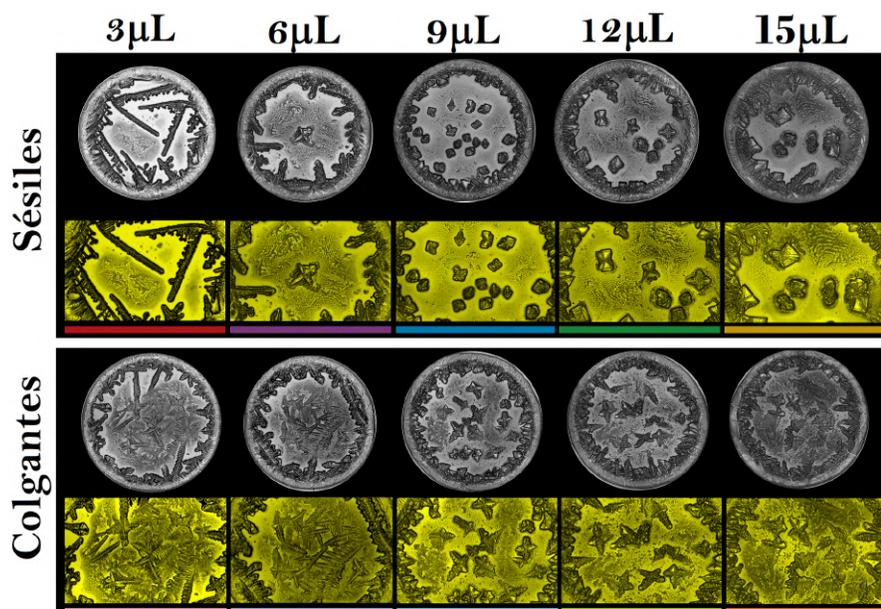


Figura 5.1: **Depósitos de proteínas generados con diferente volumen inicial de gota** Panel superior: Depósitos de gotas sésiles de proteínas. Panel Inferior: Depósitos de gotas colgantes de proteínas ($\phi=1wt\%$, $V= 3, 6, 9, 12$ y $15 \mu L$, $T=20 - 25^{\circ}C$, $HR= 25 - 35\%$). En promedio las gotas secas con volumen inicial de gota de 3, 6, 9, 12 y $15\mu L$ tienen un diámetro de 2.64, 3.44, 3.87, 4.47 y $5.05mm$, respectivamente. Las barras en color rojo, morado, azul, verde y amarillo tienen una longitud de 2.1, 2.86, 3.19, 3.55 y $4.07mm$, respectivamente. Las barras en color rosa, morado claro, celeste, verde claro y naranja tienen una longitud de 2.14, 2.93, 3.19, 3.69 y $4.09mm$, respectivamente.

El perfil radial de intensidad y la compacidad muestran que, sin importar el vo-

lumen inicial de gota, los depósitos muestran un incremento de masa en la región central de gotas colgantes, ver la Fig.5.2. La mayor diferencia en la distribución de masa de depósitos se observa a $V = 3\mu L$, mientras que la menor se presenta a $V = 12\mu L$. Los picos prominentes corresponden a la formación del anillo de café, el cual no se inhibe en gotas colgantes. La Fig.5.3 muestra que los valores medios de la intensidad de pixeles incrementan significativamente en depósitos generados por gotas colgantes.

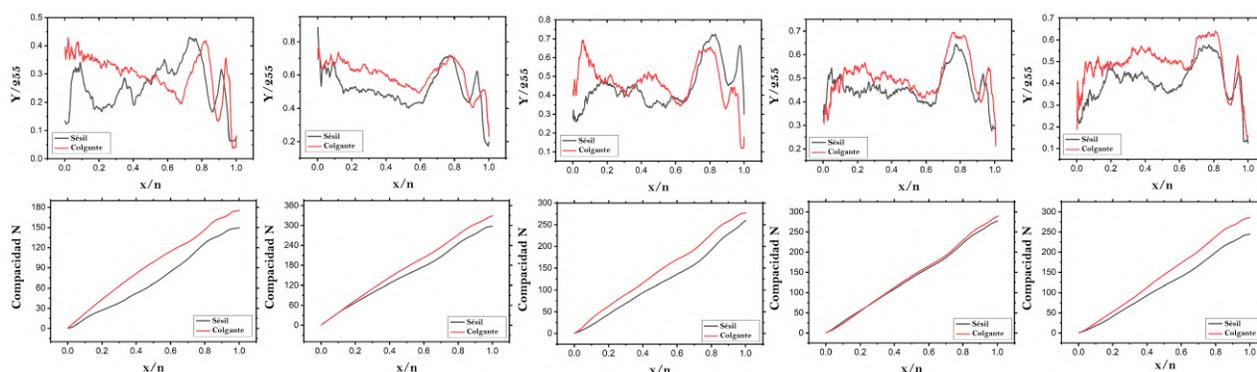


Figura 5.2: **Perfil radial de intensidad y la compactad.** Perfil radial de intensidad (Panel superior) y la compactad (Panel Inferior) como función del volumen inicial de gota de gotas sésiles y colgantes de proteínas ($\phi=1wt\%$, $V= 3, 6, 9, 12$ y $15\mu L$, $T=20 - 25^\circ C$, $HR= 25 - 35\%$).

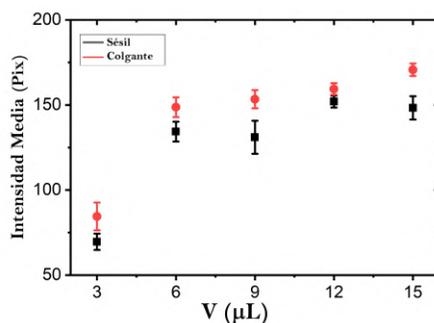


Figura 5.3: **Valores medios de la intensidad de pixeles.** La media de la intensidad de pixeles como función del volumen inicial de gota para depósitos de proteínas ($\phi=1wt\%$, $V= 3, 6, 9, 12$ y $15\mu L$, $T=20 - 25^\circ C$, $HR= 25 - 35\%$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

Ángulo de contacto

La Fig. 5.4 muestra que el ángulo de contacto (θ) decrece en función del tiempo de secado (t/t_0). Esta tendencia se preserva en cada uno de los volúmenes iniciales ($3\mu L$, $6\mu L$, $9\mu L$, $12\mu L$ y $15\mu L$) de las gotas colgantes (ángulo de inclinación de 180°), para depósitos de la solución de BSA($1wt\%$) y NaCl($1wt\%$). Se observa que el valor mayor de ángulo de contacto inicial (64°) se da con un volumen inicial de gota de ($12\mu L$), mientras que el menor (51.5°) se encuentra con un volumen inicial de gota de $3\mu L$. Por otro lado, el mayor valor de ángulo de contacto final (18.5°) se da con un volumen inicial de gota de $3\mu L$, mientras que el valor de ángulo final menor (10.5°) se encuentra con un volumen inicial de gota de $15\mu L$.

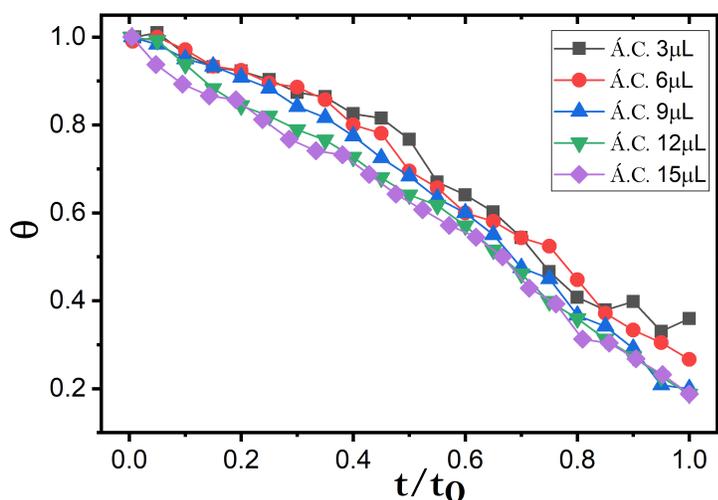


Figura 5.4: **Ángulo de contacto (θ)**. Ángulo de contacto como función del tiempo de gotas de colgantes de proteínas ($\phi=1wt\%$, $V= 3, 6, 9, 12$ y $15\mu L$, $T=20 - 25^\circ C$, $HR= 25 - 35\%$).

Altura

En la Fig.5.5 se muestra la dinámica de la altura (h/h_0) de las gotas colgantes, con diferentes volúmenes iniciales ($3\mu L$, $6\mu L$, $9\mu L$, $12\mu L$ y $15\mu L$); este parámetro decrece como función del tiempo de secado (t/t_0), para cada volumen inicial de gota de una solución de BSA ($1wt\%$) y NaCl ($1wt\%$).

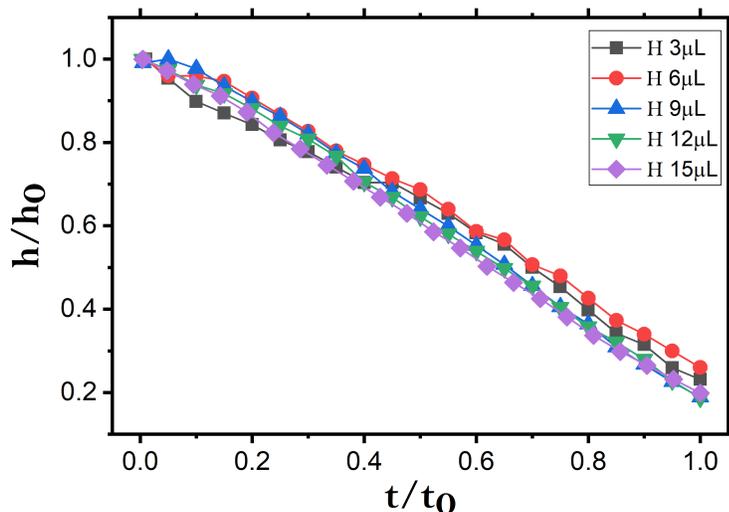


Figura 5.5: **Altura.** Altura como función del tiempo de gotas de colgantes de proteínas ($\phi=1wt\%$, $V= 3, 6, 9, 12$ y $15\mu L$, $T=20 - 25^\circ C$, $HR= 25 - 35\%$).

Diámetro

En la Fig.5.6 se observa que el diámetro (d/d_0) de las gotas colgantes se mantienen constante como función del tiempo total de secado (t/t_0), para todos los volúmenes iniciales de gota ($3\mu L$, $6\mu L$, $9\mu L$, $12\mu L$ y $15\mu L$), de depósitos colgantes (a un ángulo de inclinación de 180° , de la solución de proteína (BSA $1wt\%$) y sal (NaCl $1wt\%$).

Ángulos de contacto iniciales

En la Fig. 5.7 se muestra la dinámica de los ángulos iniciales de gota (θ_i) como función del volumen inicial de gota colgante de proteínas (V), para gotas secas con una configuración colgante (ángulo de inclinación de 180°), de una solución de BSA ($1wt\%$) y NaCl ($1wt\%$). El valor mayor de ángulo de contacto inicial (62°) se presenta a un volumen inicial de gota de $12\mu L$. Mientras que el valor mínimo de ángulo de contacto inicial (50.5°) se da a un volumen inicial de gota de $15\mu L$.

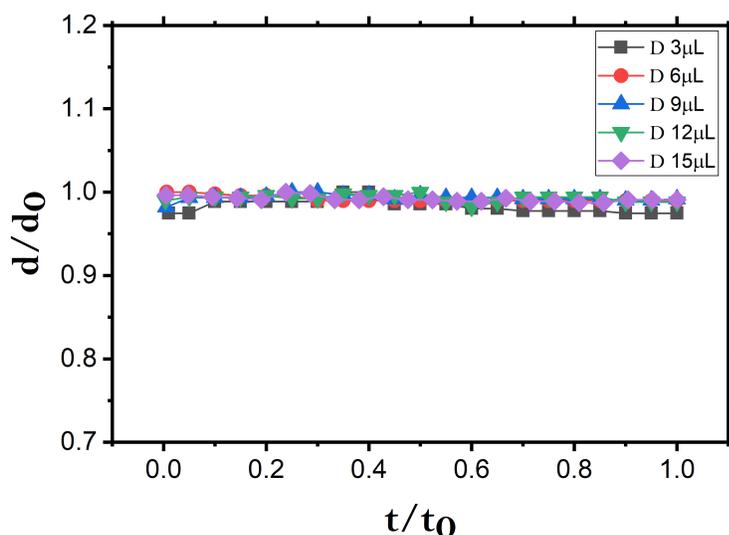


Figura 5.6: **Diámetro.** Diámetro como función del tiempo de gotas de colgantes de proteínas ($\phi=1wt\%$, $V= 3, 6, 9, 12$ y $15\mu L$, $T=20 - 25^{\circ}C$, $HR= 25 - 35\%$).

Tiempo de vida de gota

La Fig.5.8 muestra el tiempo de vida de las gotas colgantes como función del volumen inicial de gota, para depósitos de una solución de BSA a una concentración del $1wt\%$ y NaCl con una concentración de $1wt\%$. El tiempo promedio máximo de secado (3376.6 segundos) se presenta a un volumen inicial de gota de $15\mu L$, mientras que el tiempo promedio mínimo de secado (1475 segundos) se da a un volumen inicial de gota de $3\mu L$.

Para escudriñar las diferencias morfológicas dentro depósitos de gotas sésiles y colgantes identificamos las estructuras que anidan en los patrones de gotas secas y medimos sus dimensiones. Encontramos una alta diversidad de estructuras tales como: crucetas, crucetas con helechos, estructuras en forma de agujas y estacas de cristal en forma de prisma (unidas al anillo), agujas con helechos, agujas internas, agujas con agregado amorfo, cristales arborescentes ramificados, semi-estrellas de cristales, agregados amorfos, agujas ramificadas y estacas de cristales en forma de prisma.

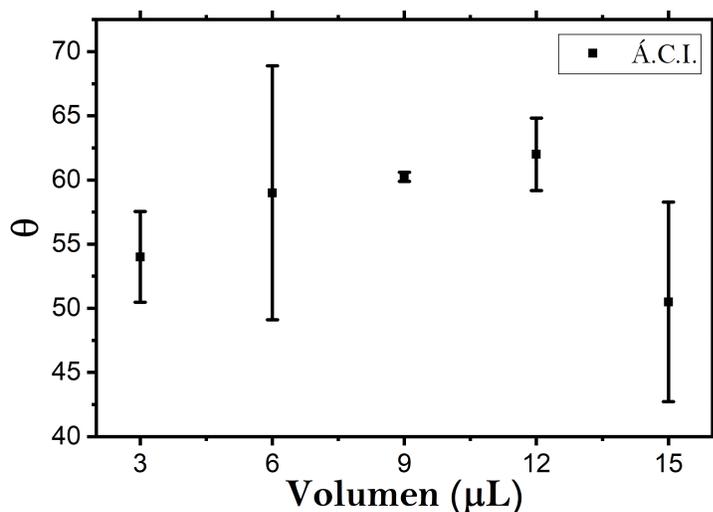


Figura 5.7: **Ángulos de contacto inicial (θ_i)**. θ_i como función del volumen inicial de gota colgante de proteínas ($\phi = 1wt\%$, $V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu L$, $T = 20 - 25^\circ C$, $HR = 25 - 35\%$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 3$.

1. Crucetas

Las crucetas son agregados que se forman en el secado de gotas en ambas configuraciones. En el caso de las gotas colgantes, al incrementar el volumen inicial de gota ($6-12\mu L$), el número de estos agregados en el depósito presenta un aumento. Sin embargo, a un volumen muy alto ($15\mu L$) el número de cruces disminuye, debido a que se forman otro tipo de agregados. Para los depósitos secados en una configuración sésil, el número de crucetas incrementa en relación con el volumen inicial de gota. En la Fig. 5.9a se muestra que las crucetas están conformadas por un eje mayor (color dorado) y uno menor (color amarillo claro). En general, en gotas sésiles los ejes de las crucetas son similares.

La Fig. 5.9b muestra, en negro, el eje mayor de las crucetas de las gotas colgantes en relación con el eje mayor de las crucetas de las gotas sésiles, L_{cr} , como función del volumen inicial de gota, para depósitos de solución de BSA ($1wt\%$) y NaCl ($1wt\%$). El valor máximo de esta relación (1.34766) se alcanza en $V = 15\mu L$, mientras que el valor mínimo de esta relación (0.73244) se alcanza a $V = 3\mu L$. En rojo se muestra el cociente entre el eje menor de las crucetas de las gotas colgantes y el eje menor de

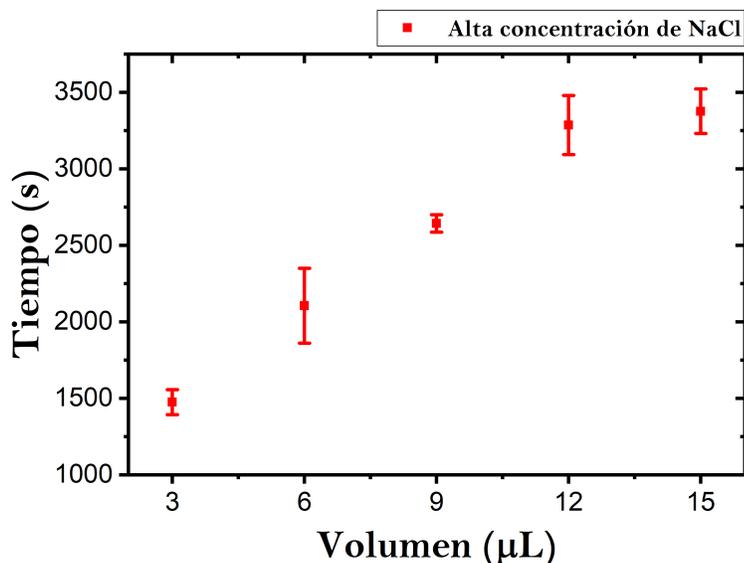


Figura 5.8: **Tiempo de secado.** Tiempo de vida seco de la gota colgante de proteína como función del volumen inicial de gota ($\phi = 1wt\%$, $V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu L$, $T = 20 - 25^\circ C$, $HR = 25 - 35\%$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 3$.

las gotas sésiles, A_{cr} , como función del volumen inicial de gota, para soluciones de BSA ($1wt\%$) y NaCl ($1wt\%$). El valor máximo de este cociente (1.8127) se obtiene a $V = 6\mu L$, mientras que el valor mínimo (0.79397) se alcanza en $V = 3\mu L$. Observamos que no hay diferencias significativas entre los diferentes valores de las relaciones de las dimensiones de las crucetas, para esta concentración en todos los volúmenes iniciales de gota.

2. Crucetas con helechos

En la Fig. 5.10a se muestra que este agregado está conformado por una estructura cristalina en forma cruz con un agregado ramificado en uno de sus ejes (los ejes mayores se observan en color dorado, mientras que los ejes menores se remarcan en color amarillo claro). Este agregado tiene una mayor frecuencia de aparición en gotas colgantes que en gotas sésiles. La longitud de los ejes no cambia abruptamente en relación con el incremento del volumen. No obstante, la longitud del helecho tiende a incrementar a medida que se aumenta el volumen inicial de gota.

La Fig. 5.10b muestra, en negro, el cociente entre el eje mayor de las crucetas de los depósitos colgantes y el eje mayor de las crucetas formadas en los depósitos sésiles, L_{rH} , como función del volumen inicial de gota. El valor máximo de este cociente (14.53433) se presenta en $V = 6\mu L$. Mientras que el valor mínimo de esta relación (0) se alcanza en $V = 9\mu L$. En color azul se muestra el cociente del eje mayor de la estructura ramificada de las crucetas en los depósitos colgantes con el eje mayor del helecho de las crucetas en las gotas secas sésiles. El valor máximo (17.54468) se alcanzó en $V = 6\mu L$ y el valor mínimo (0) se obtuvo en $V = 9\mu L$. En rojo se muestra el cociente entre el eje menor de las crucetas en los depósitos colgantes y el eje menor de las estructuras de los depósitos sésiles, A_{rH} . El valor máximo (17.97568) se alcanza en $V = 6\mu L$. Mientras que el valor mínimo (0) se logra en $V = 9\mu L$. Se observa que no hay diferencias significativas entre los distintos valores de las dimensiones de este tipo de agregados formados en gotas secas de solución de BSA (1wt %) y NaCl (1wt %) para todos los volúmenes iniciales de gota.

3. Estructuras en forma de agujas y estaca de cristal en forma de prisma (unidas al anillo)

Las estructuras en forma de agujas y estacas de cristal en forma de prisma surgen del anillo de café. Las estructuras en forma de aguja son largas con un crecimiento orientado al interior del depósito (ver la Fig. 5.11b, en color dorado se indica el largo y en color amarillo claro el ancho de este agregado). Las estructuras con forma de prisma son estacas cortas y más anchas (ver la Fig. 5.11a), en color dorado se indica el largo y en color amarillo claro el ancho de este agregado). En gotas colgantes las estructuras en forma de aguja son predominantes. Por otro lado, en gotas sésiles las estructuras en forma de estaca de cristal son predominantes. Las estructuras en forma de aguja son características de gotas con un volumen de $3 - 9\mu L$. Mientras que gotas secas con volumen mayor a $9\mu L$ surgen las estacas de cristal en forma de prisma. Debemos remarcar que solo se contabilizaron agregados cuya longitud es mayor al grosor del anillo de café.

En la Fig.5.11 c) se presentan, en negro, el cociente entre el eje mayor de las

agujas en las gotas colgantes y el eje mayor de las agujas formadas en los depósitos sésiles, L_{AgE} , en función del volumen inicial de gota, para gotas secas de una solución de BSA (1wt %) y NaCl (1wt %). El valor máximo (1.24821) de esta cantidad se alcanza en $V = 9\mu L$. En cuanto al valor mínimo (0.83701) se logra a $V = 3\mu L$ de solución. En contraste, los puntos en color rojo representan el cociente entre el eje menor de las agujas y prismas en los depósitos colgantes y las estructuras formadas en las gotas sésiles, A_{AgE} . El valor máximo (0.92321) de esta razón se obtiene en $V = 9\mu L$, en cambio, el valor mínimo (0.79307) se observa a $V = 15\mu L$. Se observa que no hay diferencias significativas entre los distintos valores de las dimensiones de este tipo de agregado, para las concentraciones de la solución para todos los volúmenes iniciales de gota.

4. Agujas con helechos

La estructura en forma de agujas con helechos, que emerge junto al anillo de café, está compuesto por una estructura en forma de aguja con la particularidad de que la punta se prolonga en un patrón arborescente ramificado (en la Fig. 5.12a se indica con color dorado el eje mayor y en color amarillo claro el eje menor de estas estructuras). Este tipo de agregados son más frecuentes en gotas colgantes, el tamaño del agregado incrementa con el volumen. En las gotas sésiles disminuye su aparición.

En la Fig. 5.12b se observan, en negro, el cociente del eje mayor de la aguja de los depósitos colgantes y el correspondiente de las agujas formadas en las gotas secas sésiles, L_{gH} , como función del volumen inicial de gota (1wt % y NaCl a 1wt % de concentración). El valor máximo de esta relación (5.74305) se alcanza en $V = 3\mu L$ de la solución. Mientras que el valor mínimo (0) se logra en un rango de volumen de $6 - 12\mu L$. Los puntos en azul muestran el cociente entre el eje mayor de los helechos formados en las gotas colgantes y la correspondiente estructura encontrada en los depósitos sésiles, logrando un valor máximo (5.74305) a un volumen de $3\mu L$. Mientras que el valor mínimo de esta razón (0) se alcanza a un rango de volumen inicial de gota de $6 - 12\mu L$ de la solución de BSA (1wt %) y NaCl (1wt %). En color rojo, se muestra el cociente entre el eje menor de las agujas en los depósitos colgantes y el

eje menor de las agujas de las gotas secas sésiles, A_{gH} . La cantidad máxima (5.43265) se obtiene a un volumen de $3\mu L$, mientras que el valor mínimo (0) se obtiene en un rango de $6 - 12\mu L$. Se observa que no hay diferencias significativas entre los valores de las dimensiones de las estructuras en la configuración colgante como razón de las medidas del agregado en las gotas sésiles, de una solución a $1wt\%$ de BSA y $1wt\%$ de NaCl, para todos los volúmenes iniciales de gota.

5. Agujas internas

Las agujas internas son estructuras cristalinas que no están conectadas al anillo de café. Este tipo de estructuras aparecen en el interior del depósito en ambas configuraciones de secado (ver la Fig. 5.13a-b, en color dorado se indica el eje mayor y en color amarillo claro se indica el eje menor de este tipo de agregados). En gotas colgantes el tamaño de la frecuencia de aparición de esta estructura es mayor que en gotas sésiles. En la Fig. 5.13c se ilustra, en negro, el cociente entre el eje mayor de las agujas internas formadas durante el proceso de secado de las gotas colgantes en relación de las dimensiones de los agregados en los depósitos sésiles, L_{Agint} , para gotas de una solución de BSA ($1wt\%$) y NaCl ($1wt\%$). El valor máximo de este cociente (5.22687) se alcanza en $V = 12\mu L$. El valor mínimo (0) se observa en $V = 9\mu L$ de solución. Por otro lado, en color rojo, se muestran los valores del cociente entre el eje menor de las agujas de los depósitos colgantes y el eje menor de este tipo de estructuras formadas en las gotas sésiles A_{Agint} . El valor máximo de este valor (4.7256) se alcanza en $V = 12\mu L$. Mientras que el valor mínimo (0) se logra en $V = 9\mu L$. Se observa que no hay diferencias significativas entre los valores de las longitudes de los agregados, para todos los volúmenes iniciales de gota de la solución de BSA ($1wt\%$) y NaCl ($1wt\%$).

6. Agujas con agregado amorfo

Las estructuras en forma de aguja con agregado amorfo están conformadas por un agregado amorfo que surge en el extremo de un cristal en forma de aguja (ver la Fig.

5.14a-b; en color dorado se indica el largo y en color amarillo se indica el ancho de este tipo de agregados). En la configuración colgante la longitud del cristal en forma de aguja incrementa con el aumento del volumen inicial de gota. Para la configuración sésil, la frecuencia de aparición de este agregado disminuye notablemente.

La Fig. 5.14c muestra, en negro, el cociente entre el eje mayor de agujas con agregado amorfo formados en gotas colgantes y el eje mayor de las estructuras en los depósitos sésiles, L_{AgAA} , como función del volumen inicial de gota, de una solución a 1wt % de BSA y 1wt % de NaCl. El valor máximo de esta relación (6.5799) se logra en $V = 15\mu L$, mientras que el valor mínimo (0) se alcanza en un rango de volumen ($3-6\mu L$). En color rojo, se observa el cociente entre el eje menor de este agregado en las gotas colgantes en relación del eje menor del agregado en los depósitos sésiles, A_{AgAA} , como función del volumen inicial de gota. El valor máximo de este cociente (4.29791) se alcanza en $V = 12\mu L$. Mientras que el valor mínimo en un rango de volumen de $3-6\mu L$ de la solución de BSA (1wt %) y NaCl (1wt %). Se observa que no hay diferencias significativas entre los distintos valores de las dimensiones de los agregados en gotas colgantes en relación con las estructuras formadas en las gotas sésiles, de la solución de BSA (1wt %) y NaCl (1wt %), para todos los volúmenes iniciales de gota.

7. Cristales arborescentes ramificados

Este tipo de cristales arborescentes ramificados se asemejan a hojas de helecho u hojas de palmera, ver la Fig. 5.15a. Estos cristales se conforman por cuatro ejes o tallos bien definidos que surgen de un punto central (en la Fig. 5.15a se indica en color dorado el eje mayor y en color amarillo claro el eje menor de este tipo de agregados). Los ejes son perpendiculares y forman un ángulo de 90° (aproximadamente). En cada eje surgen ramificaciones con distintas longitudes, formando así una estructura arborescente. La frecuencia de aparición de esta estructura es mayor en las gotas colgantes, mientras que en las gotas sésiles son escasas. El tamaño de este tipo de cristales no varía en ambas configuraciones de secado y no depende del volumen de gota. No obstante, la frecuencia de aparición de esta estructura incrementa con el

volumen inicial de gota. En la Fig. 5.15b se muestra, en negro, el cociente entre el eje mayor del agregado formado en las gotas colgantes, y el largo del eje mayor del agregado en los depósitos sésiles, L_{CAR} , como función del volumen inicial de gota, de una solución de BSA a $1wt\%$ y NaCl a una concentración de $1wt\%$. A un volumen de $6\mu L$ se encuentra el valor máximo de esta relación (2.44482), mientras que el valor mínimo (0) se alcanza en 3 y $9\mu L$. De igual manera, en rojo, se muestran el cociente entre el eje menor este agregado en las gotas colgantes y el eje menor de la estructura en las gotas sésiles, A_{CAR} . El valor máximo (4.43366) se alcanza en $V = 6\mu L$, mientras que el valor mínimo (0) se alcanza en 3 y $9\mu L$ de la solución. Se observa que no hay diferencias significativas de la relación de las dimensiones de este tipo de estructuras formadas en sus respectivas configuraciones, de gotas secas de una solución de BSA ($1wt\%$) y NaCl ($1wt\%$), para todos los volúmenes iniciales de gota.

8. Semi-estrellas de cristales

Esta estructura está conformada con un eje que sobresale, que da lugar a un cristal en forma de semi-estrella (en la Fig. 5.16a se indica en color dorado el eje mayor y en color amarillo claro el eje menor de este tipo de agregados). En gotas colgantes, con un volumen inicial de $9 - 15\mu L$, el tamaño del agregado y su frecuencia de aparición es mayor. En cambio, en gotas sésiles la dimensión del agregado no varía abruptamente, aunque la frecuencia de aparición incrementa con el volumen. Debemos remarcar que el tamaño de este agregado es mayor en depósitos de gotas sésiles.

La Fig. 5.16b muestra, en negro, el cociente entre el eje mayor de este tipo de agregado en las gotas colgantes y el eje mayor de los agregados en los depósitos en las gotas sésiles, L_{S-E} , como función del volumen inicial de gota. Para esta razón el máximo valor (0.89199) se alcanza en $V = 15\mu L$ de solución, mientras que el valor mínimo (0) se obtiene para 3 y $6\mu L$ de solución. En contraste, los puntos en color rojo representan el cociente entre el eje menor de este tipo de estructuras presentes en las gotas colgantes y sésiles, A_{S-E} . El valor máximo (0.20693) de esta razón se da en $V = 12\mu L$, mientras que el valor mínimo (0) se alcanza en un rango de volumen

de $3 - 6\mu L$ de la solución de BSA ($1wt\%$) y NaCl ($1wt\%$). Se observa que no hay diferencias significativas entre los distintos valores de las dimensiones del agregado en la configuración colgante en relación con el tamaño de los agregados formados durante el secado de las gotas sésiles, de una solución con una concentración de BSA a $1wt\%$ y NaCl A $1wt\%$, para cada valor del volumen inicial de gota.

9. Agujas ramificadas

Esta estructura está compuesta por un cristal en forma de aguja y una (o varias) ramificaciones laterales, que surgen de la estructura principal (ver la Fig. 5.17a se señala en rojo la estructura principal y en azul las ramificaciones; en color dorado se indica el eje mayor y con color amarillo claro se indica el eje menor de estas estructuras). Este tipo de cristal únicamente aparece en depósitos de gotas sésiles. La frecuencia de aparición es mayor en depósitos de volumen pequeño ($3 - 6\mu L$).

En la Fig. 5.17b, en color azul, se muestra el valor promedio de la longitud del eje mayor de las ramas, L_{AgR} , como función del volumen inicial de gota. El valor máximo del largo de las ramas (0.11395) se alcanza en $V = 3\mu L$, mientras que el valor mínimo (0) se alcanza en $V = 9\mu L$ y $V = 15\mu L$ de la solución. Los puntos en color morado representan la longitud promedio del eje menor de esta estructura, A_{AgR} ; presenta su máximo valor (0.02247) en $V = 3\mu L$ y el mínimo (0) en $V = 9\mu L$ y $V = 15\mu L$. Se observa que no hay diferencias significativas entre los valores de las dimensiones de este agregado, de una solución de BSA a $1wt\%$ de concentración con NaCl a $1wt\%$ de concentración, para todos los volúmenes iniciales de gota.

10. Estacas de cristales en forma de prisma.

Estos agregados son grandes y aparecen en el interior del depósito. Es posible medir la dimensión de estos agregados a través de los ejes que lo conforman (ver la Fig. 5.18a, en color morado se señala el agregado; en color dorado se indica el eje mayor y en color crema se indica el eje menor de esta estructura). Este tipo de agregado únicamente aparece en depósitos de gotas sésiles. El tamaño y la frecuencia

de aparición de esta estructura incrementa con el volumen.

La Fig. 5.18b muestra el valor promedio de la longitud del eje mayor de este tipo de agregados en, L_{ECFP} , como función del volumen inicial de gota. El valor máximo (0.08101) se alcanza en $V = 12\mu L$, mientras que el valor mínimo (0.00891) se logra a $V = 6\mu L$. Por otro lado, en verde, se muestra el valor promedio de la longitud del eje menor de este tipo de agregados, A_{ECFP} . El valor mayor (0.06729) se logra en $V = 9\mu L$, mientras que el valor mínimo (0.00851) se alcanza en $V = 6\mu L$.

11. Agregados amorfos.

Este tipo de estructuras son las más pequeñas, sin forma definida y, por tanto, no es posible medir una característica morfológica específica (ver la Fig. 5.19a, en color rosa se señala este tipo de estructuras). En las gotas colgantes esta estructura es escasa pero su frecuencia de aparición aumenta ligeramente en función del volumen inicial de gota. En las gotas sésiles la frecuencia de aparición es mayor y no hay una relación clara entre la frecuencia de aparición y el volumen.

En la Fig. 5.19b se muestra el cociente entre el número promedio de agregados amorfos en los depósitos colgantes y el número promedio de estas estructuras formadas en las gotas secas sésiles, N_{NN} , como función del volumen inicial de gota. El valor máximo de esta razón (1.66667) se alcanza en $V = 12\mu L$, mientras que el valor mínimo de este cociente (0.2963) se logra en $V = 6\mu L$. Se observa que en general el número de agregados es menor en depósitos colgantes.

Un panorama de general de las estructuras se muestra en la Fig. 5.20.

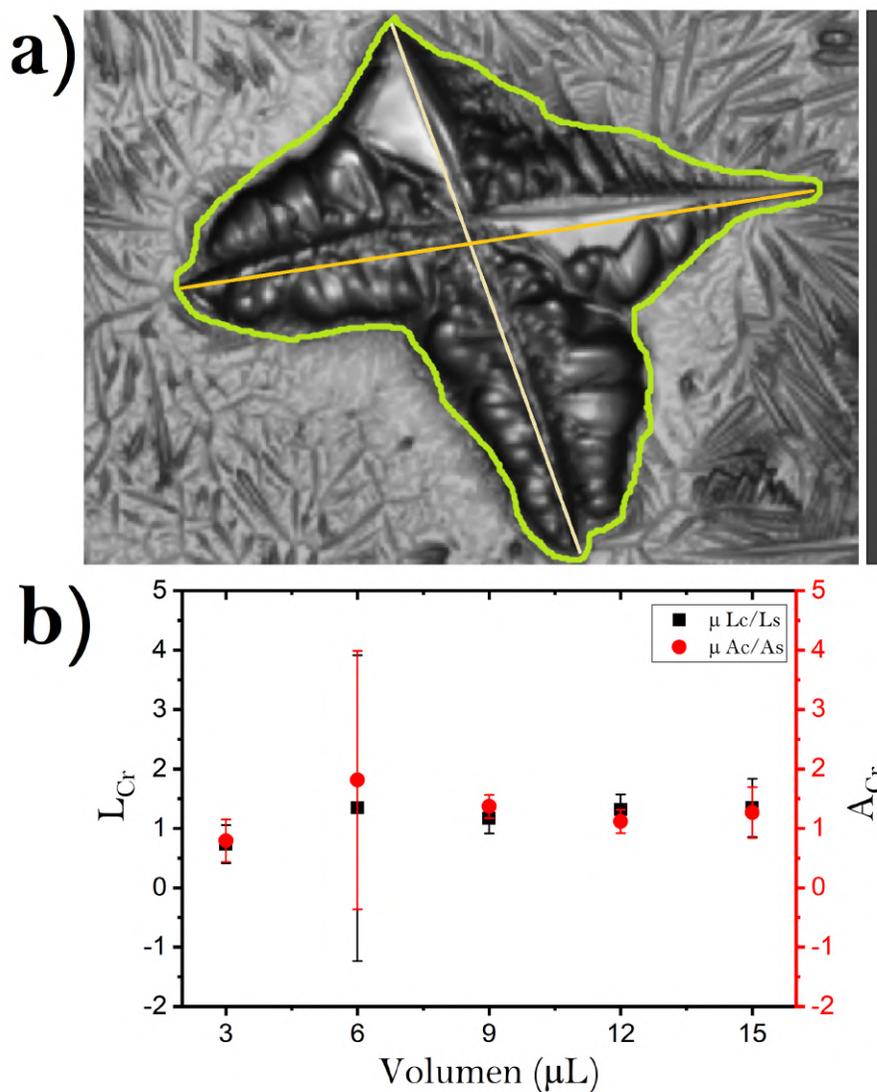


Figura 5.9: **Crucetas** a) Estructura de crucetas (verde) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $HR = 25 - 35\%$ y $T = 20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. La barra en color negro tiene una longitud de 0.54mm . b) Longitud de Ejes mayor (negro) y menor (rojo) de crucetas como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

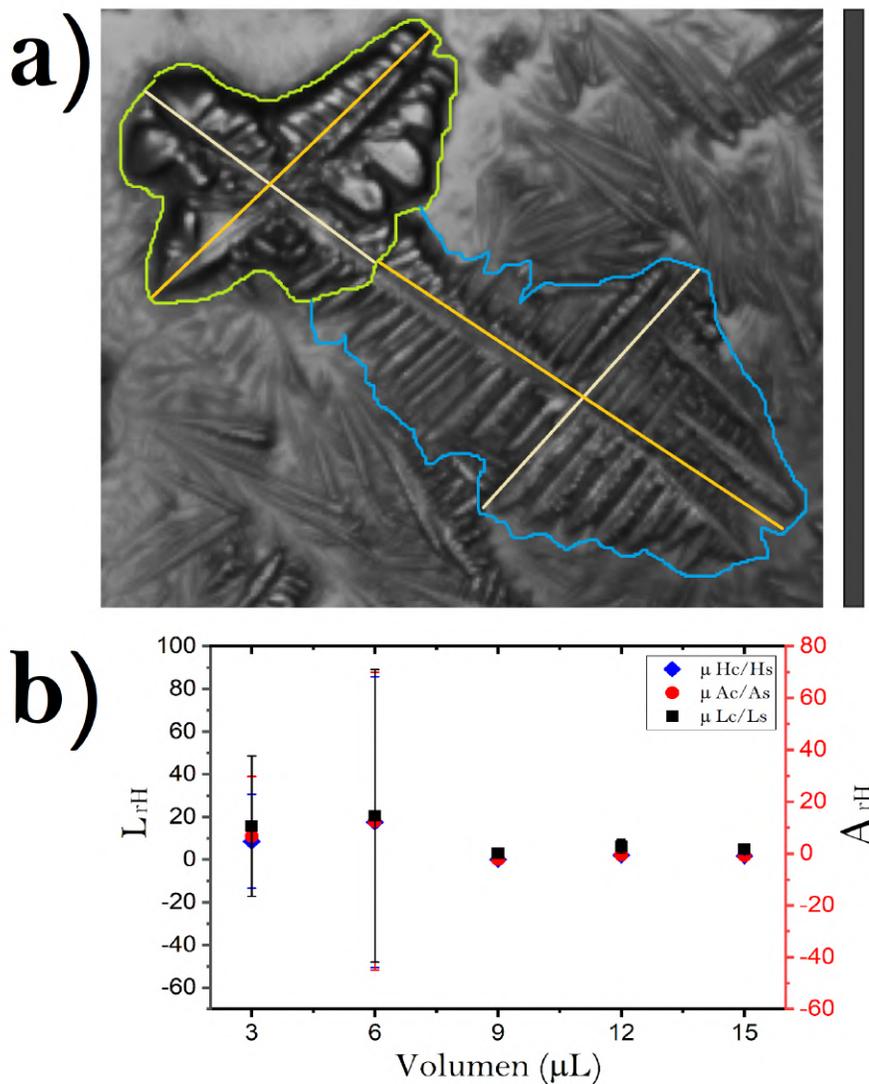


Figura 5.10: **Crucetas con helechos** a) Estructura de crucetas (verde) con helechos (celeste) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $HR = 25 - 35\%$ y $T = 20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. La barra en color negro tiene una longitud de 0.62mm . b) Longitud del helecho (azul), longitud de Ejes mayor (negro) y menor (rojo) de crucetas como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

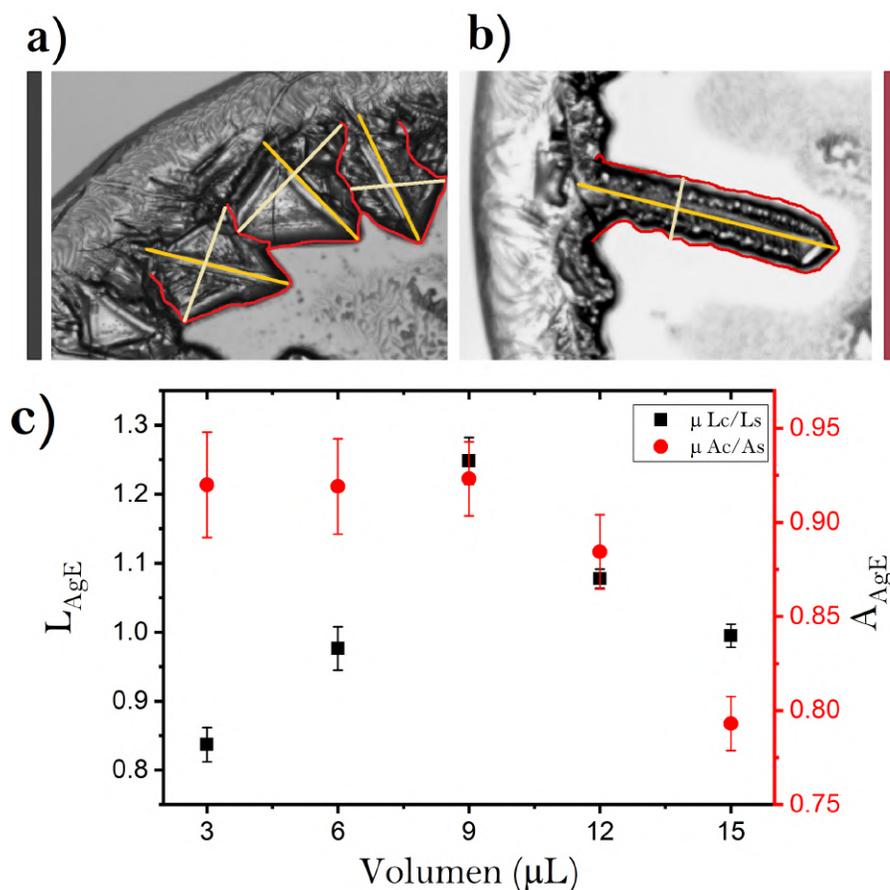


Figura 5.11: **Estructuras en forma de agujas y estaca de cristal en forma de prisma (unidas al anillo).** a) y b) Estructuras en forma de agujas y estaca de cristal en forma de prisma (rojo) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $HR = 25 - 35\%$ y $T = 20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. Las barras en color negro y rojo tienen una longitud de 0.53 y 1.38mm , respectivamente. c) Longitud relativa de ejes mayor (negro) y menor (rojo) de estructuras en forma de agujas y estaca de cristal en forma de prisma como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

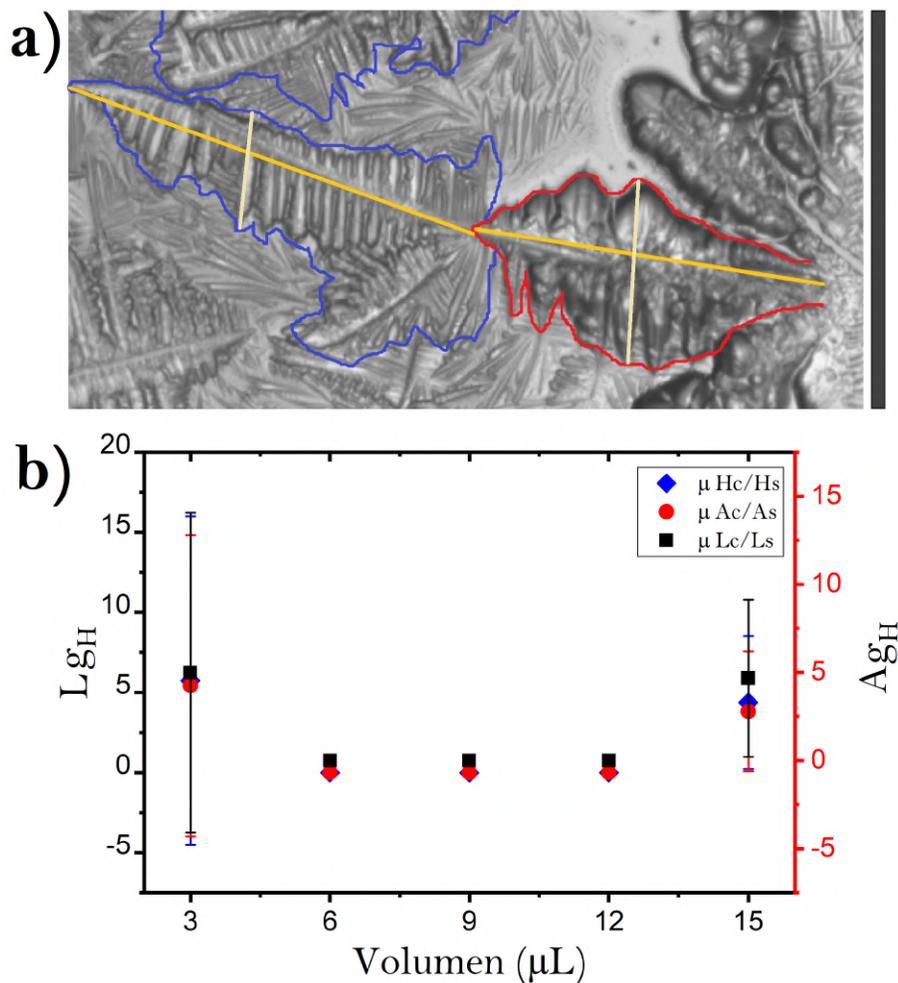


Figura 5.12: **Agujas con helechos.** a) Estructuras en forma de agujas (rojo) con helechos (azul) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu L$) con $HR = 25-35\%$ y $T = 20-25^\circ C$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. La barra en color negro tienen una longitud de $1.28mm$. b) Longitud del helecho (azul), longitud de Ejes mayor (negro) y menor (rojo) de estructuras en forma de agujas como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

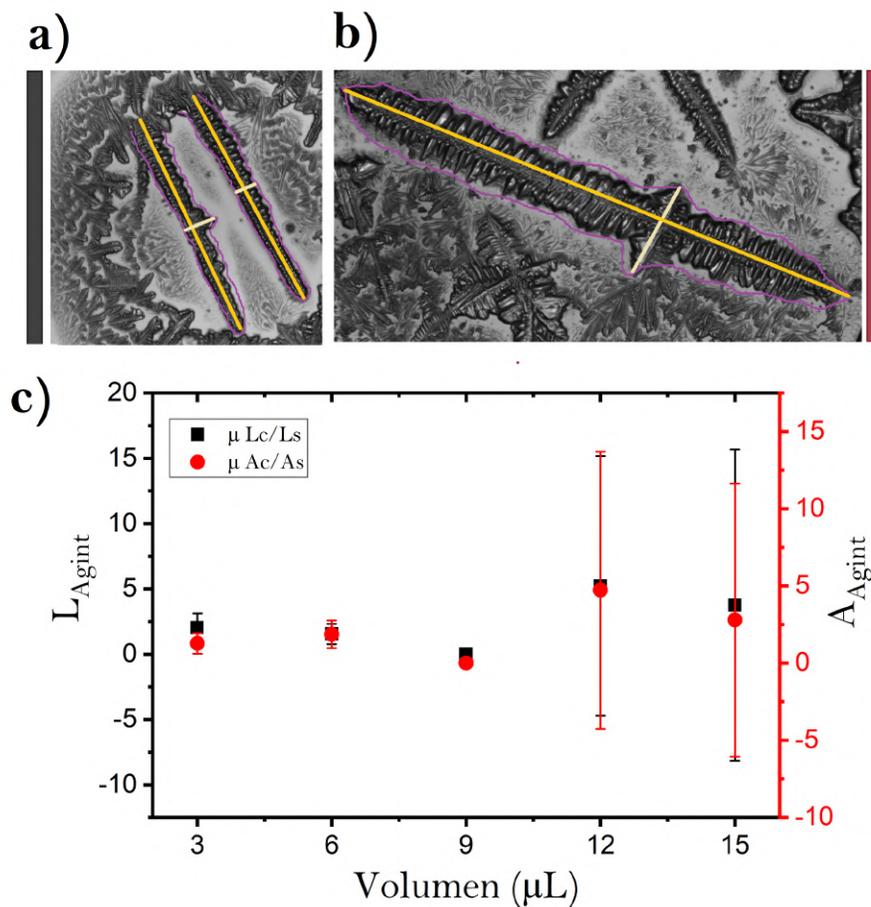


Figura 5.13: **Agujas internas.** a) y b) Estructuras en forma de agujas internas (morado) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $HR = 25 - 35\%$ y $T = 20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. Las barras en color negro y rojo tienen una longitud de 1.18 y 1.15mm , respectivamente. c) Longitud relativa de ejes mayor (negro) y menor (rojo) de estructuras en forma de agujas internas como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

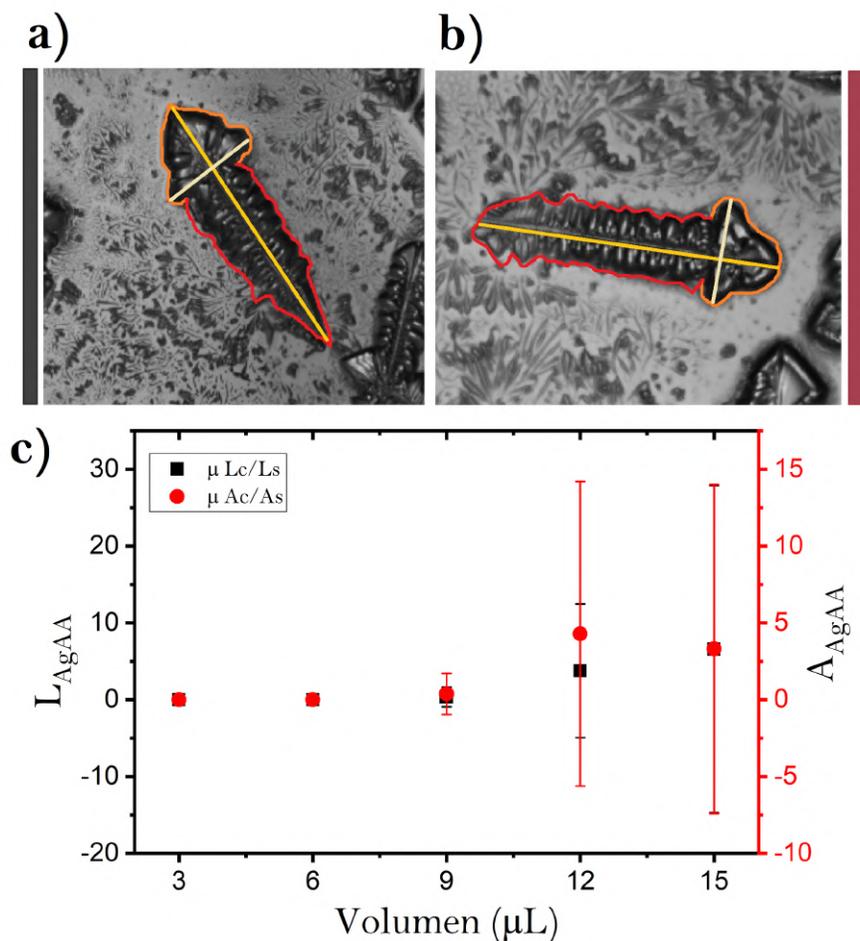


Figura 5.14: **Agujas con agregado amorfo.** a) y b) Estructuras en forma de agujas (rojo) con agregado amorfo (naranja) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $HR = 25 - 35\%$ y $T = 20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. Las barras en color negro y rojo tienen una longitud de 0.85 y 0.93mm , respectivamente. c) Longitud relativa de ejes mayor (negro) y menor (rojo) de estructuras en forma de agujas con agregado amorfo como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

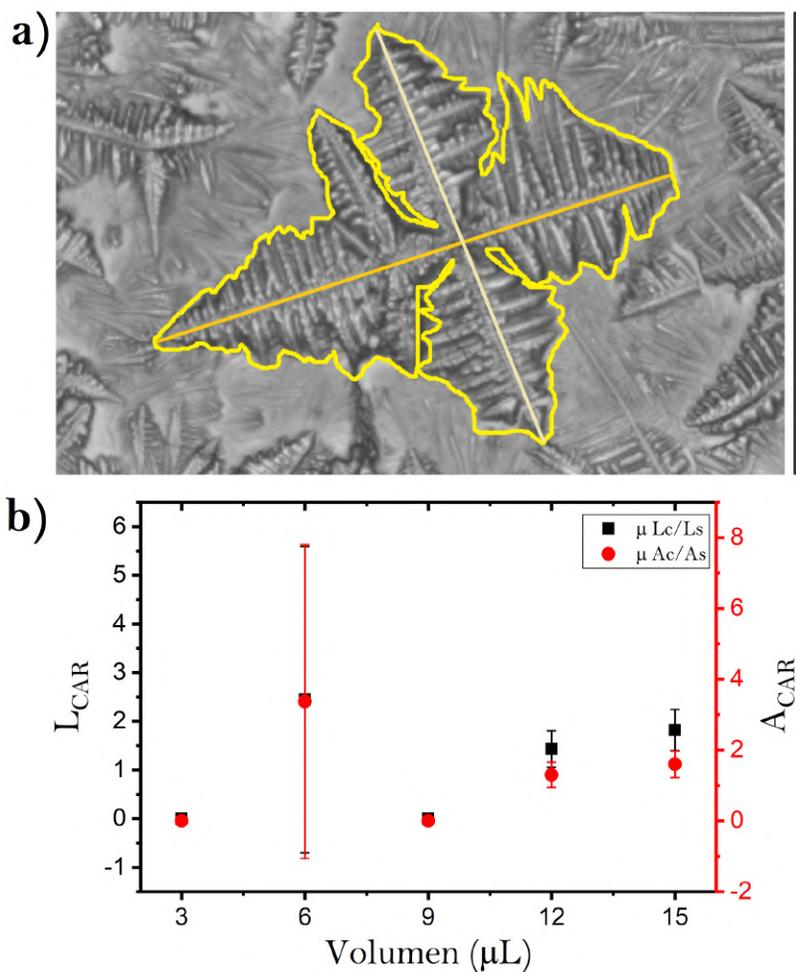


Figura 5.15: **Cristales arborescentes ramificados.** a) Cristales arborescentes ramificados (amarillo) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $HR = 25 - 35\%$ y $T = 20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. La barra en color negro tiene una longitud de 0.90mm . b) Longitud relativa de ejes mayor (negro) y menor (rojo) de cristales arborescentes ramificados como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

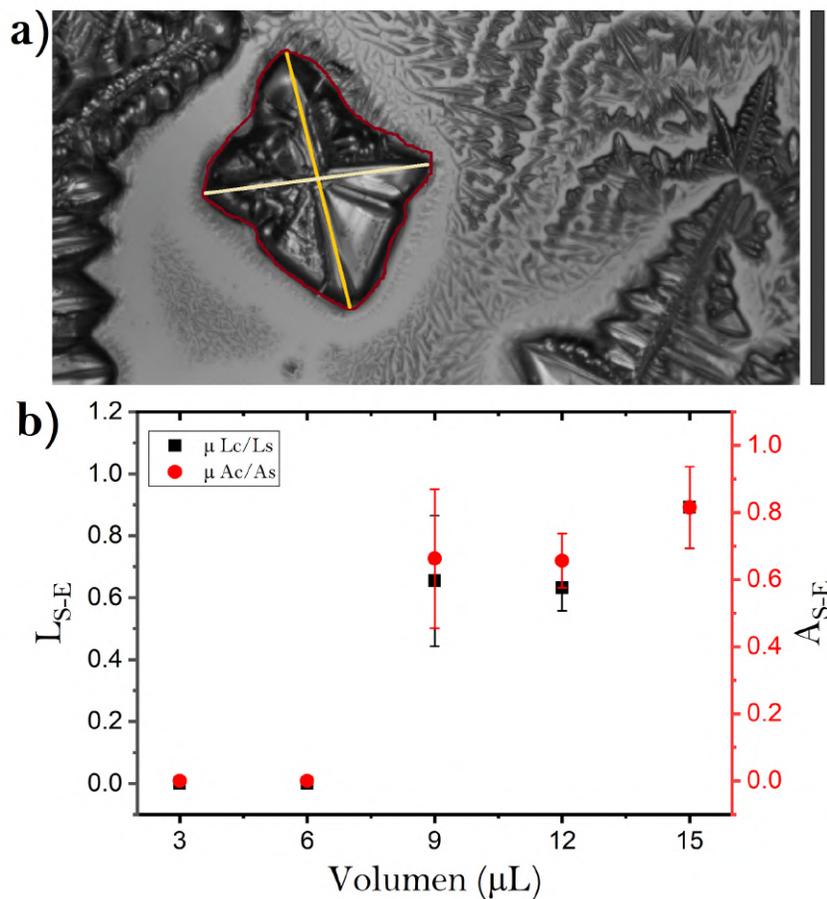


Figura 5.16: **Semi-estrellas de cristales.** a) Semi-estrellas de cristales (rojo) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $HR = 25 - 35\%$ y $T = 20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. La barra en color negro tiene una longitud de 1.69mm . b) Longitud relativa de ejes mayor (negro) y menor (rojo) de semi-estrellas de cristales como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

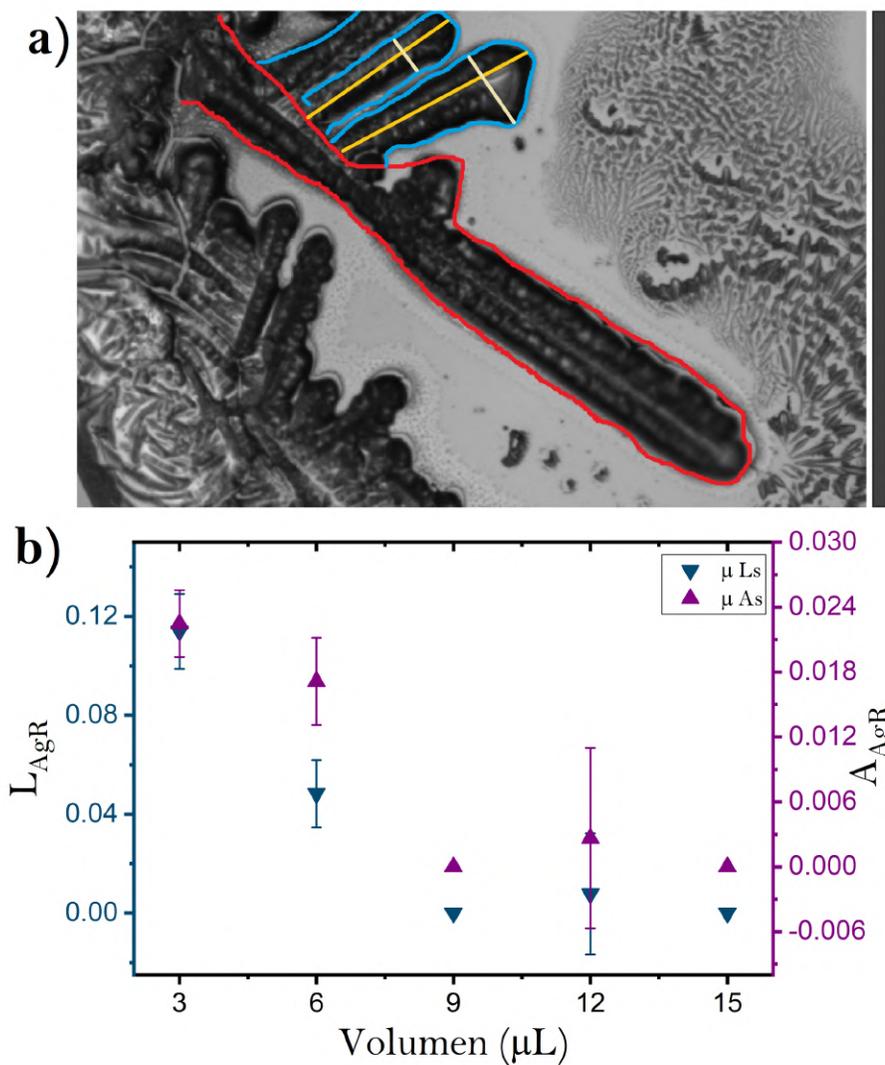


Figura 5.17: **Agujas ramificadas.** a) Agujas (rojo) con agujas ramificadas (celeste) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $HR = 25 - 35\%$ y $T = 20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. La barra en color negro tiene una longitud de 1.41mm . b) Longitud relativa de ejes mayor (negro) y menor (rojo) de agujas ramificadas como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

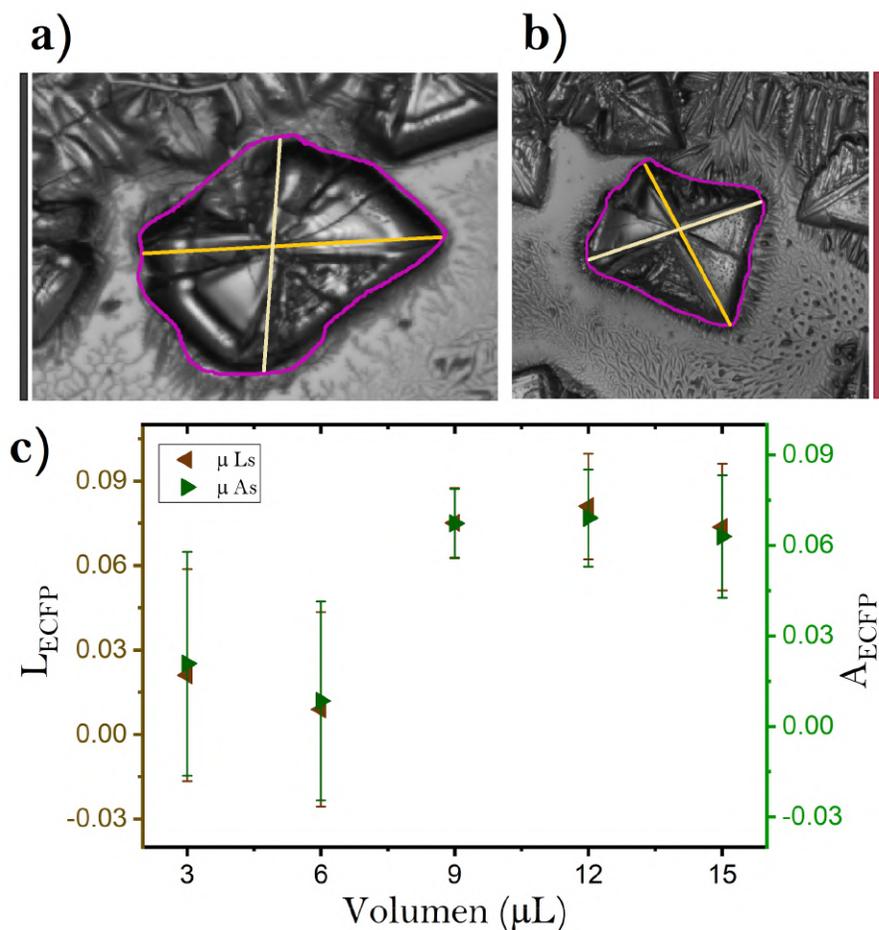


Figura 5.18: **Estacas de cristales en forma de prisma.** a) y b) Estacas de cristales en forma de prisma (morado) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1wt\%$ y $\phi_{NaCl} = 1wt\%$), con diferente volumen inicial ($V=3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $HR=25 - 35\%$ y $T=20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. Las barras en color negro y rojo tienen una longitud de 0.63 y 1mm , respectivamente. c) Longitud relativa de ejes mayor (negro) y menor (rojo) de estacas de cristales en forma de prisma como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

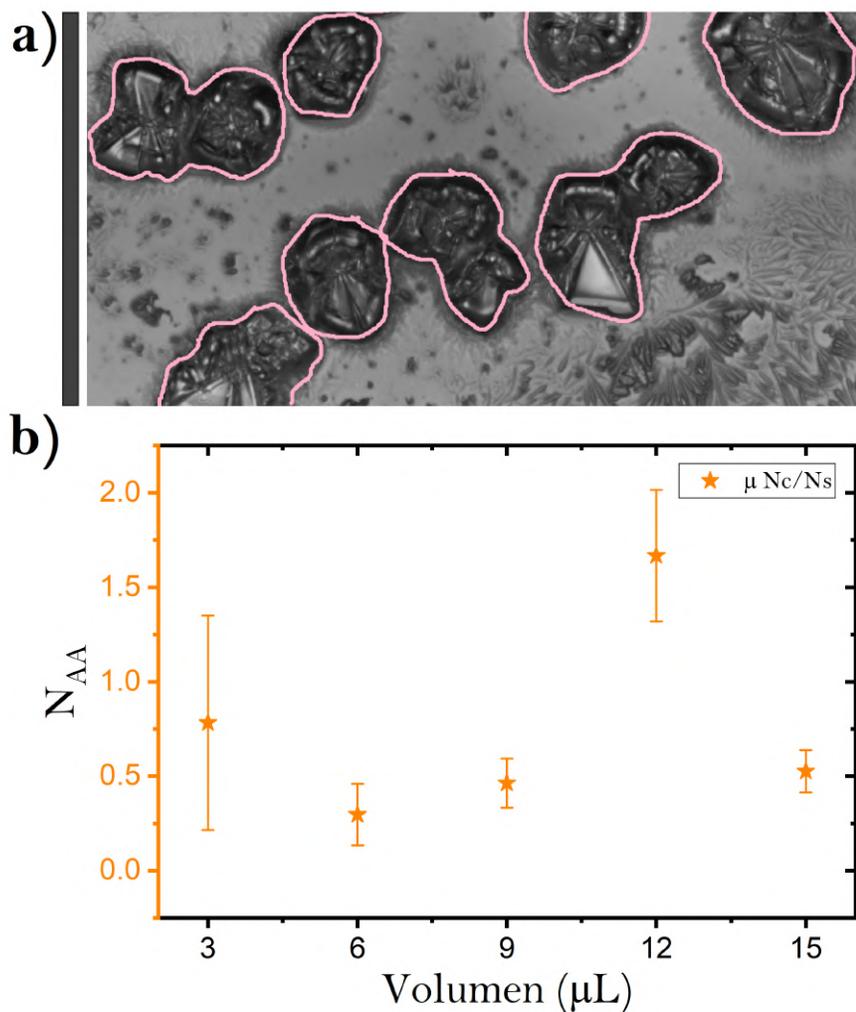


Figura 5.19: **Agregados amorfos.** a) Agregados amorfos (rosa) en depósitos de BSA y NaCl ($\phi_{BSA} = 1\text{wt}\%$ y $\phi_{NaCl} = 1\text{wt}\%$), con diferente volumen inicial ($V = 3, 6, 9, 12$ y $15\mu\text{L}$) con $\text{HR} = 25 - 35\%$ y $T = 20 - 25^\circ\text{C}$. El color dorado indica el eje mayor y el color amarillo claro indica el eje menor. La barra en color negro tiene una longitud de 1.51mm . b) Número de agregados amorfos (naranja) como función del volumen inicial de gota. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de $n = 12$.

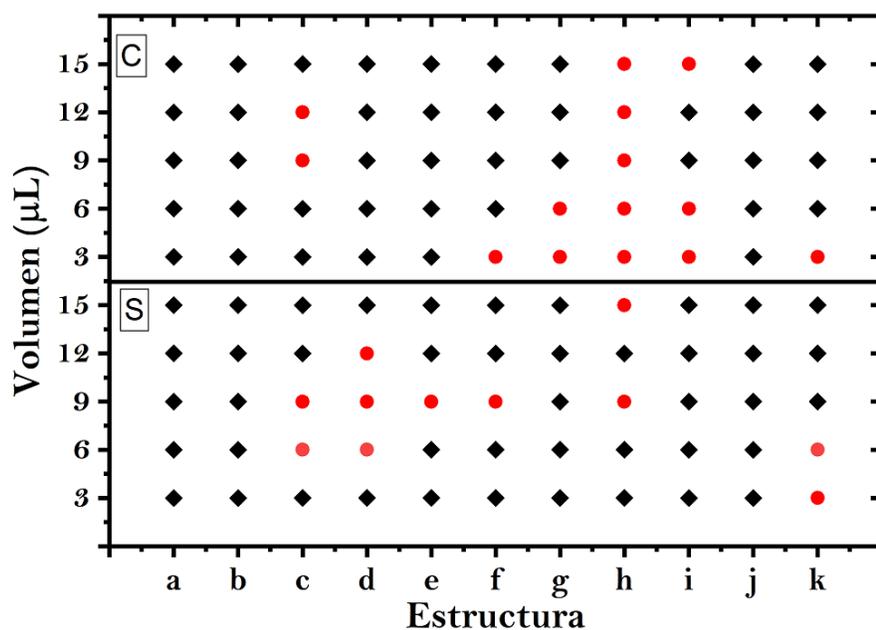


Figura 5.20: **Panorama general de estructuras.** Los símbolos en color negro indican que la estructura se forma en el depósito, mientras que los de color rojo indica que la estructura no se forma en el depósito. a= Crucetas, b= Estructuras en forma de agujas, c= Crucetas con helechos, d= Agujas con helechos, e= Agujas internas, f= Cristales arborescentes ramificados, g= Semi-estrellas de cristales, h= Agujas ramificadas, i= Estacas de cristales en forma de prismas, j= Agregados amorfos, k= Agujas con agregados amorfos..

Capítulo 6

Conclusiones

En conclusión, hemos realizado un estudio experimental sobre el efecto del volumen inicial de gota en la formación de patrones en gotas colgantes de sangre y proteínas. Hemos encontrado las condiciones experimentales óptimas de concentración, dispersión de luz, y volumen inicial de gota para alcanzar una alta reproducibilidad en la formación de patrones por el secado de gotas sésiles. Estimamos el perfil radial de intensidad, la compacidad y los parámetros de textura de la Estadística de Primer Orden (FOS) y la Matriz de Co-ocurrencia de Nivel de Gris (GLCM) para caracterizar depósitos de gotas. Encontramos que imágenes digitales con alto contraste de luz generan una eficiente detección de patrones en gotas secas de sangre diluida con agua ultrapura. Encontramos que el valor medio de intensidad de píxeles y la Entropía son los parámetros más eficientes para diferenciar entre grupos de depósitos. Además, el ángulo de contacto, altura y diámetro de la gota prueba que el secado de gotas sésiles y colgantes de sangre sigue el modo de Radio de Contacto Constante (CCR). Encontramos que gotas colgantes de sangre pueden generar un fenómeno de colapso en la gota debido a que la aglomeración de eritrocitos en el ápice de la gota. La frecuencia de aparición de este fenómeno incrementa con el volumen inicial de gota. Finalmente, hemos probado que sin importar el volumen inicial de gota, en gotas colgantes de sangre con baja concentración de hematocrito y en gotas colgantes de proteínas, este fenómeno de colapso no ocurre.

Sobre todo, nuestros resultados podrían ser útiles para generar biomarcadores de patologías, como el encontrado empíricamente para pacientes Post COVID-19 y para análisis forense de escenas de crimen.

Capítulo 7

Productos científicos

Se elaboró un manuscrito que será puesto bajo consideración para su publicación. Se realizó una estancia de investigación en el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM. Se participó en el Congreso Estatal de Ciencia de los Materiales Chiapas 2023 con una ponencia titulada "*Formación de patrones en gotas secas de sangre*", UNICACH-SMMater. Se participó en la 4ta Feria de Ciencias, con un póster titulado "*Formación de patrones en gotas secas de sangre en superficie inclinada de acrílico*", FCFM-UNACH. Se participó en el Foro de estudiantes de Biofísica 2023, con un póster titulado "*Formación de patrones en gotas secas de sangre en superficie inclinada de acrílico*", University at Buffalo-CIMAT-Monterrey. Se participó en la clase en línea con el tema "*Patrones de manchas de sangre*", INDISIUM.

Drying of pendant drops of blood

Ricardo Herrera-Sandoval, Yojana J.P. Carreón, Orlando Díaz-Hernández, and
Jorge González-Gutiérrez*

*Facultad de Ciencias en Física y Matemáticas Universidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla
Gutiérrez, Chiapas, México*

E-mail: jorge.ggutierrez@unach.mx

Abstract

The analysis of patterns in dried blood droplets has made it possible to generate strategies to detect health problems in patients and to address problems in forensic sciences. Therefore, studying various forms of droplet drying could enhance the efficiency of pathology diagnosis and the comprehension of crime scenes. In this paper, we report the study of the pattern formation generated by drying hanging blood droplets with different initial volumes ($V = 3\text{--}24 \mu\text{L}$). We find two distinct groups of deposits: dried drops with radial symmetry (Group I) and dried drops with lateral deposition of blood serum (Group II). Lateral deposition arises from drop collapse induced by hematocrit agglomeration at the drop apex. Regardless of the initial droplet volume, the critical contact angle for collapse is 11 degrees less than the initial contact angle. Finally, we provide evidence that the mass contained in a droplet promotes the occurrence of the unstable drying mode.

Introduction

The analysis of evaporated sessile droplet residues from biofluids has enabled the detection of macromolecules, conformational changes in molecular structures, changes in organism

Formación de patrones en gotas secas de sangre en superficie inclinada de acrílico

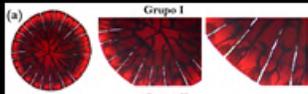
Ricardo H. Sandoval, Nijara J. P. García, Jorge González-Gutiérrez
Universidad Autónoma de Chiapas



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE CHIAPAS

El estudio de patrones en gotas secas de sangre ha permitido generar estrategias para detectar patrones anómalos y evitar problemas en diversas áreas. Por lo tanto, el autor (Sandoval) realizó el estudio de patrones en gotas secas de sangre para evaluar la eficacia del diagnóstico de patrones, y realizó el estudio de patrones a partir del modo de deposición de sangre con diferentes volúmenes (V = 3-24 µL). Encontramos la formación de dos grupos de depósitos: gotas secas con simetría radial (Grupo I) y gotas secas con deposición lateral (Grupo II). En ambos grupos, los depósitos muestran una mayor concentración de eritrocitos en la región central que en la corona. En la región central, un conjunto de gotas negras aparecen desde el centro de la gota hacia la corona, formando una estructura ramificada en forma de árbol. La corona contiene gotas más pequeñas y normales. La corona muestra una estructura de depósitos en una disposición lateral de suroeste-noreste presente en los diagramas del Grupo II. La microscopía óptica revela que con un recubrimiento y debe a que la sedimentación de eritrocitos en el ápice de la gota produce un colapso. Encontramos que, al incrementar el volumen total de gota, el ángulo de contacto crítico se 11 grados menor al ángulo de contacto inicial. Finalmente, explorando la frecuencia de aparición de depósitos del Grupo II a diferentes volúmenes de gota, y analizando del modo de secado de gotas diluidas con agua ultra pura, probamos que la masa contenida en una gota favorece a la aparición del modo de secado inestable.

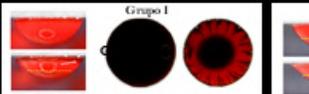
Grupo I



Grupo II



Grupo I



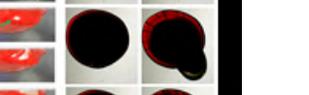
Grupo II



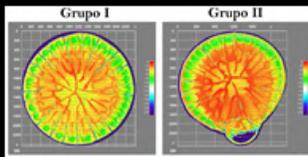
Grupo I



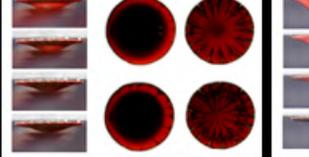
Grupo II



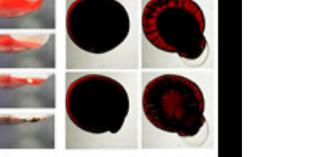
Grupo I



Grupo II



Grupo I



Grupo II



Introducción

El estudio de la formación de patrones en gotas secas de sangre sobre sustratos es relevante para el desarrollo de pruebas forenses y plataformas de diagnóstico de patologías. Por otro lado, en 2001, Kalyabin et al. utilizó espectroscopía de Fourier para analizar los patrones circulares del plasma humano seco y señaló que el análisis de dichos patrones podría ser útil de las biomarcas promisoras para el diagnóstico de enfermedades [2]. Rapes también estudió el patrón morfológico en gotas secas de plasma a partir de una muestra de estos patrones bajo el diagnóstico de enfermedades [3]. Hoy en día se sabe que el análisis morfológico de patrones en gotas secas de sangre puede revelar información, incluso, acerca de la toxicidad. Esto ocurre porque cambios en las y moleculares de los compuestos de la sangre causan cambios en los patrones de gotas secas del plasma y la sangre total. Por lo tanto, se necesitan estrategias para el secado de gotas con alta concentración que pueden producir depósitos inestables de incrementar la efectividad de estos estudios. Además, obtener nuevos patrones en gotas secas de sangre podría incrementar la efectividad en el análisis de muestras de gotas secas para el diagnóstico de patologías.

Justificación y Objetivos

En este trabajo exploramos el estudio de la formación de patrones a partir del modo de deposición de gotas secas de sangre con diferentes volúmenes (V = 3-24 µL). Encontramos que el secado de gotas secas con un modo de deposición lateral (LDC) y de forma inestable. Inicialmente, sin importar el tipo de secado los depósitos están compuestos por una corona con gotas secas radiales y una región central con alta concentración de eritrocitos. En una gota representativa desde el centro de la gota hacia la corona, para formar una estructura ramificada en forma de árbol. En el secado inestable, los eritrocitos se sedimentan al ápice de la gota hacia formar una protuberancia que colapsa, produciendo un recubrimiento lateral compuesto mayormente por agua suspendida. Sin importar el volumen total de gota, el ángulo de contacto de colapso se mantiene por debajo de 11 grados con respecto al inicial. Finalmente, sobre la base del volumen total de gota y el análisis del modo de secado de gotas diluidas con agua ultra pura probamos que la masa contenida en una gota favorece a la aparición del modo de secado inestable.

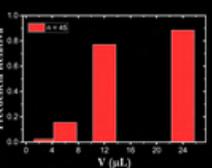
Metodología

El diseño metodológico para detectar el objetivo general propuesto en este proyecto fue el siguiente: 1) Se utilizó sangre de persona sana. 2) Utilizando una microscopía, las gotas de sangre se colocaron sobre un portabojas de acrílico con inclinación de 180 grados. En cada portabojas se colocaron 10 gotas de 3-24 µL. 3) Las gotas se evaporaron en condiciones ambientales controladas (T = 25 °C) y humedad relativa (HR) de 30%. 4) La dinámica del secado de gotas se filmó con una cámara de vídeo conectada a una PC. 5) Los depósitos fueron observados después de la evaporación utilizando un microscopio óptico.

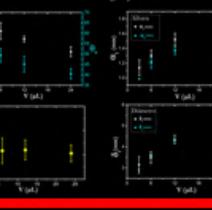
Resultados

El secado de gotas de sangre induce la formación de dos grupos de depósitos que comparten muchas similitudes estructurales. Están compuestos por una región central de alta concentración de eritrocitos, y una corona de baja concentración. La región central se produce una estructura en forma de árbol, compuesta por gotas negras interconectadas. La corona contiene gotas más pequeñas y gotas negras normales. Inicialmente, no observamos la formación de placas en la región central. La mayor diferencia entre los grupos de depósitos es una deposición lateral compuesta mayormente por suero suspendido. Por otro lado, la protuberancia del suero suspendido de las gotas del Grupo II incrementa de tamaño como función del volumen total de depósitos de sangre.

Los depósitos de las gotas de sangre, con una concentración de 20% de hematocrito, presentan gotas secas que aparecen del ángulo de cañal hacia el centro de la gota. El número de estas gotas incrementa a medida que aumenta el volumen total de gota. Las gotas secas de la solución de 4% de hematocrito están compuestas por dos regiones: la región del ángulo de cañal y la región central. Se observa que de la periferia aparecen grandes gotas hacia el interior de la gota y terminan en la epícora central de la misma.



| V (µL) | Relative Frequency |
|--------|--------------------|
| 3 | 0.15 |
| 6 | 0.25 |
| 12 | 0.45 |
| 24 | 0.65 |



Conclusiones

Encontramos que el secado de gotas secas completa se produce bajo el modo de deposición lateral (LDC) y de forma inestable. Los depósitos de ambos grupos están compuestos por una corona con gotas secas radiales y una región central con alta concentración de eritrocitos. En una gota representativa desde el centro de la gota hacia la corona, para formar una estructura ramificada en forma de árbol. En el secado inestable, los eritrocitos se sedimentan al ápice de la gota hacia formar una protuberancia que colapsa, produciendo un recubrimiento lateral compuesto mayormente por suero suspendido. Sin importar el volumen total de gota, el ángulo de contacto de colapso se mantiene por debajo de 11 grados con respecto al inicial. Finalmente, sobre la base del volumen total de gota y el análisis del modo de secado de gotas diluidas con agua ultra pura probamos que la masa contenida en una gota favorece a la aparición del modo de secado inestable.



Bibliografía

- [1] Stuart H James, Paul E Kish, and T Paulette Sutton. *Principles of bloodstain pattern analysis: theory and practice*. CRC press, 2005.
- [2] Dmitry A Zimnyakov. Coherent optics of ordered and random media (saratov, 3-6). In *SPIE proceedings series*. SPIE,2000.
- [3] Khellil Sefiane. On the formation of regular patterns from drying droplets and their potential use for bio-medical applications. *Journal of Bionic Engineering*, 7(4):S82–S93, 2010.
- [4] Kishor S Jain, MK Kathiravan, Rahul S Somani, and Chamanlal J Shishoo. The biology and chemistry of hyperlipidemia. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(14):4674–4699, 2007.
- [5] Leila Bahmani, Mahdi Neysari, and Maniya Maleki. The study of drying and pattern formation of whole human blood drops and the effect of thalassaemia and neonatal jaundice on the patterns. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 513:66–75, 2017.
- [6] Tzu Chieh Chao, Anna Trybala, Victor Starov, and Diganta B Das. Influence of haematocrit level on the kinetics of blood spreading on thin porous medium during dried blood spot sampling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 451:38–47, 2014.
- [7] RD Deegan, O Bakajin, TF Dupont, G Huber, SR Nagel, and TA Witten. Nature1997, 389, 827. *Phys. Rev. E*, 61:475, 2000.

- [8] Hua Hu and Ronald G Larson. Marangoni effect reverses coffee-ring depositions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14):7090–7094, 2006.
- [9] P Logesh Kumar, Sumesh P Thampi, and Madivala G Basavaraj. Patterns from drops drying on inclined substrates. *Soft Matter*, 17(33):7670–7681, 2021.
- [10] Marc A Hampton, Tuan AH Nguyen, Anh V Nguyen, Zhi Ping Xu, Longbin Huang, and Victor Rudolph. Influence of surface orientation on the organization of nanoparticles in drying nanofluid droplets. *Journal of colloid and interface science*, 377(1):456–462, 2012.
- [11] Ranajit Mondal, Shivani Semwal, P Logesh Kumar, Sumesh P Thampi, and Madivala G Basavaraj. Patterns in drying drops dictated by curvature-driven particle transport. *Langmuir*, 34(38):11473–11483, 2018.
- [12] Chris S Hodges and S Mick Tangparitkul. Comment on “patterns in drying drops dictated by curvature-driven particle transport”. *Langmuir*, 35(30):9988–9990, 2019.
- [13] Weibin Li, Wenjie Ji, Honghui Sun, Ding Lan, and Yuren Wang. Pattern formation in drying sessile and pendant droplet: Interactions of gravity settling, interface shrinkage, and capillary flow. *Langmuir*, 35(1):113–119, 2018.
- [14] Céline Sadek, Herve Tabuteau, Pierre Schuck, Yannick Fallourd, Nicolas Pradeau, Cecile Le Floch-Fouere, and Romain Jeantet. Shape, shell, and vacuole formation during the drying of a single concentrated whey protein droplet. *Langmuir*, 29(50):15606–15613, 2013.
- [15] Yojana JP Carreón, Orlando Díaz-Hernández, Gerardo J Escalera Santos, Ivan Cipriano-Urbano, Francisco J Solorio-Ordaz, Jorge González-Gutiérrez, and Roberto Zenit. Texture analysis of dried droplets for the quality control of medicines. *Sensors*, 21(12):4048, 2021.

- [16] Fujun Wang, Vanessa Gallardo, Stephen Michielsen, and Tiegang Fang. Fundamental study of porcine drip bloodstains on fabrics: Blood droplet impact and wicking dynamics. *Forensic Science International*, 318:110614, 2021.
- [17] Manikuntala Mukhopadhyay, Rudra Ray, Manish Ayushman, Pourush Sood, Maitreyee Bhattacharyya, Debasish Sarkar, and Sunando DasGupta. Interfacial energy driven distinctive pattern formation during the drying of blood droplets. *Journal of Colloid and Interface Science*, 573:307–316, 2020.
- [18] FR Smith, C Nicloux, and David Brutin. A new forensic tool to date human blood pools. *Scientific reports*, 10(1):1–12, 2020.
- [19] James M Cameron, Holly J Butler, David S Palmer, and Matthew J Baker. Biofluid spectroscopic disease diagnostics: A review on the processes and spectral impact of drying. *Journal of biophotonics*, 11(4):e201700299, 2018.
- [20] Ruoyang Chen, Liyuan Zhang, Duyang Zang, and Wei Shen. Blood drop patterns: Formation and applications. *Advances in colloid and interface science*, 231:1–14, 2016.
- [21] David Brutin, Benjamin Sobac, Boris Loquet, and José Sampol. Pattern formation in drying drops of blood. *Journal of fluid mechanics*, 667:85–95, 2011.
- [22] Ruoyang Chen, Liyuan Zhang, and Wei Shen. Controlling the contact angle of biological sessile drops for study of their desiccated cracking patterns. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(37):5867–5875, 2018.
- [23] Benjamin Sobac and David Brutin. Desiccation of a sessile drop of blood: Cracks, folds formation and delamination. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 448:34–44, 2014.
- [24] David Brutin, Benjamin Sobac, and Céline Nicloux. Influence of substrate nature on the evaporation of a sessile drop of blood. *Journal of Heat Transfer*, 134(6), 2012.

- [25] Anusuya Pal, Amalesh Gope, and Germano Iannacchione. Temperature and concentration dependence of human whole blood and protein drying droplets. *Biomolecules*, 11(2):231, 2021.
- [26] Anusuya Pal, Amalesh Gope, John D Obayemi, and Germano S Iannacchione. Concentration-driven phase transition and self-assembly in drying droplets of diluting whole blood. *Scientific reports*, 10(1):1–12, 2020.
- [27] W Bou Zeid and David Brutin. Influence of relative humidity on spreading, pattern formation and adhesion of a drying drop of whole blood. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 430:1–7, 2013.
- [28] W Bou-Zeid and D Brutin. Effect of relative humidity on the spreading dynamics of sessile drops of blood. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 456:273–285, 2014.
- [29] R Iqbal, Amy Q Shen, and AK Sen. Understanding of the role of dilution on evaporative deposition patterns of blood droplets over hydrophilic and hydrophobic substrates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 579:541–550, 2020.
- [30] Yojana JP Carreón, Jorge González-Gutiérrez, MI Pérez-Camacho, and Hilda Mercado-Urbe. Patterns produced by dried droplets of protein binary mixtures suspended in water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161:103–110, 2018.
- [31] Yojana JP Carreón, Mary Luz Gómez-López, Orlando Díaz-Hernández, Pamela Vazquez-Vergara, Rosario E Moctezuma, José M Saniger, and Jorge González-Gutiérrez. Patterns in dried droplets to detect unfolded bsa. *Sensors*, 22(3):1156, 2022.
- [32] Guofang Chen and Gideon J Mohamed. Complex protein patterns formation via salt-induced self-assembly and droplet evaporation. *The European Physical Journal E*, 33(1):19–26, 2010.
- [33] Anusuya Pal, Amalesh Gope, and Germano S Iannacchione. Statistical image analysis of drying bovine serum albumin droplets in phosphate buffered saline.

Biomedical Data Mining for Information Retrieval: Methodologies, Techniques and Applications, pages 213–235, 2021.

- [34] Robert D Deegan, Olgica Bakajin, Todd F Dupont, Greb Huber, Sidney R Nagel, and Thomas A Witten. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 389(6653):827, 1997.
- [35] Jorge González-Gutiérrez, Rosendo Pérez-Isidoro, and JC Ruiz-Suárez. A technique based on droplet evaporation to recognize alcoholic drinks. *Review of Scientific Instruments*, 88(7):074101, 2017.
- [36] Junyan Zhang, Tai Cheng, Peter Cheng, and Jim Chao. Relationship between the molecular structures of lubricants and their performance at the head–disk interface of hard disk drives. *Wear*, 254(3-4):321–331, 2003.