

# Análisis de la dinámica tridimensional de evaporación de gotas sésiles de interés biomédico

A. Bribiesca<sup>1\*</sup>, F. Montoya<sup>1</sup>, P. Hernández<sup>1</sup>, E. Ramos<sup>2</sup>, G. Corkidi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mor., México

<sup>2</sup>Instituto de Energías Renovables, UNAM, Cuernavaca, Mor., México

\*[javier.bribiesca@ibt.unam.mx](mailto:javier.bribiesca@ibt.unam.mx), [gabriel.corkidi@ibt.unam.mx](mailto:gabriel.corkidi@ibt.unam.mx)

**Abstract**— The structure of the flow inside evaporating sessile droplets of bodily fluids such as urine, blood, and saliva can provide crucial information for medical diagnosis, however the experimental analysis of the evaporation dynamics has proved to be a challenge due to the flow's three-dimensional and time-dependent nature. In this work we present a method to analyze the 3D+*t* evaporation dynamics of a sessile droplet using a modified optic microscope coupled with homemade digital image processing and data analysis software. We show how the method works on distilled water droplets and highlight how it will contribute to the analysis of biological fluids.

**Palabras clave**—Evaporación, gota sésil, microscopía 3D.

## I. INTRODUCCIÓN

La evaporación de una gota es un fenómeno natural con importantes aplicaciones biomédicas. La sangre, por ejemplo, al evaporarse encima de un sustrato deja una huella roja de sedimento cuya forma revela información útil para diagnosticar enfermedades como hepatitis B, cáncer e ictericia [1]. Brutin et al. [2] determinaron que los residuos que deja la gota de sangre de una persona sana se agrupan en pedazos de sedimento grandes, mientras los de pacientes anémicos o hiperlipidémicos forman fragmentos de sedimento pequeños. También es posible realizar un análisis similar con otros fluidos corporales como las lágrimas y la saliva para diagnosticar enfermedades de ojo seco y medir niveles de intoxicación [1]. Shabalin et al. [3] observaron que al evaporarse una gota de orina de un paciente con litiasis urinaria las sales se cristalizan, con lo cual patentaron un método frecuentemente utilizado para diagnosticar esta enfermedad en etapa preclínica.

La forma final del sedimento se debe a la estructura del flujo interno de la gota durante el proceso de evaporación, por lo cual es importante el desarrollo de herramientas para el análisis tridimensional de micro-flujos. Además, conocer la estructura del flujo permite utilizarlo como una herramienta para manipular objetos a escala micrométrica. Esto ha sido de interés para las ciencias biomédicas porque al colocar cadenas de ADN dentro de una gota en evaporación las fuerzas internas las jalan y desenredan facilitando su estudio, haciendo posible identificar genes y potencialmente detectar enfermedades congénitas [4].

El análisis de la dinámica de evaporación de gotas representa un desafío para los campos de microscopía e imagenología debido a la naturaleza tridimensional y dependiente del tiempo que tiene el flujo. Actualmente, la forma predominante de analizarla consiste en utilizar un microscopio para grabar el movimiento de partículas trazadoras en un plano focal utilizando un método llamado *Particle Image Velocimetry (PIV)* [5] que calcula la velocidad local a partir de la correlación cruzada entre imágenes consecutivas. Al grabar el flujo en un solo plano se pierde completamente la información en el resto del volumen. Por esta razón los modelos y aplicaciones actuales del proceso están invariablemente basados en observaciones bidimensionales. Esta limitación ha motivado el desarrollo de herramientas para el análisis 3D de flujos microscópicos a través de *PIV* tomográfico [6]. Estos sistemas graban la gota simultáneamente con varias cámaras desde diferentes ángulos. Esto permite obtener información 3D de la muestra, de la misma forma que utilizar dos ojos nos permite percibir la profundidad. Sin embargo, la curvatura del casquete esférico causa artefactos ópticos que deforman el volumen grabado y ocasionan una pérdida importante de información [5]. Por otra parte, gracias a estas herramientas se ha determinado que durante el proceso de evaporación existe una aceleración que puede aumentar la velocidad de los trazadores, cuyo diámetro es de 1  $\mu\text{m}$ , de una velocidad inicial de .3  $\mu\text{m/s}$  a más de 3  $\mu\text{m/s}$  en [7]. Esto complica en algunos casos el análisis del proceso completo, ya que la tasa de muestreo debe ser suficientemente alta para detectar los flujos más rápidos, lo cual puede llenar la memoria de algunos dispositivos en cuestión de segundos [8], mientras que el proceso completo de evaporación de gotas de 1 mm de diámetro dura 5-8 min a temperatura ambiente.

En este trabajo presentamos un método para analizar la dinámica espaciotemporal de evaporación y de formación de sedimento de gotas sésiles utilizando un sistema experimental de microscopía óptica y *software* para el análisis de flujos basado en procesamiento de imágenes. El sistema experimental está formado por un microscopio invertido que equipamos con un dispositivo piezoeléctrico que hace que el objetivo oscile verticalmente mientras se graban imágenes de la muestra colocada sobre un portaobjetos [8]. De este modo, en lugar de grabar un plano

óptico fijo, la lente sube y baja durante la adquisición para capturar imágenes a diferentes alturas como se muestra en la Fig. 1a. Debido a la velocidad de los trazadores y la vibración del objetivo se requiere grabar usualmente entre 100 y 1,000 cuadros por segundo para tener una resolución temporal y espacial adecuada. Por esta razón el sistema utiliza cámaras de alta velocidad. Este tipo de cámaras graban las imágenes en su propia RAM durante la adquisición. A pesar de poder almacenar casi 30,000 imágenes, la memoria se puede llenar en menos de un minuto debido a la alta frecuencia de muestreo. Para poder grabar el proceso completo el sistema utiliza secuencialmente dos cámaras de alta velocidad configuradas a diferentes frecuencias. Una cámara graba los primeros minutos del proceso de evaporación, cuando el flujo es lento y después, cuando comienza a acelerar, la primera cámara se detiene, el piezoeléctrico comienza a oscilar a una frecuencia mayor y la segunda cámara graba los minutos restantes con una frecuencia de muestreo más alta. De este modo la etapa lenta y la rápida del proceso de evaporación son grabadas a diferentes escalas de tiempo, adecuadas para registrar la velocidad de los trazadores. Las imágenes son procesadas para segmentar los trazadores con un filtro pasabanda y después se reconstruye sus trayectorias espaciotemporales enlazando la posición de los trazadores en cada tiempo con la posición de partículas en el tiempo siguiente, minimizando la suma de las distancias. Las trayectorias se procesan con *software* que desarrollamos en Python (v3.7) para obtener los campos de velocidad y analizar la formación del sedimento. El objetivo es que este análisis permita obtener características del flujo tridimensional útiles para el desarrollo de modelos más precisos y nuevas aplicaciones médicas basadas en información que no se alcanza a cuantificar en un plano.

## II. METODOLOGÍA

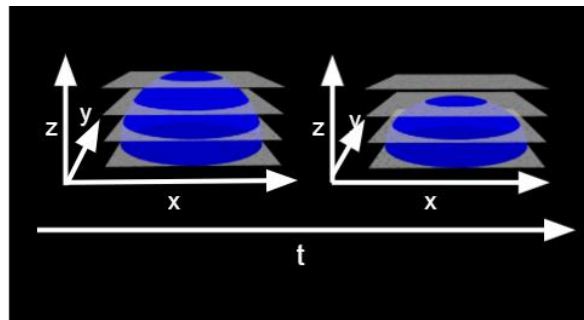
### A. Sistema experimental

Para cada experimento se colocó una gota de agua destilada con volumen de  $\sim 0.1 \mu\text{l}$  sobre un sustrato de vidrio de borosilicato (VWR). La gota fue colocada dentro de una caja de acrílico equipada con sensores DHT22 conectados a un microcontrolador ESP8266 (NodeMCU) programado con Arduino (v1.8) que reporta la temperatura y humedad cerca de la muestra cada 2 segundos. Los trazadores son partículas fluorescentes de poliestireno (Thermoscientific) que son iluminadas con un sistema de epi-fluorescencia cuya fuente de luz es un LED Thorlabs M470L. El tiempo total de evaporación fue de  $\sim 5$  min.

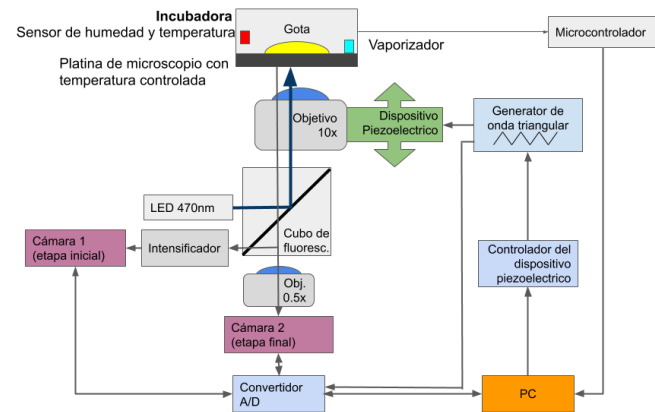
El sistema para adquisición 3D está formado por un microscopio invertido (Olympus IX71) con un dispositivo piezoeléctrico P-725 (Physik Instruments, MA, EUA) montado entre el objetivo (UplanFl N 10x) y el revólver del microscopio, y dos cámaras de alta velocidad conectadas a puertos separados con un espejo que redirige la salida óptica

a la cámara que está grabando [8]. Mientras las cámaras graban el proceso, un servo-controlador E-501 hace que la lente del microscopio oscile en el eje vertical. El sistema está sujeto a una mesa óptica (TMC) para evitar que la oscilación del piezoeléctrico genere vibraciones adicionales que afecten las observaciones.

Una cámara Optronis 5000 (que almacena hasta 16,000 imágenes de  $512 \times 512$  px) registra la primera etapa de la evaporación, que se caracteriza por ser lenta y durar varios minutos. Un intensificador de imagen C9016-04 con una unidad de refuerzo de imagen C4412-01 (Hamamatsu, Japón) se acopló a esta cámara para intensificar la luz de fluorescencia ya que, a una mayor frecuencia de muestreo, la cantidad de luz capturada es crítica debido a su baja sensibilidad a la luz. Mientras el objetivo oscila a 0.25 Hz con una amplitud de  $250 \mu\text{m}$ , esta cámara adquiere 60 fps por hasta 4.4 min. Cuando la velocidad de las partículas se incrementa, detenemos la primera cámara y comenzamos a grabar con la segunda. Para esta última etapa, utilizamos una cámara de alta velocidad MEMRECAM Q1v (NAC, EE. UU.) que graba hasta 27,000 imágenes de  $640 \times 480$  px. En esta última etapa el dispositivo piezo-objetivo osciló a 2.5 Hz con una amplitud de  $90 \mu\text{m}$ , mientras la cámara de alta velocidad adquirió 100 fps por hasta 4.64 min. La Fig. 1b muestra un diagrama de bloques del sistema experimental.



(a)



(b)

Fig. 1. Sistema experimental. (a) Representación de adquisición realizada por el sistema experimental. (b) Diagrama de bloques.

El sistema experimental es controlado por un programa que desarrollamos en C# (v7.3) para sincronizar las cámaras con el piezoeléctrico y obtener la altura a la que se grabó cada imagen. El programa controla el piezoeléctrico a través de un cable USB que le envía los parámetros de oscilación al servo-controlador y controla las cámaras con un convertidor A/D NI-6211 USB (National Instruments) con 16 entradas analógicas (16 Bits, 250 kS/s), 2 salidas analógicas (250 kS/s), 4 entradas digitales y 4 salidas digitales. Específicamente, el convertidor le envía dos señales digitales a cada cámara: un pulso disparador que le indica cuando comenzar a grabar y una señal de sincronía configurada con la frecuencia de muestreo. Simultáneamente, este convertidor digitaliza cinco señales que recibe del sistema experimental para saber a qué altura se grabó cada imagen y poder reconstruir el volumen: la posición del piezoeléctrico, la señal de sincronía de la primera cámara, el disparador de la primera cámara, la señal de sincronía de la segunda cámara y el disparador de la segunda cámara. Con esta información se puede mapear cada imagen con su altura correspondiente. Finalmente se agrupan las imágenes que se tomaron a la misma altura para reconstruir los diferentes planos focales formando *hyperstacks* 4D. Este sistema se describe más a fondo en [8].

### B. Análisis del flujo

Se obtuvieron las trayectorias 3D+t de los trazadores para analizar la dinámica de evaporación y formación del sedimento. Para esto primero segmentamos las partículas utilizando el algoritmo de Diferencia de Gaussinas (*DoG*) de TrackMate (v6.0.1) [9] el cual aplica un filtro pasabanda que conserva solo los círculos con diámetro de  $\sim 5$  px, que corresponde a los trazadores. La posición  $x,y$  detectada de los trazadores se complementa con la altura del plano focal para obtener sus coordenadas  $x,y,z$ . Una vez que se obtuvo la posición 3D, se aplica el método basado en Problema de Asignación Lineal o *Linear Assignment Problem (LAP)* de TrackMate [9] para reconstruir las trayectorias 4D. Este método enlaza la posición de partículas en cada tiempo con partículas en el tiempo siguiente minimizando la suma de distancias.

Para validar las trayectorias obtenidas se siguieron manualmente de principio a fin 90 trazadores elegidos aleatoriamente en las imágenes para construir trayectorias “*ground truth*”. Después se obtuvieron las trayectorias con TrackMate y se comparó la longitud total en la que estas coincidieron con el *ground truth*. De este modo determinamos que 94% de la longitud de las trayectorias se detectó correctamente [8].

A partir del movimiento de los trazadores se calcularon los campos de velocidad instantáneos. Para esto, las partículas fueron proyectadas en el plano  $rz$ , en una maya de

$30 \times 20$  y se promedió la velocidad de las partículas en cada celda.

### III. RESULTADOS

Se grabó el proceso de evaporación completo de gotas de agua destilada cargadas de trazadores en 4D (3D+t). La Fig. 2a muestra todas las trayectorias obtenidas. Cada gota contenía más de 1,500 trazadores, los cuales fueron rastreados durante el proceso de evaporación. La Fig. 2b muestra algunos ejemplos de las trayectorias obtenidas. Conforme avanza el proceso las partículas elegidas que comenzaron en la parte más alta de la gota descienden verticalmente. En contraste, las partículas que inician cerca del sustrato se desplazan radialmente hacia afuera.

La velocidad promedio cuadrática de las partículas fue de  $0.35 \pm 0.11 \mu\text{m/s}$  durante los primeros minutos de la evaporación y de  $0.5 \pm 0.25 \mu\text{m/s}$  en la etapa final. La Fig. 3 muestra el campo de velocidades de la gota. El flujo cerca de la superficie se dirige lentamente hacia el centro y cerca del sustrato se dirige rápidamente hacia afuera. El flujo de Homann es un modelo que describe en 3D el comportamiento de un líquido que baja hacia un sustrato [10]. En este modelo el flujo es axisimétrico y conforme el líquido baja se desvía y se dirige hacia afuera. En el campo de velocidades cerca del centro de la gota observamos un este tipo de flujo, el agua cae verticalmente y cerca del sustrato se dirige hacia la línea de contacto.

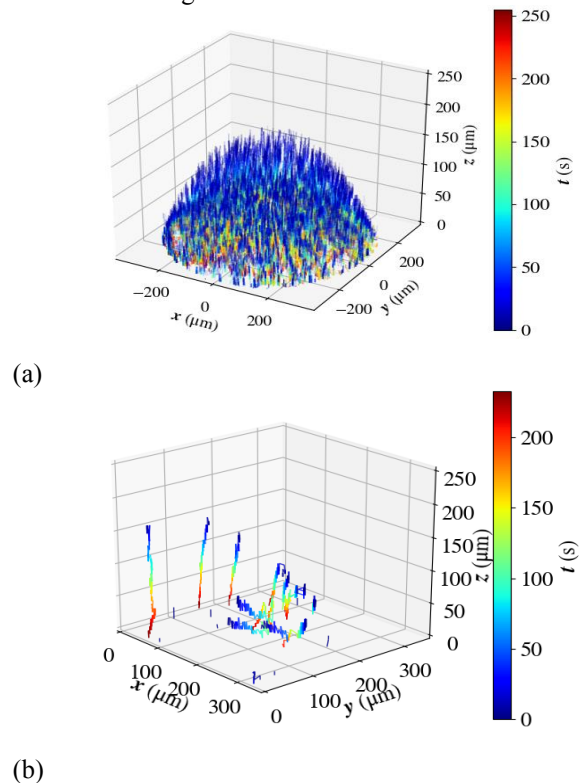


Fig. 2. Reconstrucción 4D del proceso de evaporación. (a) Todas las trayectorias 4D obtenidas. (b) Ejemplos de trayectorias 3D. El código de colores representa el tiempo

(azul=0, rojo=265 s (tiempo final del proceso de evaporación)).

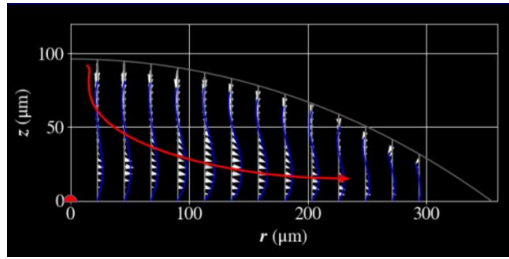


Figura 3: Campo de velocidades 120 segundos antes de que la gota se seque completamente. Las flechas blancas representan el campo de velocidad instantáneo. La flecha roja representa el flujo de Homann.

#### IV. DISCUSIÓN

Los modelos que existen actualmente para el flujo interno de una gota en evaporación están basados en información 2D debido a las limitaciones de los sistemas experimentales para realizar adquisiciones 3D. Marin et al. [11], por ejemplo desarrollaron un modelo que describe los perfiles de velocidad basado en la ley de conservación de masa. En su trabajo validaron los resultados de su modelo comparándolos con observaciones 2D del flujo cercano al sustrato utilizando *PIV*. Al comparar la información de su modelo con nuestros datos experimentales 3D del flujo, es claro que se ajustan correctamente cerca de  $z=0$  micras, que es el plano focal que observaron bajo el microscopio, sin embargo, el modelo no describe correctamente el flujo en el resto del volumen. Esto resalta la necesidad de realizar un análisis 3D para poder obtener información precisa sobre el flujo y desarrollar mejores modelos y nuevas aplicaciones médicas.

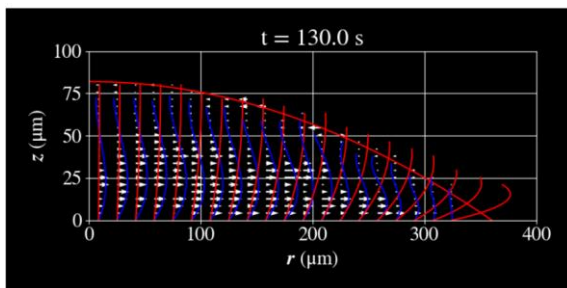


Fig. 4. Perfil de velocidades 130 segundos después de comenzar la evaporación. Las flechas blancas representan el perfil de velocidades obtenido experimentalmente. La curva azul es un polinomio cubico ajustado al perfil. Las curvas rojas son los perfiles estimados por el modelo de Marin et

al. [11].

#### V. CONCLUSIONES

Se desarrolló una técnica para analizar la dinámica 4D de evaporación de una gota utilizando un sistema experimental formado por un microscopio óptico modificado para adquisición 3D a diferentes escalas de tiempos y *software* para el análisis de flujos basado en procesamiento de imágenes. Esta herramienta permitió obtener los campos de velocidad y analizar la formación de sedimento utilizando las trayectorias 4D de los trazadores. Los resultados obtenidos serán útiles para desarrollar un modelo numérico para la evaporación de gotas sésiles basado en principios básicos de física.

El sistema experimental y *software* permiten el análisis de la evaporación de gotas con diferentes composiciones. El sistema permitirá evaluar las características del flujo 3D de suero sanguíneo diluido y su correlación con enfermedades como la anemia e hiperlipidemia. Además, el sistema podrá ser utilizado para analizar otros fluidos biológicos como la saliva y la orina para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades.

#### REFERENCIAS

- [1] D. Zang, S. Tarafdar, Y. Y. Tarasevich, M. Dutta Choudhury, and T. Dutta, "Evaporation of a Droplet: From physics to applications," *Phys. Rep.*, vol. 804, no. 1, pp. 1–56, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.physrep.2019.01.008.
- [2] D. Brutin, B. Sobac, B. Loquet, and J. Sampaol, "Pattern formation in drying drops of blood," *J. Fluid Mech.*, vol. 667, pp. 85–95, 2011, doi: 10.1017/S0022112010005070.
- [3] V. N. Shabalin, "Methods of diagnosing complicated urolithiasis and predicting urolithiasis," *Euro Patent EP#0504409*, 1996. <https://patents.google.com/patent/US5366899A/en> (accessed Nov. 17, 2019).
- [4] S. Wu et al., "Microfluidic DNA combing for parallel single-molecule analysis," *Nanotechnology*, vol. 30, no. 4, p. 045101, Jan. 2019, doi: 10.1088/1361-6528/aaeddc.
- [5] G. Minor, P. Oshkai, and N. Djilali, "Optical distortion correction for liquid droplet visualization using the ray tracing method: Further considerations," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 18, no. 11, p. L23, Oct. 2007, doi: 10.1088/0957-0233/18/11/L01.
- [6] H. Kim, J. Westerweel, and G. E. Elsinga, "Comparison of Tomo-PIV and 3D-PTV for microfluidic flows," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 24, no. 2, 2013, doi: 10.1088/0957-0233/24/2/024007.
- [7] Y. Hamamoto, J. R. E. Christy, and K. Sefiane, "Order-of-magnitude increase in flow velocity driven by mass conservation during the evaporation of sessile drops," *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 83, no. 5, 2011, doi: 10.1103/PhysRevE.83.051602.
- [8] A. Bribeasa, F. Montoya, P. Hernández, E. Ramos, and G. Corkidi, "Device for experimental characterization of the 4D flow inside an evaporating sessile water droplet," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 91, no. 1, p. 16101, 2020, doi: 10.1063/1.5126112.
- [9] J. Y. Tinevez et al., "TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking," *Methods*, vol. 115, pp. 80–90, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.jymeth.2016.09.016.
- [10] F. Homann, "Der Einfluß großer Zähigkeit bei der Strömung um den Zylinder und um die Kugel," *ZAMM - J. Appl. Math. Mech. / Zeitschrift für Angew. Math. und Mech.*, vol. 16, no. 3, pp. 153–164, Jan. 1936, doi: 10.1002/zamm.19360160304.
- [11] Á. G. Marín, H. Gelderblom, D. Lohse, and J. H. Snoeijer, "Order-to-disorder transition in ring-shaped colloidal stains," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 107, no. 8, Aug. 2011, doi: 10.1103/PhysRevLett.107.085502.