

VIII

CONGRESO
NACIONAL DE
TECNOLOGÍA
APLICADA A
CIENCIAS DE
LA SALUD

15-17
JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS
DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



ENSAYOS BIOLÓGICOS MEDIANTE EVAPORACIÓN DE GOTAS SÉSILES

R. Hernández Pérez, J.L. García-Cordero,

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN- Unidad Monterrey.

rhernandezp@cinvestav.mx, jlgarcia@cinvestav.mx

RESUMEN

En el presente trabajo se presenta un método para desarrollar bioensayos en gotas suspendidas sobre pilares plásticos los cuales son fabricados mediante micro-maquinado. Alternativo a desarrollar el ensayo dentro un recipiente cerrado, aprovechamos la evaporación como una estrategia natural de mezclado. Este método no solo reduce el tiempo total de un ensayo, sino que también aumenta su rango dinámico comparado con el de una gota residiendo sobre una superficie plástica plana. Cada gota funciona como un pequeño reactor donde toma lugar una reacción colorimétrica; durante la evaporación, un movimiento de convección natural provocado por las corrientes de Marangoni mezcla las soluciones en la gota favoreciendo la reacción. Además, la señal es incrementada al concentrar los productos coloreados un área más pequeña facilitando el análisis de imágenes.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad diversas pruebas de detección se desarrollan en placas de pocillos dentro de los cuales se lleva a cabo una reacción que puede ser observada mediante un cambio de color o fluorescencia. En ocasiones la placa debe ser mantenida a ciertas condiciones de temperatura y agitación para favorecer la reacción, evitando la evaporación para no ocasionar errores de medición. Técnicas como esta se han utilizado durante ya varias décadas sin cambios significativos por su utilidad y precisión, pero, con el uso necesario de equipo costoso para realizar una cuantificación [1]. En la búsqueda de alternativas que permitan reducir significativamente el tiempo y el consumo de reactivos, han surgido corrientes que tienden a la miniaturización de sistemas.

El estudio y caracterización de gotas en evaporación no es nuevo desde el punto de vista de la física [2], sin embargo, en años recientes se ha iniciado su uso en el desarrollo de pruebas biológicas, la mayoría de ellas se realizan en chips microfluidicos por producción en serie [3], otros emplean gotas evaporando en espacios abiertos sobre superficies planas o tratadas ingenierilmente para producir rugosidad o microestructuras [4] [5], sin embargo, estos métodos de modificación resultan un tanto complejos.

Nosotros presentamos un dispositivo de simple fabricación cuyo pilar tiene un efecto semejante al de los tratamientos antes mencionados. Las rugosidades en los bordes de nuestro pilar permiten el anclaje de la gota incrementando el volumen soportado en la misma área, de una manera similar al efecto de super-hidrofobicidad [6], además de mantener una línea de contacto constante a lo largo de la evaporación (Figura 1a, b).

2. TEORÍA

Gracias a las propiedades físicas de los fluidos, podemos encontrar características que facilitan su manipulación cuando se encuentra en pequeños volúmenes. En la formación de gotas intervienen fenómenos comunes de capilaridad como la tensión superficial, resultado de fuerzas intermoleculares de las sustancias participantes, la cual puede ser determinada mediante el ángulo

VIII

CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17 JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



de contacto que se forma entre la línea base y la tangente que se forma desde la línea de contacto entre la gota y el sustrato en que reside [7].

Las gotas depositadas sobre nuestros pilares mostraron un ángulo de contacto mucho mayor a su correspondiente volumen en una superficie plana, con ello, podemos conseguir una incrementada relación de volumen/superficie (Figura 1a), lo que puede aumentar la sensibilidad de detección al acumular el analito en un área más reducida tras ser evaporado el solvente que lo contiene. Un ensayo colorimétrico de detección puede ser fácilmente cuantificado mediante análisis de imágenes y métodos de colorimetría.

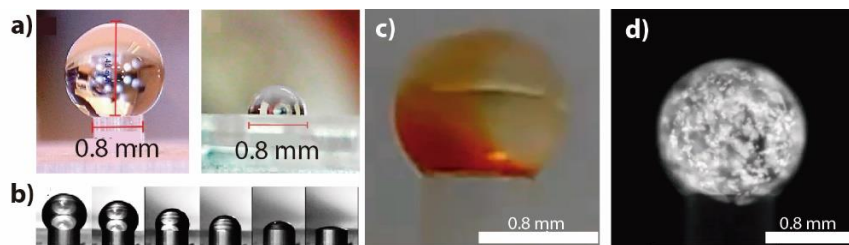


Figura 1. Efectos del pilar. a) Un volumen mayor puede ser soportado sobre la misma área de una superficie plana. b) La gota permanece anclada a los bordes del pilar durante la evaporación. Corrientes convectivas generadas durante la evaporación c) en un ensayo de detección de glucosa y, d) con partículas fluorescentes.

Debido a la tasa de evaporación no uniforme a lo largo de la superficie de la gota, hay gradientes de temperatura y concentración que, producen también gradientes de tensión superficial, lo cual a su vez genera corrientes de Marangoni secundarias que recirculan el líquido hacia el centro de la gota conforme esta se evapora (Figura 1c, d) [8]. De acuerdo a nuestras observaciones, ángulos de contacto más elevados corresponden a un mejor mezclado convectivo y como consecuencia a una mejor cinética de reacción.

Los métodos enzimáticos son específicos, reproducibles, sensibles y rápidos y por lo tanto ideales para propósitos analíticos. El ensayo de glucosa representa un ensayo enzimático basado en la oxidación de glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (catalizado por la glucosa oxidasa) y la subsecuente oxidación del yoduro a yodino (catalizado por la peroxidasa de rábano). La intensidad del color en la transición de incoloro a marrón durante la reacción, indica la cantidad de glucosa presente en la muestra. La evaporación sobre un pilar confina el soluto de la solución a una huella, 10 veces más pequeña que en una superficie plana.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Fabricación de dispositivos.

Se empleó una fresadora de control computarizado (Roland MODELA MDX-40), y brocas de carburo de tungsteno de 2 mm (MexTronics Zanco 1/8"). Se escarbó una placa de PMMA de 1.5 mm de espesor basándonos en un diseño realizado en la aplicación Dr. Engrave. Se operó a 600 rpm, con paso de 0.1 mm y velocidad de corte de 2 mm/s, hasta formar pilares de 1mm de altura, los residuos fueron removidos con gas N₂ a presión.

Ensayo de detección de glucosa

Se preparó una serie de soluciones de; glucosa (Sigma Aldrich, G3660) a 50 mM, 25 mM, 10 mM, 5 mM y 2.5 mM a un pH de 7.5; yoduro de potasio (KI) 0.6 M; peroxidasa oxidasa de rábano/glucosa oxidasa 15 u/mL (HRP/Gox) 5:1 (Sigma Aldrich, 500 units). La solución de enzimas GOx/HRP fue mezclada con la solución de KI a una proporción 10:1 y mantenida a 4°C. Las soluciones de glucosa se llevaron a 25°C antes de la prueba. Las pruebas fueron desarrolladas a 24°C y 50% de humedad. Se colocaron gotas de 2 µL de la mezcla de enzimas y cromógeno

VIII

CONGRESO
NACIONAL DE
TECNOLOGÍA
APLICADA A
CIENCIAS DE
LA SALUD

15-17
JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS
DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



(GOx/HRP/KI) sobre el pilar y se permitió evaporar hasta reducir el volumen a 500 nL (concentración 4x), posteriormente, se agregó sobre esta gota un volumen de 1 μ L de muestra de glucosa. La evolución de la gota es seguida mediante la captura de imágenes cada minuto durante 25 minutos, hasta que el agua ha sido evaporada en su totalidad (Figura 2). La intensidad de color es evaluada mediante el análisis de imágenes.

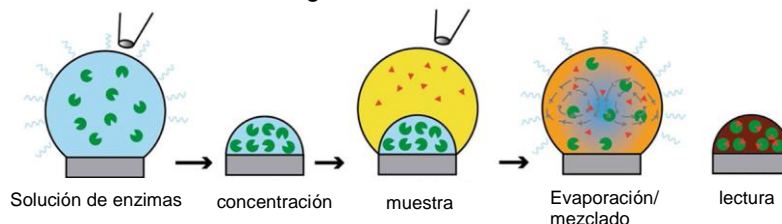


Figura 2. Esquemático de procedimiento para desarrollo de ensayo de glucosa evaporando gotas sobre un pilar.

Ensayo de detección de albúmina

Una solución amortiguadora de citratos 125 mM fue preparada en un 92% agua y 8% etanol en volumen, la solución fue mezclada con una solución de tetrabromofenol azul (TBPB) 9 mM en 95% etanol y 5% agua, a una proporción 10:1. Una gota de 0.8 μ L de esta nueva solución fue colocada sobre uno de los pilares y se permitió su evaporación total bajo la oscuridad, después de esto una gota de 0.8 μ L de la muestra de albúmina de suero bobino (BSA) de diferentes concentraciones, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M y 50 μ M, fue colocada sobre el pilar y se permitió su reacción/evaporación.

Captura y análisis de imágenes

Las imágenes son capturadas cada minuto usando un Microscópio Digital Dinocapture Basic de 3 Mpixeles para capturar la vista superior y con un MicroCapture Pro de 5 Mpixeles (No. 44308,) de perfil. El ángulo de contacto fue evaluado mediante el Plugin drop analysis LB-ADSA de imageJ. Las imágenes en formato .bmp se llevan a escala de grises, la intensidad de color se evalúa mediante el canal Black del espacio de color CMYK.

Discusión de resultados

La relación cuantitativa entre reactivos y productos es comprobada mediante la medición de AC y altura. La solución de enzimas y agente cromógeno a 4°C presenta una tensión superficial que le permite al pilar soportar una gota de 2 μ L, conforme la solución se preconcentra aumenta su temperatura para equilibrarse con la del medio 25°C, y favorecer la actividad enzimática cuando la glucosa es añadida. La curva del cambio de coloración en el tiempo nos muestra la cantidad de producto transformado. A mayor concentración la velocidad y la intensidad del color es mayor de acuerdo al comportamiento descrito por Michaelis Menten.

Cuando se colocan las soluciones para llevar a cabo la detección de glucosa sobre una superficie plana, esta se extiende sobre un área hasta 14 veces mayor a la superficie del pilar, mostrando al final de la evaporación una mayor dispersión de las partículas coloreadas y la marca del efecto coffee ring en la huella que ha dejado la gota al evaporarse (Figura 3c y f). Por otro lado, cuando se emplea un pilar, pero evitando la evaporación no se observa mucho cambio de color a lo largo de veinte minutos. Al comparar los tres métodos se observa que el uso del pilar y la evaporación combinados aumenta la intensidad en el color obtenido (Figura 3a), concentrándolo en una pequeña zona, y eliminando el efecto coffee ring.

VIII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17 JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



En el ensayo de detección de albumina se probó un rango de concentraciones observando un cambio de coloración que de amarillo azul intenso pasando por verde cuya cinética fue correspondiente a la concentración inicial. Para ambos ensayos se observó que el color en la superficie del pilar es más rápido e intenso cuando se llevan a cabo sobre un pilar, mostrando que es posible aprovechar las corrientes generadas y la evaporación para aumentar la señal en una reacción colorimétrica.

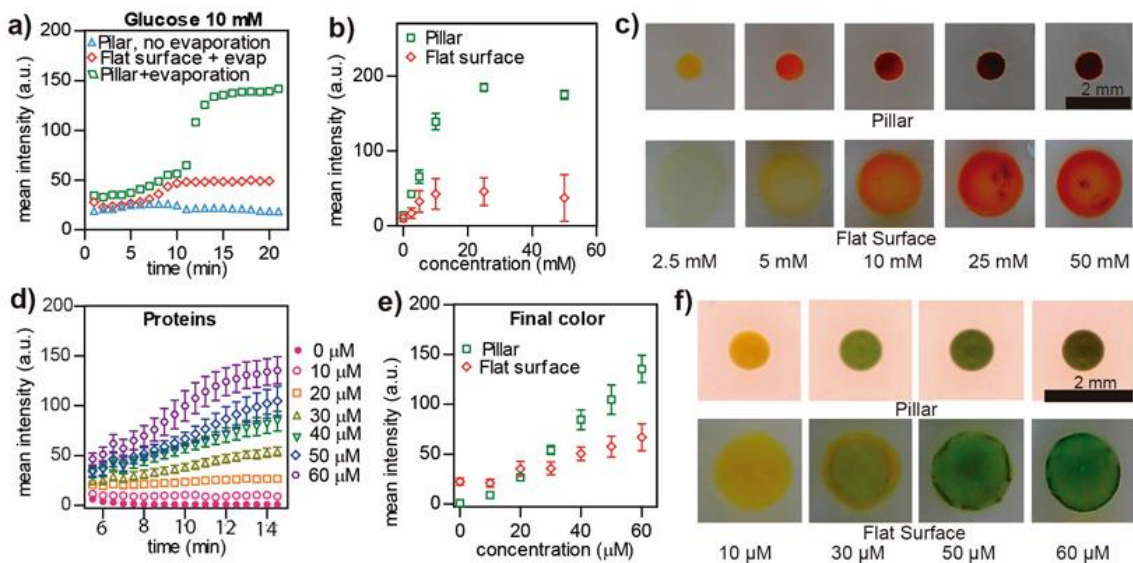


Figura 3. Ensayos colorimétricos de detección de glucosa y proteínas. a) intensidad de color generada a través del tiempo para tres diferentes métodos. b,e) el color final es más intenso para un pilar que para una superficie plana tanto para la prueba de glucosa como para la de proteínas, como lo muestran c, f), sus correspondientes series de imágenes. d) La velocidad de reacción incrementa con la concentración de la muestra.

4. CONCLUSIONES

El uso del pilar incrementa la sensibilidad de detección, y el movimiento convectivo durante la evaporación ayuda a reducir el tiempo de reacción, lográndose obtener resultados en menos de 15 minutos a partir de la aplicación de la muestra. Las concentraciones de glucosa probadas abarcan el rango fisiológico presente en sangre por lo que el método podría ser eficazmente empleado con gotas de suero o plasma sanguíneo. Los resultados son comparados contra una superficie plana y evaporación, y un pilar sin evaporación, confirmando las ventajas en cuanto a sensibilidad del método desarrollado en este proyecto.

Diferentes ensayos podrían ser desarrollados aprovechando las bondades de las gotas, las cuales muestran potencial como técnica de diagnóstico de bajo costo.

VIII

CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17 JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



BIBLIOGRAFÍA

1. P. Banks, “The microplate market past, present and future microplates today – the global market”. *Drug Discovery World* 2009: p. 85-90. A.
2. Langmuir, I., “The Evaporation of Small Spheres”. *Physical Review*, 1918. 12(5): p. 368-370.
3. K. N. Han, C. A. Li, and G.H. Seong, Microfluidic Chips for Immunoassays. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2013. 6: p. 119–41.
4. L.R. Freschauf, et al., Shrink-Induced Superhydrophobic and Antibacterial Surfaces in Consumer Plastics. *PLoS ONE*, 2012. 7(8): p. 40987.
5. J. McLane, Chun Wu, and M. Khine, “Enhanced Detection of Protein in Urine by Droplet Evaporation on a Superhydrophobic Plastic”. *Adv. Mater.*, 2015. 2: p. 1400034-400034.
6. R. Hernandez-Perez, Z. Hugh Fan, and J. L. Garcia-Cordero, “Evaporation-Driven Bioassays in Suspended Droplets”, *Anal. Chem.*, 2016, 88 (14), pp 7312–7317.
7. P.G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quere, *Capillarity and Wetting Phenomena: Drops, Bubbles, Pearls, Waves*. 2013: Springer New York.
8. H. Hu and R.G. Larson, “Analysis of the effects of Marangoni stresses on the microflow in an evaporating sessile droplet”, *Langmuir*, 21(9):3972-80, 2005.