



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD MONTERREY

Transporte iónico y relajación dieléctrica de agua y mezclas
de agua y glicerol en condiciones isocóricas

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Ingeniería y Física Biomédicas

Tesis que presenta

M. en C. Abril Adriana Angulo Sherman

Directora: Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

Índice

Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vii
Índice de Siglas	viii
I Agradecimientos	1
II Resumen	3
III Abstract	5
1 Introducción	7
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo general	15
2.2 Objetivos particulares	15
3 Una vista dieléctrica al proceso de congelamiento y a la preservación en frío	16
3.1 La teoría de Debye y la espectroscopía dieléctrica	17
3.2 De Debye a Havriliak-Negami	19

3.3	La molécula de agua	21
3.4	La molécula de glicerol	27
3.5	Criopreservación celular y preservación en frío	28
4	Metodología	33
4.1	El arreglo experimental	33
4.2	Experimentos con soluciones de agua y glicerol	35
4.3	Experimentos con agua	35
4.4	Preparación de las muestras biológicas	35
4.4.1	Integridad en las membranas de espermatozoides de ratón	35
4.4.2	Viabilidad de <i>Escherichia coli</i>	37
5	Resultados y discusión	38
5.1	Mezclas de agua y glicerol	38
5.1.1	Las mezclas de agua y glicerol en el contexto biológico	45
5.2	Agua bajo presión intrínseca	47
5.3	Daño en las membranas de espermatozoides de ratón	53
5.4	Viabilidad de <i>Escherichia coli</i>	55
6	Conclusiones	58
7	Perspectivas	60
8	Aportaciones	61

Índice de figuras

1.1	Diagrama de fases del agua [6].	8
1.2	Estructuras cristalinas del hielo Ih (a), y el hielo III (b) [6].	9
1.3	Representación del mecanismo de Grotthus a través del mecanismo de Eigen-Zundel-Eigen. Un protón H_3O (izquierda) cede un átomo de hidrógeno a una molécula de agua vecina (centro), la cual se convierte en un nuevo protón H_3O (derecha) [39]. . .	12
3.1	Esquema general de la respuesta dieléctrica en función de la frecuencia del campo eléctrico aplicado [45].	18
3.2	Representación de la molécula de agua. A) Distribución de carga positiva y negativa en la molécula de agua. B) Esquema del momento dipolar en la molécula de agua. . .	22
3.3	Molécula de agua (con los oxígenos en color oscuro, y los hidrógenos en color blanco) formando puentes de hidrógeno con cuatro molécula vecinas. En conjunto forman una estructura tetraédrica [8].	23
3.4	Ilustración del efecto de dos tasas de congelamiento en un cultivo celular. A) Los recuadros 1 al 4 ilustran la evolución temporal usando una tasa de congelamiento lenta, la cual promueve la formación de una estructura cristalina grande en el espacio extracelular que continúa creciendo hasta comprimir las células. B) 1 y 2 esquematizan la evolución temporal usando una tasa de enfriamiento rápida, que provoca una formación uniforme de cristales de hielo pequeños en el espacio intra y extracelular [30].	29
3.5	Pasos que se siguen para lograr el congelamiento de productos bajo condiciones de alta presión [21].	32
4.1	Esquema longitudinal del capacitor cilíndrico que se coloca dentro del bloque de acero.	34

4.2	Esquema longitudinal del bloque de acero con el capacitor en su interior.	34
5.1	Permitividad relativa en función de la frecuencia a diferentes temperaturas para el agua pura. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto. El acercamiento en el recuadro es el punto isopermitivo [1] (por claridad, sólo se muestran los ajustes con los mismos colores que los datos).	39
5.2	Permitividad relativa en función de la frecuencia a 303 K (30°C) para mezclas de agua y glicerol. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto. La curva superior es agua pura (0% glicerol), y la inferior es glicerol puro (100%).	40
5.3	Permitividad relativa en función de la frecuencia desde 283 K a 323 K (10 a 50°C) en intervalos de 10 K para mezclas de agua y glicerol en 90 (a) y 70 wt% (b). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto.	41
5.4	Efecto de la temperatura sobre la intensidad dieléctrica (línea continua) y la viscosidad (línea discontinua) en las mezclas de agua y glicerol medidas desde 283 a 323 K (10 a 50°C).	42
5.5	Módulo dieléctrico de Macedo (M'') en función de la frecuencia desde 283 K a 323 K (10 a 50°C) en intervalos de 10 K para mezclas de agua y glicerol en 90 (a) y 70 wt% (b). En el recuadro se muestra el tiempo de relajación de la conductividad dc en función de la temperatura para la concentración de 90 wt%.	43
5.6	Tangente de la pérdida dieléctrica en función de la frecuencia desde 283 a 323 K (10 a 50°C) en intervalos de 10 K para mezclas de agua y glicerol en 90 (a) y 70 wt% (b). Varias de las curvas isotermas siguen un comportamiento hiperbólico común en la conducción iónica [82] (ver los recuadros de (a) y (b)). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto.	44
5.7	Permitividad relativa en función de la frecuencia, desde 277 K a 239 K (4 a -34°C) en intervalos de 2 K para (a) el agua y (b) el hielo lh. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto.	48
5.8	Tangente de la pérdida dieléctrica en función de la frecuencia, desde 277 K a 239 K (4 a -34°C) en intervalos de 2 K para (a) el agua y (b) el hielo lh. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto.	49

5.9	Tiempos de relajación dieléctrica en función del inverso de la temperatura para el agua (círculos rojos) y el hielo Ih (cuadros negros). El recuadro muestra la sección transversal del capacitor con el agua rodeada por capas delgadas de hielo Ih y hielo III.	51
5.10	Sección del diagrama de fases del agua en el rango de presión y temperatura usado en este trabajo [75].	52
5.11	Porcentaje promedio de espermatozoides sin daño en la membrana después de ser almacenados en recipientes de acero, aplicando tres condiciones de almacenamiento distintas: 293 K en el exterior (20°C) (negro), 253 K (−20°C) permitiendo la expansión de la muestra (rojo); y 253 K (−20°C) restringiendo el volumen de la muestra (no hay expansión) (azul).	54
5.12	Viabilidad promedio de <i>E. coli</i> después de almacenar las muestras en recipientes de acero, aplicando tres condiciones de almacenamiento distintas: 293 K (20°C) en el exterior (negro), 253 K (−20°C) permitiendo la expansión libre de la muestra (rojo); y 253 K (−20°C) restringiendo el volumen de la muestra (no hay expansión) (azul).	57

Índice de tablas

5.1	Parámetros de ajuste obtenidos usando la ecuación 3.7 para el agua bajo presión intrínseca a varias temperaturas	50
-----	--	----

Índice de Siglas

<i>CICUAL</i>	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Cinvestav
<i>EMB</i>	Agar con eosina y azul de metileno (del inglés Eosin Methylene Blue)
<i>LB</i>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<i>LCR</i>	Medidor de inductancia capacitancia y resistencia
α	Asimetría del espectro dieléctrico
β	Anchura del espectro dieléctrico
$\Delta\epsilon$	Intensidad dieléctrica
ϵ^*	Permitividad compleja
ϵ'	Permitividad relativa
ϵ''	Factor de disipación dieléctrica
$\tan(\delta)$	Tangenete de la pérdida dieléctrica
σ_{cc}	Conductividad en corriente continua
τ	Tiempo de relajación
ω	Frecuencia angular

Agradecimientos

Quiero agradecer:

A la Dra. Hilda Mercado por darme la oportunidad de continuar bajo su dirección durante el doctorado, por su asesoría, paciencia y disposición, pero principalmente por su apoyo constante y sincero interés a lo largo de mi formación profesional, que logró trascender a lo personal.

A mis sinodales, el Dr. Humberto Saint-Martin, el Dr. Gabriel A. Caballero Robledo, el Dr. Arturo Chávez Reyes, el Dr. Héctor M. Garnica Garza y el Dr. Jesús G. Rodríguez González, por las aportaciones realizadas a mi tesis doctoral, las cuales fueron de gran utilidad para obtener un trabajo de calidad.

Al CINVESTAV Unidad Monterrey, al Dr. Bruno Escalante Acosta por apoyarme económicamente durante el primer año del doctorado. Su respaldo fue fundamental.

Al Dr. Daniel Sánchez Herrera, por respaldarme en las gestiones administrativas que sucedieron al inicio del doctorado.

Al CINVESTAV Unidad Monterrey por permitir mi desarrollo científico y profesional a lo largo de estos 4 años.

Al personal, profesores y compañeros, que constituyen al CINVESTAV Unidad Monterrey, por

contribuir a mi formación profesional a lo largo de estos años.

Al Sr. Jorge Saldaña por su gran desempeño en la construcción de los dispositivos diseñados para la realización de este trabajo.

A los M. en C. Sandra Villarreal y Eduardo Sosa por compartir su experiencia en el desarrollo de experimentos biológicos y las valiosas discusiones.

Al CONACyT por el apoyo económico brindado para realizar el doctorado.

Al proyecto 154202 del CONACyT.

A mi familia, por sus enseñanzas y respaldo incondicional, así como su compromiso en mi desarrollo profesional. Por enseñarme a no claudicar cuando hay dificultades y a ser fiel a lo que me inspira. Principalmente por su cariño.

A mi esposo Marco Vinicio y a mi hijo Marco Venicio, por ser la inspiración y motivación diaria para seguir adelante. Por llenar mis días de alegría.

Resumen

El agua es la sustancia más estudiada en la Tierra. Sin embargo, no se comprende completamente cómo es que sus propiedades dinámicas y estructurales ocasionan algunos comportamientos anómalos. Algunos de estos surgen cuando se realizan experimentos a bajas temperaturas y/o altas presiones. Por otro lado, el estudio del agua a temperaturas bajas es de relevancia biológica cuando se exploran sus interacciones con criopreservadores, como el glicerol. Para estudiar el agua y mezclas de agua y glicerol, se ha utilizado extensivamente como una opción, la espectroscopía dieléctrica. Esta es la técnica que se usó en el presente trabajo para investigar el comportamiento de dichas sustancias en el rango de frecuencias bajas (menores a 1 MHz), por dos razones: I) esta es la escala de tiempos donde ocurre el transporte iónico en las células de organismos que salen del proceso de hibernación, y II) aunque la polarización de los electrodos (que se manifiesta en frecuencias por debajo de 1 kHz), se considera normalmente como un efecto geométrico indeseable, hasta ahora no se había realizado un estudio detallado de cómo cambia este fenómeno en función de la temperatura y la concentración. En este trabajo se llevaron a cabo mediciones dieléctricas a temperaturas altas (283 - 323 K (10 - 50°C)) en mezclas de agua y glicerol, y bajas temperaturas (239 - 277 K (-34 - 4°C)) en agua pura. En ambos casos, en condiciones macroscópicas de confinamiento, esto es, la muestra en un contenedor grande que mantiene su volumen constante, y por lo tanto, no puede congelarse por debajo del punto de fusión. En el caso del agua pura, esto inhibe la formación de hielo Ih, al cual se le atribuye el daño biológico que sucede en bajas temperaturas. Para comprobar si el daño puede evitarse cuando no se forma hielo, se realizaron experimentos con dos muestras biológicas: espermatozoides de ratón y *Escherichia coli*. Los resultados de la presente tesis para los diferentes experimentos mencionados fueron que, en concentraciones altas de glicerol (90 y 70wt%), donde la viscosidad de la mezcla es grande, sigue presentándose el transporte de cargas. Por otra parte, en el caso del agua pura, las condiciones de presión intrínseca durante el confinamiento macroscópico ocasionan que el pico de relajación α del agua se recorra a frecuencias similares a las del hielo Ih. Además, a 267 K (-6°C)

se puede observar una respuesta peculiar que puede atribuirse al mecanismo de Grotthuss. También se encontró que en 251 K (-23°C), donde sucede el punto triple (agua - hielo Ih - hielo III), las condiciones de presión intrínseca provocan la formación de una capa de hielo III. De esta manera, se ha encontrado una nueva vía para obtener esta fase del agua. Finalmente, los resultados de las muestras biológicas sugieren que al no formarse hielo Ih, la membrana celular no presenta daño en los espermatozoides, aunque la presión que se alcanza en estos contenedores durante los experimentos es suficiente para exterminar a *E. coli*.

Abstract

Water is the most studied substance on Earth. However, it is not completely understood why its structural and dynamical properties give rise to some anomalous behaviors. Some of them emerge when experiments at low temperatures and/or high pressures are performed. Water under low temperatures conditions has also been of biological relevance especially in its interactions with cryopreservers such as glycerol. One of the most used techniques to study glycerol-water mixtures and pure water is dielectric spectroscopy, the technique we used here to explore the range of low frequencies. This for two main reasons: I) although electrode polarization, occurring at frequencies below 1 kHz, is normally considered as a geometrical non-desirable effect, a detailed study of how it behaves with temperature and concentration has not been pursued, and II) this is the interval where the ionic transport takes place in biological cells of organisms that come out from hibernation, and is also the time scale of action potentials. In this work, the dielectric measurements of two groups of experiments were done: firstly, glycerol-water mixtures (283 - 323 K (10 - 50°C)), and then, experiments at low temperatures (239 - 277 K (-34 - 4°C)) in pure water under macroscopically constrained conditions, i.e., water in a large container at constant volume that cannot freeze below the melting point. This avoids ice Ih, which is believed to cause biological freeze damage. In order to prove if the damage was actually avoided we tested restricted volume conditions with two biological samples: mouse spermatozooids and *Escherichia coli*. The results of the above experiments were that even at high glycerol concentration; where the viscosity of the mixture is large, charge transport can still take place. Also, that the inner pressure in macroscopically constrained conditions shifts the water α relaxation peak to similar frequencies as seen in ice Ih. At 267 K (-6°C) we observe a peculiar response possibly due to the Grotthuss mechanism. It was found that at 251 K (-23°C), where the triple point of water - ice Ih - ice III exists, the intrinsic pressure forms ice III, which is a new way to obtain this water's phase. Finally, the results in biological samples suggest that as there is no ice Ih nucleation, cell membrane damage is neglected in spermatozooids, although the pressure achieved in these containers during the

experiment does causes cell death in E. coli.

Capítulo 1

Introducción

El agua es una sustancia de gran relevancia biológica, fundamentalmente porque sus interacciones atómicas y moleculares la hacen un excelente solvente. Además, es la sustancia más abundante en la tierra, y también es la más estudiada [1]. Su relevancia mantiene una estrecha relación con la forma en que sus moléculas interactúan a través de enlaces conocidos como puentes de hidrógeno. Es gracias a estas interacciones, a su pequeño tamaño molecular y a su polaridad, que el agua tiene propiedades especiales, usualmente llamadas *anómalas* [2, 3]. Se han hecho múltiples estudios para comprender más estas anomalías. Los primeros trabajos iniciaron en el siglo XVIII con los experimentos de Canton acerca de la incompresibilidad del agua y de las soluciones acuosas [4, 5]. Hoy en día continúan las investigaciones sobre la estructura y dinámica del agua, y aún no es claro porque sus propiedades físicas le confieren ese comportamiento anómalo, que en parte se puede manifestar cuando se realizan experimentos a temperaturas bajas y/o presiones altas. Este tipo de experimentos han resultado en un vasto diagrama de fases para el agua, como se observa en la figura 1.1 [6], que muestra once puntos triples estables y hasta quince estructuras cristalinas conocidas de hielo, cada una con distintas propiedades físicas (en contraste, los diagramas de fases de otras sustancias son más simples [3, 7]).

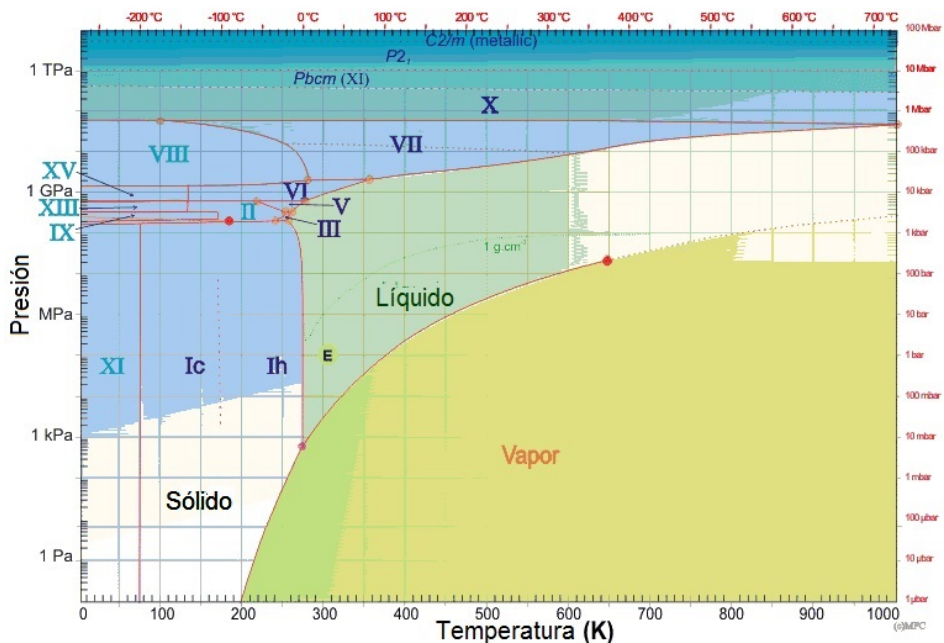


Figura 1.1. Diagrama de fases del agua [6].

Una propiedad anómala del agua es el cambio de densidad cuando se congela [2]. Para llegar a este estado, las moléculas se reacomodan cambiando la longitud y el ángulo de sus puentes de hidrógeno. La densidad del hielo depende de la estructura geométrica, la cual a su vez obedece a las condiciones de presión y temperatura durante el proceso de congelamiento. Usemos como ejemplo a la estructura de hielo más abundante en la naturaleza, el hielo I hexagonal (Ih), que se forma en condiciones de presión ambiental y a una temperatura de 0°C. Este hielo posee una densidad menor a la del agua, porque cuando las moléculas se ordenan en su forma hexagonal característica, ocupan un volumen mayor comparado con la estructura tetragonal del estado líquido [8]. Es posible conservar al agua en su estado líquido si se aplica presión mientras la temperatura desciende. Entonces la presión obliga a las moléculas a mantener una estructura menos ordenada. También es posible evitar la cristalización del agua en hielo Ih sin cambiar la presión, este estado se llama agua superfría, y se logra al bajar la temperatura utilizando una tasa de enfriamiento de aproximadamente 10^6 °C/s [9–11]. Tal rapidez de enfriamiento provoca que el líquido permanezca en un estado de equilibrio precario, y que ante cualquier perturbación sufra una transición vítrea. Para estudiar las fases cristalinas del agua (ver

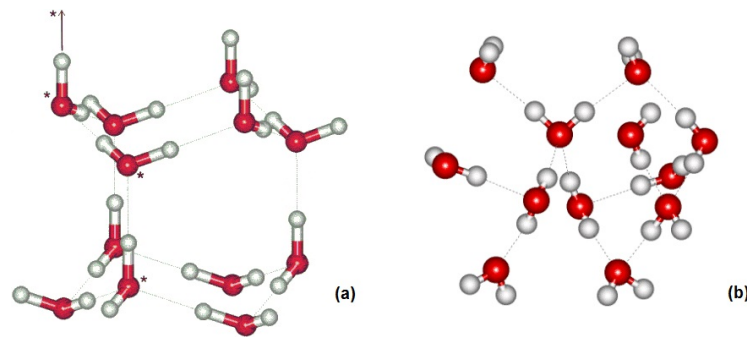


Figura 1.2. Estructuras cristalinas del hielo Ih (a), y el hielo III (b) [6].

figura 1.1), que no son Ih, usualmente se aplican presiones considerables (alrededor de varios cientos de MPa 1.1) a través de un pistón y de gases a temperaturas bajas [12–18].

Existen diferentes métodos para obtener una misma estructura cristalina, por ejemplo, el hielo III, que es una estructura tetragonal ($P4_12_12$ [7]), ver figura 1.2(b), se obtiene generalmente de tres formas: enfriando el líquido a una presión de 300 MPa, calentando hielo II a una presión de 300 MPa, o descomprimiendo hielo V a 1°C . El hielo III es de particular interés porque es la estructura más cercana al hielo Ih, que es un arreglo cristalino hexagonal ($P6_3/mmc$ [7], ver figura 1.2(a)), ambos comparten un punto triple junto con el estado líquido. Por lo anterior, dicho punto es una frontera relevante para ciertos procesos de congelamiento biológico [19–21].

Antes de ahondar en lo que sucede biológicamente durante el congelamiento, es importante recalcar que las funciones biológicas son posibles solamente en la presencia del agua, la cual es necesaria para la dinámica celular, y tiene un papel relevante en la estabilidad y flexibilidad de las biomoléculas [22–25]. De hecho, se han realizado muchos estudios para comprender el mecanismo de las interacciones del agua con las proteínas, evaluando la influencia del nivel de hidratación en la conformación proteica [22]. Esto depende fundamentalmente de las interacciones a través de los puentes de hidrógeno, que a su vez determinan las propiedades anómalas y la estructura de los hielos. Las características de estas estructuras deben incluirse al estudiar el daño durante el congelamiento celular, así como también las condiciones de temperatura y presión necesarias para cada una de las

estructuras [19, 20].

El daño celular durante el congelamiento sucede porque las condiciones de temperatura y presión favorecen la formación de hielo Ih. Como se mencionó previamente, la diferencia en la densidad entre el hielo y el agua ocasiona un incremento en el volumen del líquido cuando se congela. Tal aumento es el responsable de que las células experimenten un estrés mecánico en la membrana, suficiente como para romperla y provocar deshidratación. Por otra parte, la formación de hielo extracelular conduce a un desequilibrio en las concentraciones osmóticas celulares que eventualmente producen también deshidratación celular [26–29].

El estudio de las propiedades y dinámica del agua se ha explorado también indirectamente a partir del hielo, por ejemplo, la propagación de las señales eléctricas en este medio. Este proceso es relevante para que se lleven a cabo la gran diversidad de funciones biológicas. A pesar de que el desplazamiento de cargas puede suceder tanto en el hielo como en el agua, biológicamente se requiere que esta última se encuentre en su estado líquido. Por este motivo, algunos organismos han desarrollado una gran variedad de mecanismos para sobrevivir y soportar las condiciones de estrés ocasionadas por el frío. Una de las adaptaciones bioquímicas más importantes, es el uso de moléculas orgánicas de bajo peso molecular y de criopreservadores, entre los cuales destaca el glicerol, un alcohol que es uno de los responsables de que algunas especies de peces, plantas, insectos y anfibios desarrollen tolerancia al congelamiento [26–30]. Un criopreservador impide la formación de cristales de Ih, desorganizando la red que se establece a través de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua. El glicerol disuelto en agua juega un papel biológicamente importante, ya que además de mantener la estructura de las macromoléculas, participa en el transporte de cargas y promueve el auto-ensamblaje de las proteínas [31, 32]. Ello depende de las interacciones por medio de puentes de hidrógeno entre agua y glicerol, así como la forma en que este último rompe con la estructura característica del agua [25, 33–35]. Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales el agua y el glicerol se estructuran por puentes de hidrógeno, no están totalmente claros, ni la forma

en que la concentración influencia las propiedades criopreservadoras.

Una criopreservación exitosa depende fundamentalmente de la forma en que se interrumpe la estructura cristalina del hielo Ih. Un método para desorganizar esta fase del hielo es aplicar presión, y ha sido implementado para preservar muestras biológicas, aún así, no se le considera una técnica de criopreservación, porque los productos almacenados reciben daños que no permiten la recuperación de cultivos. Aplicar presión en condiciones especiales de organización molecular, pudiera evitar algunos de los daños que se derivan del aumento de volumen durante el congelamiento. Sin embargo, se sabe que aplicar presión de forma excesiva también daña a las moléculas biológicas, causando desnaturalización, coagulación y gelificación sobre las proteínas, los almidones y los ácidos nucleicos, por modificaciones en los enlaces no covalentes [20]. A pesar de esto, en las últimas décadas se han desarrollado tecnologías en la industria de alimentos que implementan el uso de presión para preservar productos, obteniendo una mejor calidad en comparación con métodos criopreservativos [20,36]. En estos casos, primero se aplica presión y luego se enfría súbitamente [20,21]. Las temperaturas y presiones que se utilizan son específicas, y comprenden precisamente la región del diagrama de fases donde coexisten el estado líquido y los hielos Ih y III, evitando siempre aquellas condiciones que permiten la formación del último.

El estudio a nivel molecular de la interacción agua-glicerol se puede llevar a cabo con diferentes técnicas, entre ellas destaca la espectroscopía dieléctrica, que ha demostrado ser una técnica poderosa para investigar el comportamiento molecular del agua a través de los tiempos de relajación dieléctrica. Estos tiempos proveen información acerca de procesos cooperativos, viscosidad del medio y, en general, propiedades estructurales de la red molecular que se puede formar [16,23]. En nuestro caso, nos interesan los tiempos que suceden en la región de frecuencias donde se conoce que ocurren procesos iónicos y dipolares ($10^2 - 10^5$ Hz). Para el caso particular de muestras que contienen agua, la comprensión ha avanzado gracias a la inclusión de dos modelos físicos: la teoría de Debye, que indica que los momentos dipolares de las moléculas se orientan en la dirección del campo eléctrico, y el

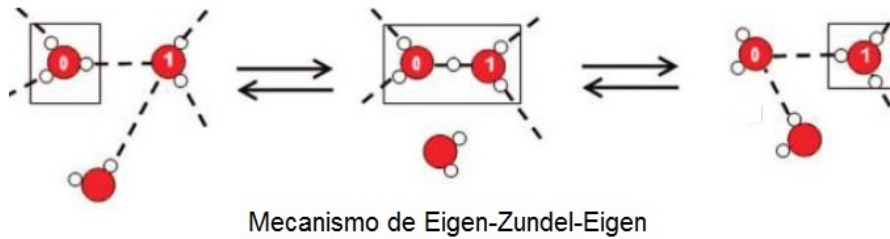


Figura 1.3. Representación del mecanismo de Grotthus a través del mecanismo de Eigen-Zundel-Eigen. Un protón H_3O (izquierda) cede un átomo de hidrógeno a una molécula de agua vecina (centro), la cual se convierte en un nuevo protón H_3O (derecha) [39].

mecanismo de Grotthus, que explica la transferencia de protones. El mecanismo de Grotthus visualiza a las moléculas de agua como cadenas unidas a través de puentes de hidrógeno, donde los protones se transportan virtualmente [37, 38], por medio de la formación momentánea de iones Eigen (H_3O) y Zundel (H_5O_2), como lo ilustra la figura 1.3 [39]. Para ello, las moléculas de agua rompen los enlaces que las mantenían unidas para posteriormente formar nuevos puentes de hidrógeno, dando como resultado una cadena donde las moléculas de agua adquieren una nueva orientación. En el caso del hielo, se considera que para que se lleve a cabo este proceso, se requieren defectos estructurales conocidos como iónicos y de Bjerrum a lo largo del arreglo cristalino [40, 41]. Tales defectos junto con el mecanismo de Grotthus, permiten el desplazamiento de cargas sin requerir difusión iónica, lo que justifica la conducción en el hielo.

Uno de los intereses de este trabajo fue estudiar la respuesta iónica de mezclas de agua y glicerol, en particular, su dependencia en función de la temperatura y la concentración de glicerol. Debido a que la membrana celular puede modelarse como un capacitor de placas paralelas, y que las células pueden ser descritas como circuitos eléctricos que funcionan en el orden de kHz, nuestro interés es estudiar el cambio en las propiedades dieléctricas en esta región de frecuencias. La propuesta es que existe relación entre los procesos de relajación en bajas frecuencias ($10^2 - 10^4$ Hz) y el mecanismo de supervivencia para enfrentar las condiciones de frío extremo de especies que utilizan altas concentraciones de glicerol. Para poder estudiar estos procesos se utilizó la técnica de espectroscopía dieléctrica.

Por otra parte, otros experimentos realizados en este trabajo consistieron en analizar la región donde ocurre la transición de fase del estado líquido al sólido del agua, y explorar su comportamiento dieléctrico restringiendo el cambio de volumen mientras la temperatura desciende y la presión aumenta, evitando la cristalización en hielo Ih. Cabe recalcar que hasta antes de este trabajo, no existían estudios utilizando la técnica de espectroscopía dieléctrica del agua bajo estas condiciones. La inhibición en la cristalización del agua cobra particular relevancia si se considera que el mecanismo de preservación puede lograrse sin usar criopreservadores, por ejemplo, aplicando presión externa en la muestra. Este último punto es interesante porque el método utilizado hasta ahora implica hacerlo por pasos, es decir, aplicando primero presión externa a la muestra, y posteriormente bajando la temperatura. Es en base a lo anterior que la presente tesis se enfoca en tres aspectos:

1. El estudio del agua en la región donde ocurre de la transición de fase de líquido a sólido, considerando el efecto de la presión que se genera en la muestra cuando el contenedor no cambia su volumen, lo que denominaremos presión intrínseca de la muestra.
2. El estudio de las interacciones del agua con el anticongelante glicerol en un rango amplio de temperaturas (de 283 a 323 K (10 a 50°C)), donde es posible apreciar el transporte iónico para frecuencias (de 10^2 a 10^5 Hz) asociadas a señales biológicas (por debajo de ese rango de temperaturas sucede en frecuencias más bajas).
3. La investigación de un proceso de preservación en bajas temperaturas (< 273 K ($< 0^\circ\text{C}$)) alterno, similar al usado para alimentos, que utiliza contenedores en los que la presión aumenta conforme la temperatura disminuye, siguiendo la línea de transición de fase entre el agua y el hielo Ih.

En el siguiente capítulo se plantean el objetivo general y los objetivos particulares de esta tesis. En el capítulo 3 se presentan los conceptos fundamentales relacionados con el estudio de las propiedades del agua usando la técnica de espectroscopía dieléctrica. Se exponen aspectos relacionados con la

molécula del agua y su congelamiento. Así como del glicerol y su interacción con las moléculas del agua. En la última sección se tratan los aspectos generales del proceso de criopreservación de cultivos de espermatozoides y bacterias, además de ahondar en la técnica de congelamiento en altas presiones. En el capítulo 4 se describe el arreglo experimental utilizado en este trabajo para el estudio de las propiedades dieléctricas del agua y las diferentes mezclas de glicerol. Se describe también el experimento realizado bajo condiciones isocóricas en dos muestras celulares diferentes. En el capítulo 5 se presentan los resultados obtenidos, los cuales son discutidos posteriormente en el capítulo 6.

Capítulo 2

Objetivos

2.1 Objetivo general

Estudiar el transporte iónico y la relajación dieléctrica en un rango de frecuencias de 10^2 a 10^5 Hz de agua y mezclas de agua y glicerol en condiciones isocóricas.

2.2 Objetivos particulares

1. Estudiar el transporte iónico y la relajación dipolar en el agua en la región de transición de fase de líquido a sólido, en condiciones isocóricas (volumen restringido), a través de la técnica de espectroscopía dieléctrica.
2. Estudiar las interacciones iónicas y dipolares en mezclas de agua con el criopreservador glicerol en un rango de temperaturas de 283 a 323 K (10 a 50°C).
3. Investigar si en condiciones isocóricas y bajas temperaturas, es posible evitar los efectos nocivos del hielo Ih en células biológicas.

Capítulo 3

Una vista dieléctrica al proceso de congelamiento y a la preservación en frío

La técnica de espectroscopía dieléctrica es una herramienta útil para estudiar los procesos iónicos y moleculares relevantes para procesos biológicos. La técnica se ha utilizado para el estudio de interacciones entre moléculas biológicas y el agua [32], y para investigar la conductividad en el hielo [42]. En condiciones ambientales de muy bajas temperaturas que ocasionan la formación de hielo en la célula, las repercusiones son letales. Cuando se forma hielo en el medio extracelular, se propicia un desequilibrio osmótico que ocasiona la salida del agua de la célula provocando eventualmente su deshidratación [26–29]. Además, la diferencia de densidad entre el agua y el hielo puede causar suficiente estrés mecánico para romper la membrana celular. Para evitar los efectos nocivos del hielo, algunos seres vivos utilizan moléculas criopreservadoras, las cuales impiden la formación de la estructura del hielo I_h. Existen otras formas de hacerlo, por ejemplo, aplicando presión. Se sabe que aplicar presión externa puede evitar el daño celular debido al congelamiento [19–21]. Esto

ha sido implementado en la industria de alimentos, alternando cambios de temperatura y presión externa. En este trabajo se utiliza una variación simultánea de presión y temperatura empleando un contenedor que no permite el cambio de volumen. Al impedir el cambio de volumen, el descenso en la temperatura ocasiona un incremento en la presión intrínseca, suficiente para mantener al agua en su estado líquido [43]. En este capítulo se presentan los fundamentos de la técnica de espectroscopía dieléctrica y la teoría de Debye, debido a que utilizamos las ecuaciones de Havriliak-Negami para describir el comportamiento dieléctrico de sustancias como agua pura y mezclas de glicerol, y para obtener los tiempos de relajación característicos de estas muestras. Por último, se explica brevemente el proceso de criopreservación en espermatozoides y el congelamiento a alta presión, que se utiliza en la industria de alimentos. Ambas técnicas evitan el daño en la membrana debido al congelamiento, sin embargo, el congelamiento a alta presión no permite la recuperación de cultivos celulares.

3.1 La teoría de Debye y la espectroscopía dieléctrica

De acuerdo con la teoría expuesta por Debye, un dieléctrico es un material que puede modelarse por partículas esféricas con un momento dipolar característico asociado a ellas. En algunos materiales, los momentos dipolares se encuentran orientados de forma aleatoria, de tal manera que al sumarlos dan como resultado un momento dipolar total igual a cero. Cuando un dieléctrico es colocado en un capacitor y se aplica un campo eléctrico externo (\vec{E}) entre los electrodos, los momentos dipolares cambian de dirección paulatinamente orientándose en la dirección del campo, haciendo que el momento del material sea diferente de cero. La orientación de los momentos dipolares promueve que una mayor cantidad de dipolos se orienten en la misma dirección al paso del tiempo. Cuando el campo deja de ser aplicado, los momentos dipolares se acomodan aleatoriamente resultando nuevamente en un momento total igual a cero. A este proceso se le conoce como proceso de relajación y el tiempo que demora se conoce como tiempo de relajación (τ). Precisamente, la magnitud de la constante dieléctrica, k' (la facilidad con que los momentos dipolares se orientan) del material, depende de la

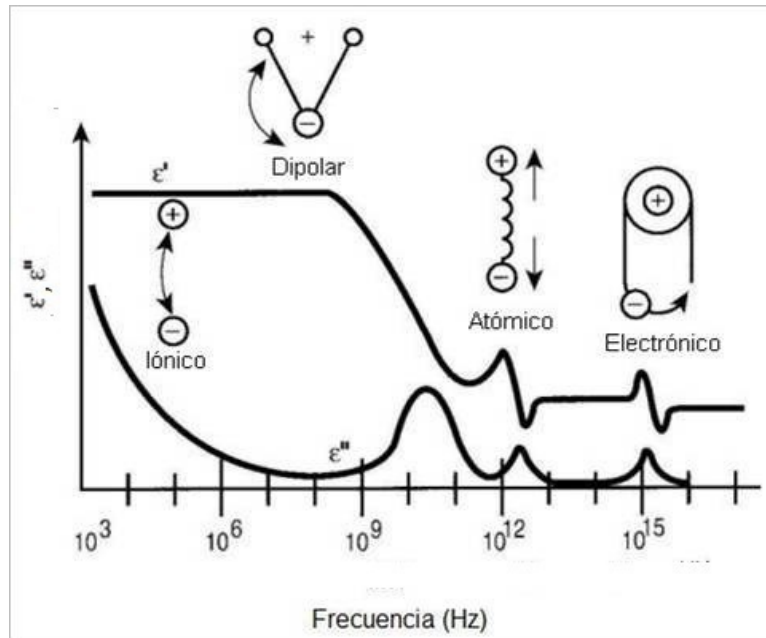


Figura 3.1. Esquema general de la respuesta dieléctrica en función de la frecuencia del campo eléctrico aplicado [45].

frecuencia del campo eléctrico aplicado [44]. Ésta y las variaciones de los tiempos de relajación, son los que permiten entender diferentes aspectos de las interacciones intra e intermoleculares. Existen cuatro procesos de relajación dieléctrica que predominan en diferentes regiones de frecuencia. La figura 3.1 [45] ilustra las frecuencias donde cada proceso dieléctrico es predominante, y su efecto en el comportamiento de la parte real (ϵ') e imaginaria (ϵ'') de la permitividad (ϵ^*), cuyas características, se verán en la siguiente sección.

Para frecuencias inferiores a las decenas de kHz dominan los procesos iónicos, esto es, la migración de iones a través del material. Enseguida se encuentra la región de frecuencias en la que sucede predominantemente una respuesta dipolar, de $10^4 - 10^{10}$ Hz, la cual está asociada con la orientación del campo eléctrico de los momentos dipolares presentes en las moléculas del material de estudio. Posteriormente, en frecuencias cercanas a centenas de GHz la influencia de los procesos atómicos es mayor, los diferentes átomos que conforman a una molécula poliatómica se desplazan relativamente entre ellos cambiando la longitud del enlace que los mantiene unidos. Por último, en frecuencias

superiores a los cientos de THz dominan los procesos electrónicos, en donde en cada átomo cambia la distribución de la nube electrónica con respecto a su núcleo, y la nube de electrones se aleja de él [46]. El último par de descripciones ilustran claramente lo que sucede en un sólido, cabe aclarar que en el caso del agua en estado líquido, en las contribuciones atómicas, sus modos normales de vibración se ven excitados, esto afecta sus interacciones con moléculas vecinas, por ejemplo en sus arreglos diméricos y triméricos [47]. Por otro lado, las contribuciones electrónicas se refieren a la polarizabilidad electrónica que se suscita entre los átomos de cada molécula de agua, afectando su respectivo momento dipolar. El espectro de frecuencias de estudio en la espectroscopía dieléctrica resulta muy amplio, está limitado solo por las características del equipo que se utiliza para medir y el fenómeno de interés que se desea analizar, este último fuertemente relacionado con la estructura química del material [48–58].

3.2 De Debye a Havriliak-Negami

La teoría de Debye permite estudiar la dinámica molecular de un material a partir de la permitividad compleja (ϵ^*) y de los procesos de relajación. Éstos se determinan evaluando el factor de disipación dieléctrica (ϵ'') y la permitividad relativa (ϵ') que es directamente proporcional a k' . ϵ' y ϵ'' corresponden a los argumentos real e imaginario de ϵ^* , como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon'' \quad (3.1)$$

En cada proceso de relajación que sigue un comportamiento de Debye, la permitividad compleja [44] se escribe:

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + i\omega\tau}, \quad (3.2)$$

y sus componentes, que se calculan utilizando el conjugado de la ecuación (3.2), se expresan mediante

las ecuaciones [44]:

$$\epsilon' = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_s - \epsilon_{\infty}}{1 + \omega^2 \tau^2}, \quad (3.3)$$

$$\epsilon'' = \left(\frac{\epsilon_s - \epsilon_{\infty}}{1 + \omega^2 \tau^2} \right) \omega \tau, \quad (3.4)$$

donde ϵ_{∞} es la permitividad instantánea del material medida cuando la frecuencia angular ω ($\omega = 2\pi f$) es muy grande, ϵ_s es la permitividad estática medida cuando ω es muy pequeña, $\epsilon_s - \epsilon_{\infty} = \Delta\epsilon$ es la intensidad dieléctrica y se refiere a la permitividad debida a la contribución de los momentos dipolares, y τ es el tiempo de relajación característico. Esta aproximación es válida para una sustancia ideal (constituida por moléculas esféricas con momentos dipolares permanentes), por lo que resulta común encontrar otros tipos de aproximaciones basadas en la de Debye, que incluyen los factores de corrección α y β (exponentes relacionados con el grado de asimetría y la anchura del espectro, respectivamente), los cuales toman valores específicos tales que $0 < \alpha < 1$ y $\alpha\beta \leq 1$. Entre estas aproximaciones se encuentra la de Havriliak-Negami [59]:

$$\epsilon^* = \epsilon_{\infty} + \frac{\Delta\epsilon}{(1 + i(\omega\tau)^{\alpha})^{\beta}}, \quad (3.5)$$

donde el proceso de relajación se encuentra representado por una intensidad dieléctrica ($\Delta\epsilon$) y posee, como se mencionó antes, su propio tiempo de relajación τ . Esta ecuación puede extenderse para incluir varios procesos de relajación, cada uno con sus respectivos $\Delta\epsilon$, τ , α y β , como lo muestra la ecuación (3.6):

$$\epsilon^* = \epsilon_{\infty} + \sum_1^n \frac{\Delta\epsilon_n}{(1 + i(\omega\tau_n)^{\alpha_n})^{\beta_n}}. \quad (3.6)$$

En un estudio reciente [60] que utiliza a la molécula de glicerol como modelo de una molécula pequeña con un momento dipolar, se usó una aproximación del tipo Havriliak-Negami (ecuación (3.7)) para describir una región de frecuencias donde suceden los procesos iónicos y dipolares. Esta aproximación es la que usaremos más adelante, y está dada por la siguiente expresión:

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \frac{\Delta\epsilon_1}{(1 + (i\omega\tau_1)^{\alpha_1})^{\beta_1}} + \frac{\Delta\epsilon_2}{(1 + (i\omega\tau_2)^{\alpha_2})^{\beta_2}} + \frac{\sigma_{cc}}{i\omega\epsilon_0}, \quad (3.7)$$

donde el subíndice 1 representa a la polarización de electrodos (EP) causada por los procesos iónicos, y se refiere al desplazamiento de las cargas a lo largo de la muestra y la posterior acumulación de las mismas sobre la superficie de los electrodos. El segundo proceso de relajación corresponde a la relajación dipolar. σ_{cc} es la conductividad del medio cuando la frecuencia es infinitamente pequeña, y ϵ_0 es la permitividad en el vacío.

3.3 La molécula de agua

Esta molécula se encuentra constituida por dos átomos de hidrógeno unidos de forma covalente a uno de oxígeno, como se esquematiza en la figura 3.2. La longitud de los enlaces es de 0.09572 nm y el ángulo de separación que se forma entre los hidrógenos es de 104.52° [61]. La molécula tiene distribución asimétrica de las cargas, debido a la electronegatividad del oxígeno que ocasiona que ésta tenga una región cargada positivamente y otra negativa, que es la predominante, por lo que la molécula tiene un momento dipolar asociado, y sus interacciones pueden ser descritas por la aproximación de Debye.

El agua es una sustancia de gran relevancia debido a sus propiedades únicas. Sus interacciones estructurales y propiedades dinámicas permiten que sucedan los procesos biológicos, por ejemplo, las proteínas se encuentran plegadas de una forma específica para poder llevar a cabo su función, si por algún motivo su distribución de carga fuera diferente, su eficiencia se vería alterada y en consecuencia la vida como la comprendemos no sería posible. Tal distribución de carga tan indispensable para la supervivencia se alcanza debido a la presencia del agua. Son las moléculas de agua las que empujan a los biopolímeros a adquirir determinadas configuraciones espaciales. Por otro lado, el

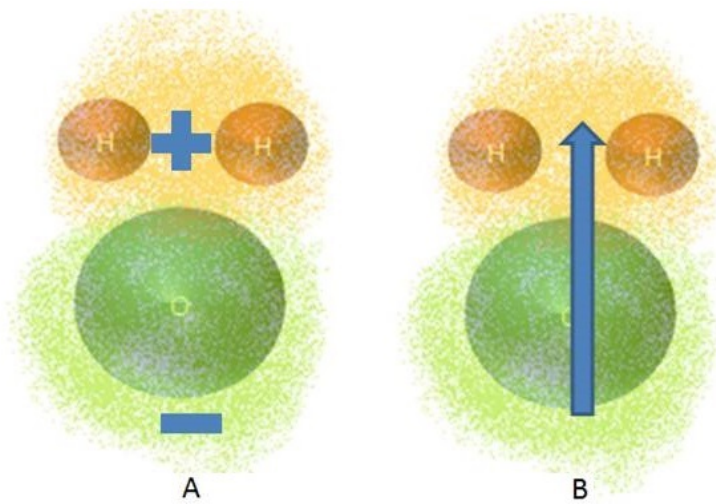


Figura 3.2. Representación de la molécula de agua. A) Distribución de carga positiva y negativa en la molécula de agua. B) Esquema del momento dipolar en la molécula de agua.

agua funciona como un medio de transporte e interacción, además de dar estabilidad a todos los arreglos biomoleculares que interactúan con ella. Es inconcebible pensar en un estudio realista de los procesos biológicos ignorando la presencia del agua. Por su importancia, y debido a su comportamiento especial y sus propiedades únicas que aún no se entienden totalmente, el agua sigue siendo un tema de investigación.

Las moléculas de agua interactúan entre ellas por medio de puentes de hidrógeno (interacciones electrostáticas entre la región positiva, un hidrógeno, y la región negativa, un oxígeno, de dos moléculas de agua diferentes). Una molécula puede llegar a establecer hasta cuatro puentes de hidrógeno de forma simultánea, como se muestra en la figura 3.3 [8]. La distancia que mantienen los átomos por medio de estos enlaces es de 0.175 nm, mayor que la de los enlaces covalentes. Los puentes de hidrógeno son energéticamente lábiles, es decir, se rompen y se vuelven a formar en tiempos cortos, cercanos a 10^{-22} s, a temperatura ambiente. Si la temperatura es menor a la ambiente, el tiempo de vida de los puentes de hidrógeno aumenta, y cuando la temperatura es mayor, los puentes de hidrógeno se rompen más fácilmente [62]. Además, la vibración de las moléculas de agua también incrementa con la temperatura y sucede una competencia entre la energía térmica y la electrostática,

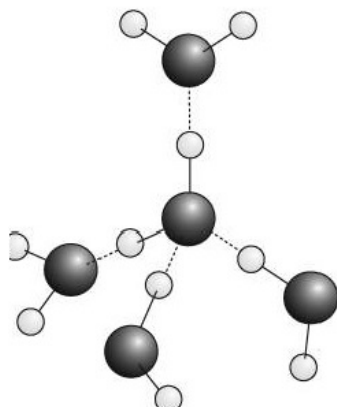


Figura 3.3. Molécula de agua (con los oxígenos en color oscuro, y los hidrógenos en color blanco) formando puentes de hidrógeno con cuatro moléculas vecinas. En conjunto forman una estructura tetraédrica [8].

dando como resultado una menor interacción entre las moléculas de agua [1].

Existen diversos modelos que pretenden describir como se llevan a cabo las interacciones entre las moléculas de agua, aunque ninguno por sí mismo logra abarcar el complejo sistema de interacción de la sustancia. Generalmente se utiliza la teoría del quinto vecino para determinar el tiempo de formación y ruptura de un puente de hidrógeno. Esta teoría considera que para que en una molécula de agua se pueda romper un puente de hidrógeno y formar uno nuevo, se requiere suficiente energía para vencer un potencial energético [63]. Cuando en la vecindad de la molécula de agua, en el espacio tetraédrico formado por cuatro moléculas de agua circundantes, se encuentra presente al menos una molécula extra, o quinto vecino de las que forman el arreglo original, el potencial que debe vencerse disminuye, debido a la perturbación electrostática que ocasiona el quinto vecino [64]. Lo anterior ha sido englobado en otro modelo llamado de espera y cambio (wait-and-switch en inglés), que establece que la molécula de agua espera las condiciones de potencial favorables para romper uno de sus puentes y establecer otro [63]. Actualmente se sabe que en el agua la estructura tetraédrica no se extiende indefinidamente en el espacio, y se han propuesto varios modelos para describir la distribución del arreglo tetraédrico como consecuencia de la interacción entre moléculas de agua. Mencionaremos dos de ellos: El primero indica que esta red se encuentra presente en regiones arbitrarias y aisladas, formando aglomeraciones llamadas clusters. Los clusters a su vez se encuentran rodeados por agua

que no sigue este arreglo y que es denominada como desordenada [65]. La segunda propuesta sugiere que uno puede encontrar a las moléculas de agua en diferentes condiciones de densidad, de manera simple se habla solo de dos, una de alta y una de baja densidad, siendo esta última donde se presenta el arreglo tetraédrico [28, 65]. De acuerdo con los exponentes de esta teoría, las regiones de alta y baja densidad aumentan o disminuyen sus volúmenes dependiendo de las condiciones de presión y temperatura a las que se encuentran sometidas, entendiendo que una presión y temperatura bajas implican menor agitación térmica por parte de las moléculas, por lo cual, el potencial energético que se necesita para romper y formar un nuevo puente de hidrógeno aumenta. Cuando estas condiciones de presión y temperatura se tienen, se trata de un arreglo casi estático y cercano al ideal de la red tetraédrica.

De acuerdo con la teoría de Debye, en presencia de un campo eléctrico los momentos dipolares de las moléculas de agua se orientan en dirección del campo aplicado. La orientación del momento dipolar de cada molécula de agua dependerá tanto de la frecuencia del campo eléctrico aplicado, como de la disposición de los momentos dipolares de las moléculas vecinas [44]. Otra variable que afecta la respuesta de los momentos dipolares es la temperatura, pues al aumentar ésta, la agitación térmica a la que se ven sujetas las moléculas de agua también lo hace, incrementando la dificultad para orientarse con el campo. El valor de la constante dieléctrica y la forma en que varía con la temperatura puede ser consultado en tablas [66]. Esas tablas se encuentran basadas en experimentos donde generalmente se usan frecuencias superiores a 10^8 Hz, y un arreglo capacitivo de placas paralelas [62]. A pesar de que se conocen los efectos de los procesos iónicos en la constante dieléctrica, es comúnmente aceptado que, como lo indican las tablas en manuales de física y química [66], la constante dieléctrica del agua por debajo de 1 MHz no cambia con la frecuencia, solo con la temperatura. En los resultados obtenidos en la tesis de maestría, que se encuentran reportados en [1], encontramos que los procesos iónicos contribuyen en forma dominante a la constante dieléctrica del agua en frecuencias bajas, ocasionando que en esta región la k' adquiera valores muy grandes, los cuales incrementan con la temperatura. Mientras que en la región de altas frecuencias donde dominan los procesos dipolares, la

constante dieléctrica disminuye con la temperatura. Además, las contribuciones iónicas y dipolares se compensan en una frecuencia específica independientemente de la temperatura, generando un punto isopermitivo para k' .

Los valores que toma la k' del agua explican los resultados obtenidos en investigaciones sobre las propiedades dieléctricas de biopolímeros hidratados, donde se ha observado que en regiones de frecuencias menores a 10^6 Hz la constante dieléctrica aumenta conforme la frecuencia disminuye [49–51, 56, 67]. Este comportamiento sucede porque el campo eléctrico aplicado induce una separación de fases en la muestra conocida como fenómeno de Maxwell-Wagner-Sillars [49, 53, 57, 68], y sucede cuando el agua se mezcla con otras moléculas. Las capas cercanas a los electrodos están formadas por los iones, en particular los iones del agua H^+ y OH^- se desplazan hacia los electrodos saltando virtualmente a través de las regiones afines a formar puentes de hidrógeno [49, 56, 67]. Las otras capas están constituidas por las moléculas de la muestra, las que se orientan más rápidamente son arrastradas cerca de los electrodos y las más lentas se quedan en el centro. Cuando se trata de agua pura no existe el fenómeno de Maxwell-Wagner-Sillars, en su lugar se habla de la polarización de electrodos, debida a la acumulación de los iones del agua en la superficie de los mismos.

Los procesos iónicos y dipolares en el agua mantienen una estrecha relación con los puentes de hidrógeno. Se considera que los puentes de hidrógeno son precursores del transporte de cargas a través de un material [69]. Existen distintos modelos que explican este transporte, sin embargo, todos parecen coincidir en relacionarlos con características de los puentes de hidrógeno entre las moléculas y la estructuración intermolecular de las mismas [37–39, 69, 70]. El más discutido se conoce como mecanismo de Grotthuss y fue descrito por este autor en 1806 [38]. Este proceso se visualiza de forma simple como un intercambio ordenado y gradual de átomos de hidrógeno entre varias moléculas de agua que constituyen una cadena larga [37, 38, 70]. Este mecanismo tiene fuertes implicaciones biológicas, como la rápida propagación de cargas en procesos donde participan los iones, o en el funcionamiento de ciertas proteínas o poros que se encargan del transporte de protones [37, 38].

A pesar de su relevancia, el mecanismo de transporte de cargas no se encuentra completamente descrito y ha suscitado discusiones respecto a su explicación en la última década [37–39, 70]. En este contexto, estudiar la fase sólida del agua, es decir, el hielo, ha sido una forma indirecta para describir la propagación de una señal eléctrica en el agua (aunque esta fase se investiga por muchas otras razones también). Es posible hacerlo midiendo algunas de sus propiedades dieléctricas, por ejemplo, la permitividad y la disipación [71–73], utilizando modelos inspirados en el mecanismo de Grotthus para la transferencia de protones, donde las características estructurales relacionadas con los puentes de hidrógeno y defectos iónicos y de Bjerrum, permiten el desplazamiento de cargas sin requerir difusión iónica como en el agua [72–77].

El agua presenta muchas propiedades distintivas debidas a los puentes de hidrógeno. De acuerdo con algunos autores, se considera que estas propiedades son *anómalas* [2, 3], y el diagrama de fases del agua es evidencia de ello [6]. El agua posee once puntos triples que son estables y una notable versatilidad al momento de formar estructuras cristalinas que no puede compararse con otras sustancias [3, 7]. Esas estructuras tienen puentes de hidrógeno con longitudes y ángulos distintivos, que dependen de si la presión a la que se encuentran al disminuir la temperatura es atmosférica o hiperbárica. Los cambios en los puentes de hidrógeno hacen que el volumen de la estructura cristalina que se forma sea menor o mayor que el del agua. Aún cuando se sabe que el agua se solidifica por debajo de los 0°C, puede existir en su estado líquido por debajo de esta temperatura en un equilibrio precario, por ejemplo, si se aplica una tasa de enfriamiento rápida (10^6 °C/s), esto es conocido como superenfriamiento. El agua permanece en un estado superfrío hasta que una pequeña perturbación la hace alcanzar un estado vítreo [9–11]. Por otro lado, las fases cristalinas se obtienen usualmente aplicando presión a través de un pistón o usando gases, como el nitrógeno, a temperaturas bajas [12–18].

3.4 La molécula de glicerol

El glicerol ($C_3H_8O_3$) es un polialcohol de bajo peso molecular. Algunas especies de peces polares, plantas terrestres, insectos y anfibios, han desarrollado un mecanismo de tolerancia al congelamiento a base del uso del glicerol como un crioprotector coligativo. Incluso es considerado uno de los mejores solventes crioprotectores. En concentraciones altas previene la formación de hielo, incrementando la osmolaridad de los fluidos corporales para reducir la cantidad de agua que puede formar hielo extracelular, y evitando la formación de hielo intracelular [27, 28]. Las soluciones de glicerol tienen un papel importante en el mantenimiento de la estructura de las macromoléculas biológicas, permitiendo el transporte de cargas y promoviendo el autoensamblaje de proteínas [31, 32]. Un aspecto distintivo de las mezclas de agua y glicerol es la dinámica compleja que se presenta a través de los puentes de hidrógeno que se forman entre los radicales hidróxilo de la molécula de glicerol y los hidrógenos de la molécula de agua. Sin embargo, el mecanismo molecular a través del cual el agua y el glicerol se estructuran a través de los puentes de hidrógeno y la manera en que la concentración influye en las propiedades criopreservadoras, no está completamente claro. Una gran variedad de técnicas se han utilizado para investigar la dinámica de la participación de las moléculas del glicerol en la estructura intermolecular del agua, incluyendo NMR [71, 74, 78], espectroscopía Raman [79], difracción de neutrones [32], modelos computacionales [31–33, 80], calorimetría [81], espectroscopía infrarroja y dieléctrica [25, 72, 73, 76, 77, 82–89]. Esta última, como se ha dicho antes, permite explorar la cooperatividad molecular a través de los procesos de relajación, y la transición vítrea asociada a las mezclas a través de un rango considerablemente amplio de frecuencia y temperatura. De hecho, se han realizado varios estudios para estas mezclas abarcando desde 10^{-6} hasta 10^{10} Hz, para temperaturas de -37°C a 50°C [72, 73, 76, 77, 87–89]. Sin embargo, mediciones para frecuencias inferiores a 10^6 Hz se han realizado solo para temperaturas por debajo de 0°C . Esto es porque la respuesta dieléctrica en bajas frecuencias muestra una contribución grande ocasionada por la polarización de electrodos [44, 90], que provoca valores grandes de capacitancia en serie y, consecuentemente, valores de permitividad

extremadamente altos [1, 23, 87, 91, 92]. Como se mencionó previamente, nos interesa la respuesta iónica de mezclas de agua y glicerol en un rango de frecuencias de 10^2 - 10^4 Hz, y su dependencia en función de la temperatura y concentración de glicerol. La razón es que esto nos permitirá tener una mayor comprensión de los mecanismos físicos en el proceso de supervivencia en condiciones de frío extremo, debido a que algunas especies tolerantes al frío utilizan grandes concentraciones de glicerol, y por otro lado, el transporte de iones a través de la membrana ocurre en tiempos que corresponden al rango de frecuencias de estudio.

3.5 Criopreservación celular y preservación en frío

La conservación de cultivos celulares a través de su congelamiento es actualmente una práctica común, sin embargo, el desarrollo de la gran variedad de protocolos para ello data del siglo pasado [30]. Lo atractivo de la técnica es que puede mantener a las células en un estado de animación suspendida, sin que sufran de envejecimiento o muerte [30]. Incluso, para un solo tipo de células es posible encontrar diferentes métodos de criopreservación que se consideran exitosos, los cuales en general comparten los siguientes aspectos:

1. Se requiere una tasa de enfriamiento rápida. Para lograrlo, generalmente se utiliza algún gas, como el nitrógeno, que permite enfriar varios cientos de grados por minuto. La elección de la tasa de enfriamiento se basa en el crecimiento de los cristales de hielo en función de la velocidad con la que se enfría. En la figura 3.4 A) se ilustra que una tasa de enfriamiento lento favorece el crecimiento de cristales extracelulares, los que terminan por comprimir las células. Mientras que en B) se muestra que una tasa de enfriamiento rápida ocasiona una formación más uniforme de estos cristales impidiendo la compresión.
2. Se utilizan criopreservadores. Aún cuando el crecimiento de los cristales resulta relevante por la compresión que puede sufrir la célula, la tasa de enfriamiento por sí sola no garantiza la

criopreservación, debido a que pueden suscitarse problemas osmóticos y de deshidratación.

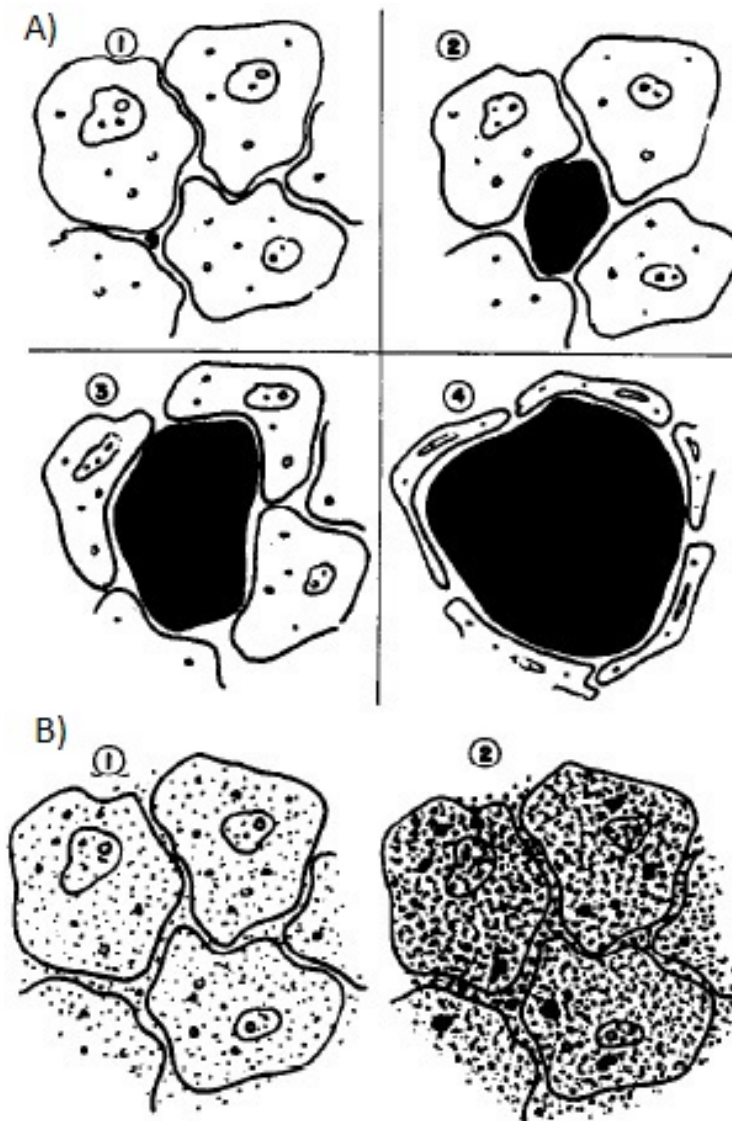


Figura 3.4. Ilustración del efecto de dos tasas de congelamiento en un cultivo celular. A) Los recuadros 1 al 4 ilustran la evolución temporal usando una tasa de congelamiento lenta, la cual promueve la formación de una estructura cristalina grande en el espacio extracelular que continúa creciendo hasta comprimir las células. B) 1 y 2 esquematizan la evolución temporal usando una tasa de enfriamiento rápida, que provoca una formación uniforme de cristales de hielo pequeños en el espacio intra y extracelular [30].

A inicios del siglo XX se sabía que utilizando algunos azúcares era posible conservar mejor los alimentos evitando el daño celular. La concentración del criopreservador es importante, si es inferior o superior a ciertos valores, que dependen de sus propiedades, se presentarán diversos efectos no-

civos, por ejemplo, se sugiere para el uso de glicerol como criopreservador una relación molar de 1:3 (glicerol:agua) para evitar el efecto del congelamiento.

Para lograr un proceso de criopreservación exitoso, existen además otros aspectos a considerar relacionados con el calentamiento de la muestra. Sin embargo, estos últimos no se tocarán a detalle porque el propósito de esta tesis se enfoca principalmente en el proceso de enfriamiento. En general, poco antes de 1970 se habían extrapolado a diferentes cultivos celulares ciertas condiciones de conservación consideradas exitosas en los espermatozoides de toro, éstas son: uso de tasa de enfriamiento lenta (1-2 °C/min), concentraciones de glicerol entre el 5 y 20%, almacenamiento posterior a -70 °C, y periodos que no superen los 3 años [30]. Para determinar las condiciones ideales para diferentes cultivos, fueron necesarios estudios más detallados.

Los espermatozoides son células cuya utilidad para fines reproductivos ha motivado el desarrollo de procedimientos adecuados para su preservación en bajas temperaturas, así como continuas mejorías de los mismos. En el caso particular de los espermatozoides de ratón, su criopreservación no fue exitosa sino hasta 1990. Durante los siguientes 10 años se siguieron desarrollando diferentes métodos exitosos para su criopreservación. Con el propósito de que las diferencias entre los métodos de criopreservación no afectaran la calidad de los espermatozoides almacenados, y logaran que los productos resultantes fueran equiparables, Nakagata propuso en el 2000 un método general de criopreservación [93]. En dicho trabajo se detallan diferentes aspectos de importancia para el almacenamiento de espermatozoides. En el proceso se permite la libre expansión de la muestra en una pajilla durante el congelamiento, pues se encuentra rodeada por dos volúmenes de aire. Este método de criopreservación de espermatozoides de ratón aún se sigue utilizando, e incluso es posible encontrar kits comerciales [94]. Dentro de los aspectos principales que deben cuidarse para que la muestra de espermatozoides (de cualquier especie) pueda ser utilizada en un futuro, se encuentran el desbalance osmótico y la estabilidad de la membrana, entre otros [95, 96]. Este aspecto resulta particularmente delicado en el caso de mamíferos, y es por ese motivo que, ante cualquier propuesta para mejorar la

preservación de los espermatozoides, se vuelve indispensable corroborar la estabilidad de la membrana.

Además de los métodos de criopreservación, existe un procedimiento alternativo (no criopreservativo) que implica aplicar presión para preservar a las células. La idea de usar estas condiciones ha sido estudiada desde 1899 para la preservación de productos lácteos, aunque debido a que en aquel entonces se carecía de la tecnología apropiada, su implementación no fue considerada hasta un siglo después [20]. Desde entonces, la denominada congelación a alta presión se ha implementado para diversos productos lácteos y en los últimos años, en carne y productos del mar, donde la técnica puede representar una gran ventaja en la conservación de la textura del producto [20,36]. Otro aspecto atractivo de la técnica es que promueve condiciones de esterilidad ante bacterias como *E. coli* [97], un aspecto fundamental cuando un producto biológico está pensado para consumo humano. Hay diferentes formas de implementar esta técnica, prefiriendo manejar presiones que no excedan los 200 MPa, así como temperaturas que no desciendan de -20°C [21]. Esto se encuentra estrechamente ligado con el diagrama de fases del agua, intentando evitar la transición a las diferentes estructuras cristalinas. Los pasos para lograr este congelamiento se esquematizan en las gráficas de temperatura (superior) y presión (inferior) en la figura 3.5:

1. La presión incrementa rápidamente hasta alcanzar los 200 MPa.
2. Mientras la muestra se mantiene presurizada, se hace disminuir la temperatura hasta -20°C .
3. El producto es despresurizado ocasionando que la temperatura aumente.
4. El efecto de la presión en el paso 3 es tan brusco, que ocasiona un efecto de congelamiento en el que se forman cristales de hielo pequeños.
5. Por último, se ajusta la temperatura a la que se llevarán a cabo las condiciones de almacenamiento.

A pesar de que el uso de condiciones de alta presión externa para lograr la preservación de células biológicas ha sido implementado en la industria alimentaria, no ha sido utilizado para criopreser-

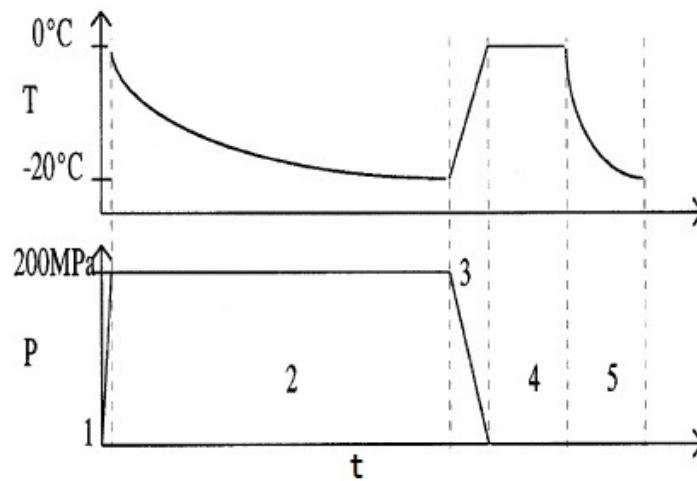


Figura 3.5. Pasos que se siguen para lograr el congelamiento de productos bajo condiciones de alta presión [21].

var células porque se generan daños que no permiten la recuperación del cultivo. La propuesta de nuestro trabajo consiste en lograr el enfriamiento de espermatozoides y bacterias bajo condiciones isovolumétricas, lo cual provocaría un incremento paulatino en la presión (que llamamos presión intrínseca) ocasionado por el descenso de la temperatura. Lo anterior implica que mientras la temperatura desciende, los cristales de hielo no se formarán y no habrá desequilibrio en el gradiente osmótico y daño en la membrana celular de los espermatozoides. Además, la presión al interior del contenedor debería ser suficiente para conseguir condiciones de esterilidad como en la congelación en alta presión, eliminando a *E. coli*. Este trabajo propone como una hipótesis, que al restringir el volumen, es posible evitar algunos de los daños ocasionados por el congelamiento en células, por ejemplo, el daño en la membrana de espermatozoides, obteniendo condiciones de esterilidad similares a la técnica de enfriamiento a altas presiones.

Capítulo 4

Metodología

En este capítulo se describe el dispositivo experimental diseñado para realizar las mediciones de espectroscopía dieléctrica, así como la preparación de las muestras para los diferentes experimentos, que comprenden:

1. Estudio del transporte de carga y procesos de relajación en mezclas de agua y glicerol (de 283 a 323 K (10 a 50°C)).
2. Estudio de la respuesta del agua pura a bajas temperaturas (277 a 235 K (4 a -38°C)) en condiciones de volumen restringido.
3. Evaluación del daño celular en muestras biológicas (espermatozoides de ratón y bacterias *E. coli*) debido al enfriamiento en condiciones de volumen restringido.

4.1 El arreglo experimental

El dispositivo experimental utilizado para medir las propiedades dieléctricas de las diferentes muestras utilizadas en este proyecto, es similar al usado previamente en la tesis de maestría [20]. Constó de

un capacitor cilíndrico de 15 cm de longitud y una distancia de separación entre los electrodos de 0.2 cm, y se necesitó un volumen de 6.2 ml para llenar el espacio vacío entre los electrodos (figura 4.1).

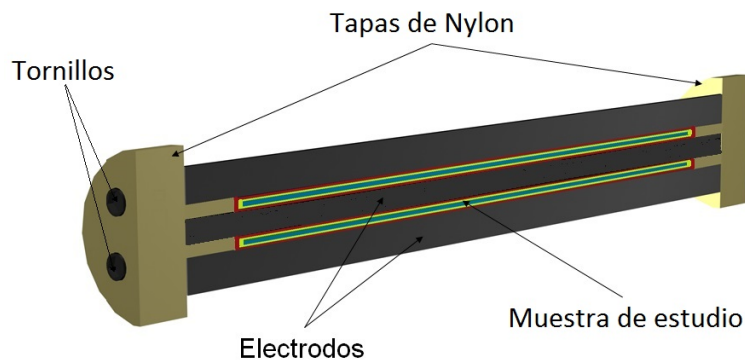


Figura 4.1. Esquema longitudinal del capacitor cilíndrico que se coloca dentro del bloque de acero.

El arreglo capacitivo se fija utilizando dos rodillos de madera en un bloque de acero con 30 cm de longitud (figura 4.2). El bloque tiene un circuito ranurado diseñado para hacer circular un líquido anticongelante a lo largo del bloque, garantizando la estabilidad térmica de la muestra a la temperatura deseada. La temperatura de la muestra se mide utilizando un termopar, esperando un periodo de 15 a 20 minutos para alcanzar la estabilización térmica.

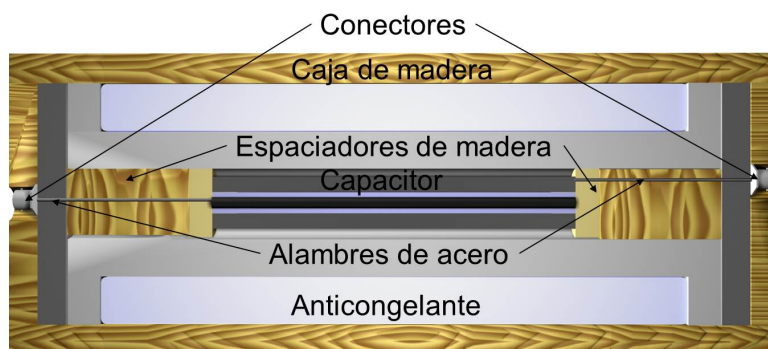


Figura 4.2. Esquema longitudinal del bloque de acero con el capacitor en su interior.

Las propiedades dieléctricas de la muestra se midieron conectando los electrodos a un medidor LCR HP 4284A, y se usó un programa que se diseñó en un software de control y adquisición de datos VEE de Agilent. El dispositivo LCR permite medir diversos parámetros dieléctricos característicos del

material que se encuentra contenido en el capacitor. Estos parámetros se midieron manteniendo un potencial fijo a 1 V y variando la frecuencia con que cambia la dirección del campo eléctrico inducido de 10^2 a 10^5 Hz.

4.2 Experimentos con soluciones de agua y glicerol

Se midieron dos parámetros dieléctricos, la $\tan(\delta)$ y la capacitancia. A partir de la última se calculó la permitividad relativa (ϵ') de las muestras, siendo la ϵ' del agua bi-distilada MiliQ ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) la referencia. Los experimentos se realizaron en el rango de temperatura de 283 a 323 K (10 a 50°C), con intervalos de 10 K. Las mezclas se prepararon utilizando agua bi-distilada MiliQ y glicerol, usando una relación porcentual con base en el peso del glicerol respecto al peso total de la mezcla ($w_g/(w_g + w_w)\% = wt\%$), donde w_g es el peso de el glicerol y w_w el peso del agua.

4.3 Experimentos con agua

Para los experimentos con agua pura se usó un rango de temperatura que abarca su transición de fase, desde 277 hasta 235 K (4 a -38°C), con intervalos de 2 K. Además se incluyó una muestra previamente congelada, que fue medida a partir de 269 a 235 K (-4 a -38°C). Esta muestra sirvió como referencia para el experimento en condiciones isocóricas.

4.4 Preparación de las muestras biológicas

4.4.1 Integridad en las membranas de espermatozoides de ratón

Se extrajeron los epidídimos de dos ratones de la cepa CD1 de más de seis semanas de edad, mantenidos en condiciones de bioterio. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los epidídimos fueron extraídos siguiendo el protocolo 0457 – 09 aprobado por el CICUAL. Los epidídimos fueron macerados en 1.8 ml de solución fisiológica White-HEPES simplificada, que contiene las siguientes

concentraciones: 140 mM de $NaCl$, 5 mM de KCl , 1.2 mM de $MgSO_4$, 2 mM de $CaCl_2$, 5 mM de Heps, y 1.2 mM de KH_2PO_4 . La solución de espermatozoides se dejó reposar por 20 minutos para que los desechos del epidídimo sedimentaran y los espermatozoides nadaran hacia arriba y se acumularan en el sobrenadante. Pasado el tiempo de reposo, se retiró 1 ml del sobrenadante y se colocó en un tubo al que se agregó la solución fisiológica hasta completar 7 ml, de tal forma que se obtuvo una solución de $2.38 \times 10^6 \pm 4.62 \times 10^5$ células/ml. Se tomaron 20 μl de la solución con espermatozoides para hacer un conteo de los espermatozoides cuya membrana estuviera intacta, utilizando para ello una cámara de Neubauer y tinte azul de tripano (el tinte permea instantáneamente al interior de las células que tienen la membrana dañada, mientras que aquellas con la membrana intacta no permiten la entrada del tinte). A los 20 μl de muestra se agregaron 20 μl de tinte, luego se mezclaron y se colocaron 10 μl en la cámara de Neubauer para contar los espermatozoides teñidos y no teñidos, que correspondieron a los que tuvieron un daño en la membrana y los que contaron con una membrana íntegra, respectivamente. Este conteo sirve como referencia para determinar el efecto de las diferentes condiciones de almacenamiento en la integridad de la membrana de los espermatozoides. El volumen restante se depositó en tres recipientes herméticos de acero inoxidable y la capacidad de llenado fué calculada de forma independiente, dos de los cuales fueron metidos en un baño térmico para bajas temperaturas y uno se dejó en el exterior a 22°C. El primer recipiente que fue congelado se llenó completamente usando 2.44 ml, y nos referiremos a él a partir de ahora como llenado al 100%. El segundo recipiente se llenó parcialmente con 2.196 ml, esto corresponde al 90% de su capacidad. Después de ser llenados y cerrados herméticamente, ambos recipientes se colocaron en el baño térmico previamente estabilizado a -20°C. En el tercer recipiente se depositó un volumen de 2 ml, que representa el 90% del volumen que puede contener. Esta muestra sirvió como control negativo, de tal manera que los resultados obtenidos se relacionaron con las condiciones térmicas a las que se encontraron las muestras. Los tres recipientes fueron dejados en sus respectivas condiciones por un periodo de 20 hrs. Luego, todos fueron llevados a un baño térmico que se encontraba a 37°C y dejados ahí por una hora y media hasta que se termalizaron, y en su respectivo caso se descongelaron.

Las muestras se agitaron por inversión antes de abrir los recipientes. Una vez abiertos se recuperó de cada recipiente una muestra de 600 μl , y se usó para realizar un nuevo conteo de espermatozoides con la membrana íntegra o dañada, de la misma forma en que se describió anteriormente. El experimento descrito se realizó en 5 ocasiones diferentes. Es importante señalar que los conteos después del congelamiento fueron realizados como una prueba doble ciego.

4.4.2 Viabilidad de *Escherichia coli*

Para verificar si nuestros experimentos propician condiciones de esterilidad similares a las de la técnica de conservación en alta presión, se hicieron pruebas de viabilidad celular utilizando a *E. coli* como bacteria de estudio. Se utilizó un inóculo de *E. coli* almacenado a -80°C y separado en varios tubos de 200 μl de medio LB+30% glicerol, las bacterias, fueron recolectadas de una colonia que creció a lo largo de una noche en agar a 37°C , se dejaron incubar en 50 ml del medio antes mencionado y luego fueron separadas. Se depositaron 40 μl de un tubo de inóculo en 10 ml de medio LB, dejando incubar las bacterias por una noche a 37°C . De los 10 ml del cultivo, se sembraron 50 μl (utilizando una dilución 10^4) en una caja de Petri con medio EMB, el cual facilita la identificación de *E. coli*. Posteriormente las bacterias se dejaron incubar por una noche a 37°C . El resto del volumen del tubo de 10 ml se distribuyó en los recipientes de acero, de la misma forma en que se hizo con los espermatozoides de ratón. Una vez terminado el periodo de almacenamiento se sembraron en cajas con medio EMB 50 μl de una dilución 10^4 de cada contenedor. Después las bacterias se dejaron incubar por una noche a 37°C . Terminado el periodo de incubación, se contaron las colonias que se obtenían en cada cultivo y se determinó la concentración de bacterias por ml de las soluciones originales. Posteriormente se compararon las concentraciones de bacterias obtenidas para los recipientes con la concentración original (la del cultivo en el tubo de 10 ml), determinando cuál fue la reducción de la población como función de las condiciones de almacenamiento.

Capítulo 5

Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados de los tres diferentes experimentos realizados en esta tesis. Primero se muestran los resultados de las mezclas de agua y glicerol, los cuales son discutidos en el contexto biológico de estrés térmico. Se continúa con los resultados obtenidos para los experimentos con el hielo Ih y el agua bajo presión intrínseca. Se compara la respuesta de ambas sustancias y se discute el comportamiento excepcional del agua. Por último, se presentan los resultados de los experimentos donde espermatozoides de ratón y bacterias *E. coli* se almacenaron usando condiciones isocóricas. Los resultados obtenidos se comparan con la técnica de congelamiento en alta presión.

5.1 Mezclas de agua y glicerol

En la figura 5.1 se muestra primeramente como referencia, la dependencia de la permitividad relativa del agua pura en función de la frecuencia para diferentes temperaturas (los ajustes se hicieron utilizando la ecuación 3.6, $n = 1$). Podemos ver que hay un incremento drástico en la respuesta debido al efecto de la polarización de los electrodos. Aquí sucede un fenómeno interesante: existe una frecuencia de cruce donde ϵ' es independiente de la temperatura, como se muestra en el recuadro. Dicho cruce es el

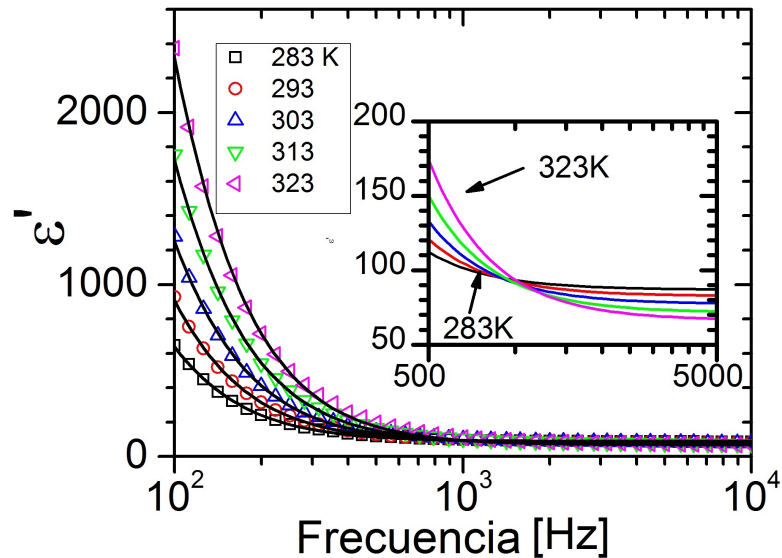


Figura 5.1. Permitividad relativa en función de la frecuencia a diferentes temperaturas para el agua pura. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto. El acercamiento en el recuadro es el punto isopermitivo [1] (por claridad, sólo se muestran los ajustes con los mismos colores que los datos).

punto isopermitivo, que se encuentra reportado en [1]. Cabe señalar que este punto de cruce implica una competencia similar a la que ocasiona un punto isobéptico, donde dos especies, A y B, de un material, se balancean la una a la otra [98]. En el caso del punto isopermitivo, donde la muestra es agua pura, las especies son iones y dipolos, que tienen diferentes respuestas térmicas: mientras la concentración iónica incrementa con la temperatura, el alineamiento dipolar se vuelve más y más difícil. En la literatura se afirma que el efecto de la polarización de los electrodos es una propiedad geométrica, y no de la muestra [60]. Sin embargo, la sola existencia del punto de cruce implica que la polarización de los electrodos puede verse como una propiedad del material.

En la figura 5.2 se presenta la permitividad relativa como función de la frecuencia a 303 K (30°C) para el agua, glicerol, y algunas mezclas de ambas (los ajustes se hicieron utilizando la ecuación 3.6, $n = 1$). En el caso del glicerol (cuadrados) la respuesta dieléctrica difícilmente depende de la frecuencia, lo cual ha sido reportado en este intervalo de frecuencias por otros autores [84, 86]. Conforme la concentración del glicerol disminuye, la contribución dipolar es opacada por la respuesta

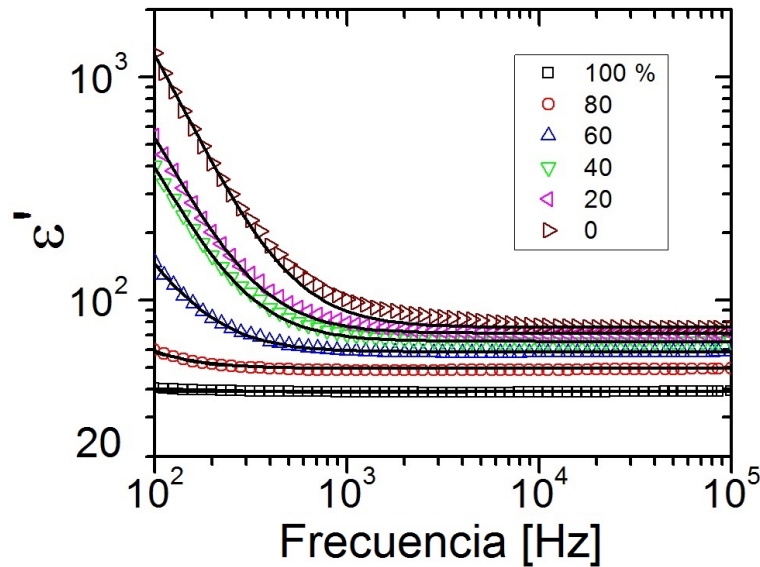


Figura 5.2. Permitividad relativa en función de la frecuencia a 303 K (30°C) para mezclas de agua y glicerol. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto. La curva superior es agua pura (0% glicerol), y la inferior es glicerol puro (100%).

iónica; y la permitividad relativa en bajas frecuencias aumenta hasta alcanzar valores excepcionalmente altos (superiores a 10^3 para el caso del agua pura). Esta carga iónica se acumula en los electrodos y es responsable de los valores altos de la permitividad.

La figura 5.3 ilustra la relación de la frecuencia y la permitividad relativa a diferentes temperaturas para dos mezclas de agua y glicerol en altas concentraciones: 90 (a) y 70 wt% (b). Esta última es la concentración crítica que previene la formación de hielo [31], esto se discutirá a detalle posteriormente. Es importante señalar que el incremento de la contribución iónica ocasionada por la presencia del agua inicia en 313 K (40°C) para la concentración de 90 wt% (cabe aclarar que siempre se obtiene una pequeña contribución que aparece a menores temperaturas y bajas frecuencias, debido a las limitaciones del equipo y a la pureza de la muestra), y cerca de 293 K (20°C) para la concentración de 70 wt%. Conforme la concentración de glicerol disminuye, además del hecho de que los valores de ϵ' continúan aumentando hasta alcanzar el valor de 10^3 , la región de intersección de las isotermas se recorre a frecuencias mayores y se hace más angosta hasta formar un punto bien definido (punto

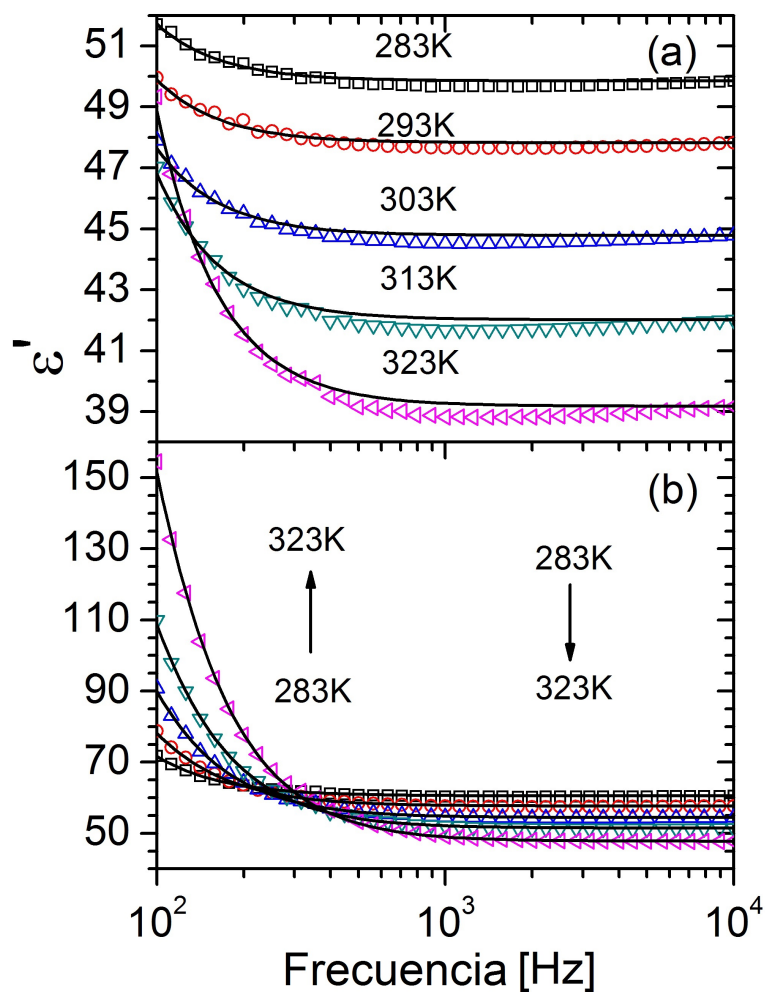


Figura 5.3. Permitividad relativa en función de la frecuencia desde 283 K a 323 K (10 a 50°C) en intervalos de 10 K para mezclas de agua y glicerol en 90 (a) y 70 wt% (b). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto.

isopermitivo) en la concentración de 10 wt%. Esta concentración no se muestra en las figuras, pero el lector puede observar el recuadro de la figura 5.1 para convencerse que se forma este punto.

La figura 5.3 también refleja la dependencia del transporte iónico en función de la temperatura y la concentración; es decir, su respuesta ante la viscosidad del medio. De hecho, vemos que en el caso de 90 wt% solamente por encima de 313 K (40°C) la viscosidad de la matriz de glicerol es lo suficientemente baja para que los iones difundan y ϵ' comience a aumentar. En la figura 5.4 se comparan la viscosidad η ($\eta = ae^{c/T}$, donde a y c son constantes y T es la temperatura) y

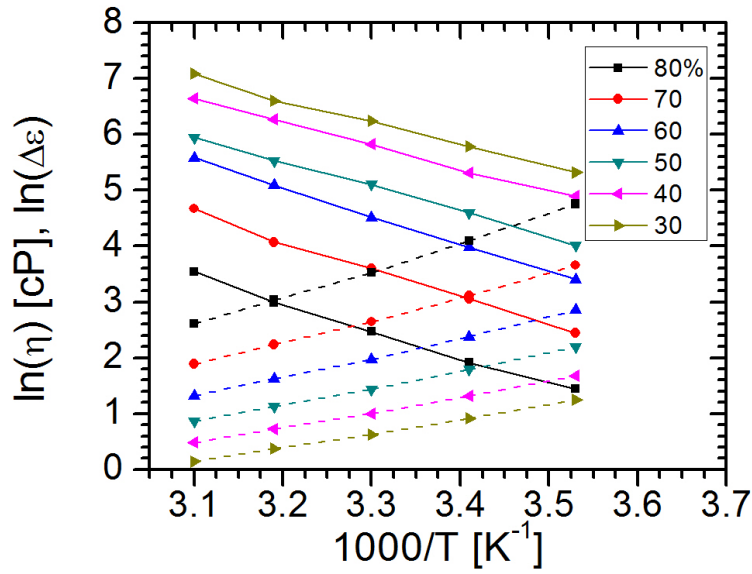


Figura 5.4. Efecto de la temperatura sobre la intensidad dieléctrica (línea continua) y la viscosidad (línea discontinua) en las mezclas de agua y glicerol medidas desde 283 a 323 K (10 a 50°C).

a la intensidad dieléctrica $\Delta\epsilon_{EP}$ en función de la temperatura para diferentes concentraciones de glicerol (donde los valores de η se obtuvieron de [92, 99]). Puede apreciarse una clara correlación: la disminución de la viscosidad ocasiona un aumento en la polarización de los electrodos. Sabemos que la conductividad en un líquido iónico sigue la ley de Arrhenius en los regímenes de frecuencia y temperatura que nos interesan, pero en estos resultados se muestra que $\Delta\epsilon_{EP}$ también lo hace. Por lo tanto, la acumulación de carga en los electrodos es un aspecto intrínseco de la muestra. Esta $\Delta\epsilon_{EP}$ o acumulación de carga en los electrodos sucede como consecuencia del desplazamiento iónico en la mezcla. Sin embargo, existen algunos acarreadores de carga que no llegan hasta los electrodos (durante el tiempo que se aplica el campo eléctrico), y su dinámica se describe comúnmente utilizando la representación de la parte imaginaria del módulo de Macedo ($M^* = 1/\epsilon^*$) [90]:

$$M'' = \frac{\epsilon''}{(\epsilon')^2 + (\epsilon'')^2}, \quad (5.1)$$

En la figura 5.5 se muestra la M'' que corresponde a los casos de la figura 5.3. El pico de conductividad del módulo M'' se observa sólo para la concentración de 90 wt% y se desplaza a

frecuencias más altas conforme la temperatura aumenta. En el recuadro se presentan los tiempos de relajación τ' ($\tau' = \epsilon_{\infty}\tau/\epsilon_s$) de la conductividad en corriente continua, que describen los tiempos de respuesta de la traslación iónica. En otras palabras, el incremento en la temperatura ocasiona un descenso en el tiempo de respuesta de las cargas móviles debido al decremento de la viscosidad. Por otro lado, en la concentración de 70 wt% el pico de la conductividad no se observa porque esta mezcla más diluida promueve que el movimiento de los iones sea más rápido.

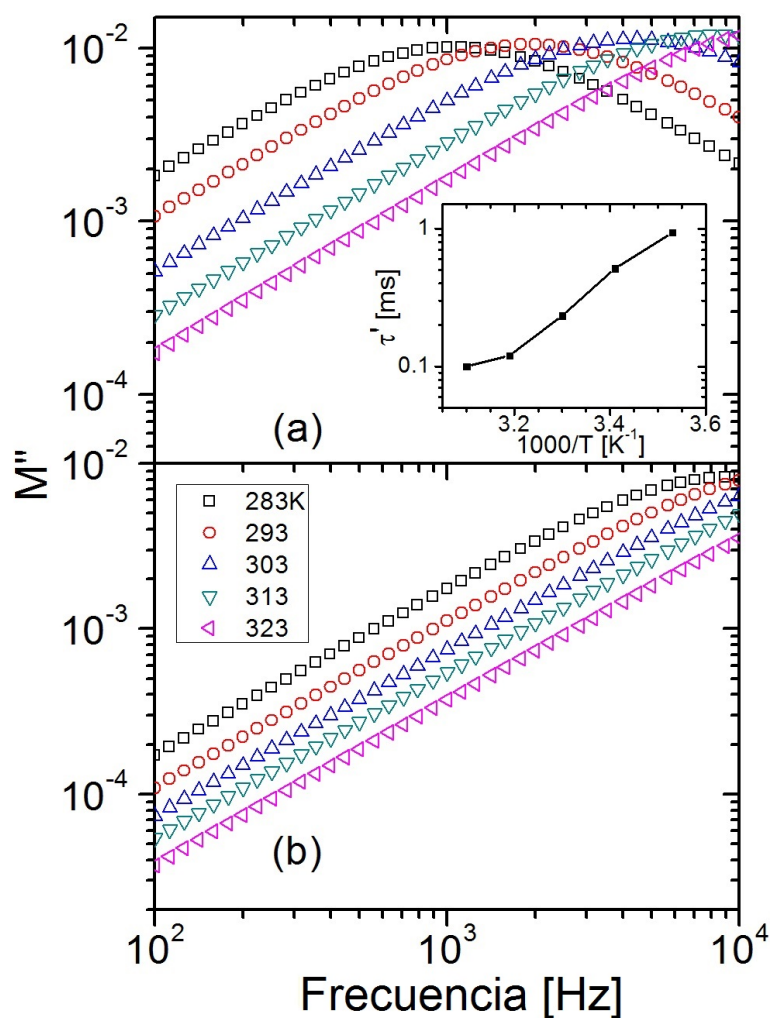


Figura 5.5. Módulo dieléctrico de Macedo (M'') en función de la frecuencia desde 283 K a 323 K (10 a 50°C) en intervalos de 10 K para mezclas de agua y glicerol en 90 (a) y 70 wt% (b). En el recuadro se muestra el tiempo de relajación de la conductividad dc en función de la temperatura para la concentración de 90 wt%.

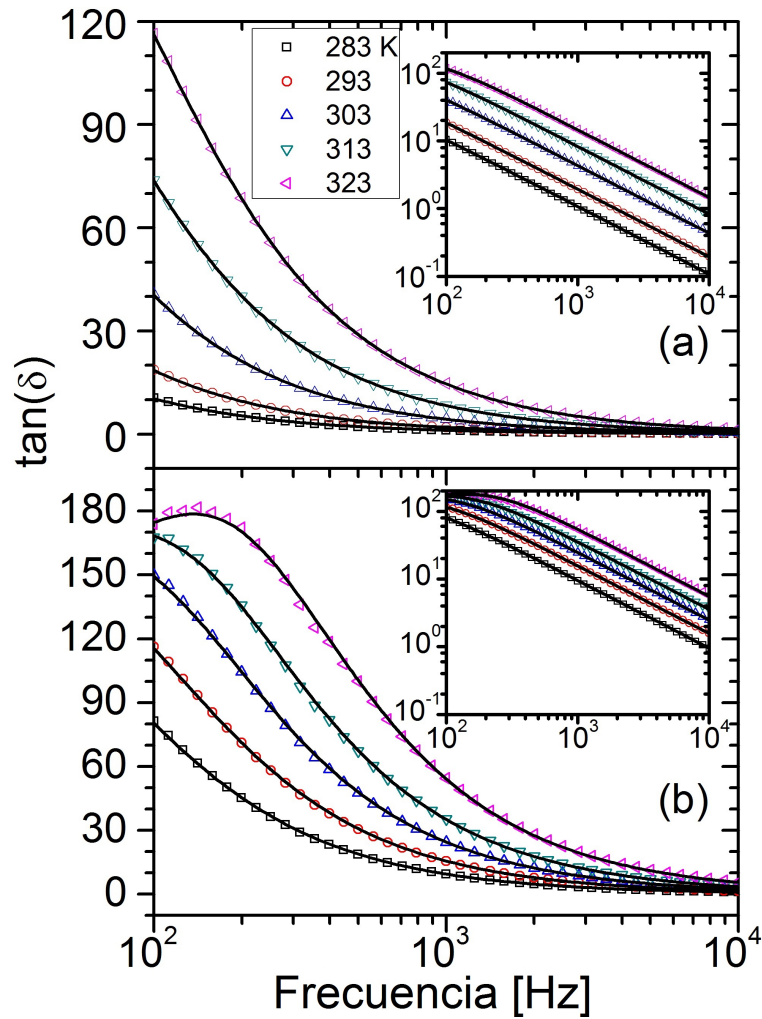


Figura 5.6. Tangente de la pérdida dieléctrica en función de la frecuencia desde 283 a 323 K (10 a 50°C) en intervalos de 10 K para mezclas de agua y glicerol en 90 (a) y 70 wt% (b). Varias de las curvas isotermas siguen un comportamiento hiperbólico común en la conducción iónica [82] (ver los recuadros de (a) y (b)). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto.

La tangente de la pérdida dieléctrica ($\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$) para los casos mostrados en la figura 5.3 se presentan en la figura 5.6 (los ajustes se hicieron encontrando las partes real e imaginaria de la ecuación 3.6, $n = 1$). Puede observarse como era de esperarse, que la disipación de la energía depende de la frecuencia y la temperatura. Es claro que en este régimen de frecuencia, la disipación disminuye conforme lo hace la temperatura y eventualmente se aproximará a cero para las temperaturas por debajo de las estudiadas (lo cual puede intuirse al observar la secuencia de isotermas). Las dos figuras, 5.3 y 5.6, muestran los casos donde de acuerdo con la secuencia de temperatura ϵ' se aplana

y $\tan \delta$ se aproxima a cero para temperaturas cercanas a 273 K (0°C).

5.1.1 Las mezclas de agua y glicerol en el contexto biológico

Debido a que la polarización de los electrodos no varía con la geometría del arreglo [60], y la membrana celular se modela como un capacitor de placas paralelas, es posible suponer que este fenómeno pudiera existir en las células. Especialmente porque los iones se encuentran presentes en ellas y las escalas de tiempo relacionadas con la diferencia del potencial eléctrico en las que participan, se encuentran en el orden de milisegundos.

En condiciones ambientales críticas donde los organismos viven en temperaturas por debajo de 273 K (0°C), la supervivencia de estos seres vivos se garantiza a través de una de las adaptaciones biológicas más complejas y sorprendentes, la tolerancia a la congelación. Los efectos ocasionados por el congelamiento de los fluidos extracelulares involucran cambios sustanciales en la concentración de los solutos dentro y fuera de la célula, y esto ocasiona eventualmente que la misma se deshidrate. Además, se produce la destrucción física de la membrana celular, y hay daño en los organelos [100]. Los organismos tolerantes a la congelación tienen la habilidad de sobrevivir al congelamiento de los fluidos corporales extracelulares. Una estrategia de protección consiste en el uso de alcoholes polihídricos, siendo el más común el glicerol. Altas concentraciones de este soluto orgánico como un criopreservador coligativo, evitan los efectos adversos ocasionados por el congelamiento [100]. En estas circunstancias de estrés térmico, la depresión de las funciones metabólicas es un recurso esencial para resguardar las reservas de energía [101]. Por lo tanto, es natural pensar que esto debería ocasionar modificaciones en la regulación de algunos mecanismos de transporte activo, en particular, en la actividad de canales iónicos y bombas, las cuales requieren de energía para funcionar. Consecuentemente, se esperaría que el intercambio de iones también presente modificaciones. Sin embargo, revisando la literatura puede encontrarse que el flujo iónico transmembranal se mantiene durante y después del congelamiento en algunos de los organismos tolerantes al frío [102–104]. Por otro lado, varios estudios acerca de la

hibernación en anfibios indican que el proceso fisiológico, incluyendo el transporte de iones y agua, se reduce durante estos periodos [105, 106]. Más aún, en estudios *in vitro* en la piel de las ranas durante la hibernación también se ve afectada la sensibilidad de la piel a los estímulos mecánicos (relacionados con el nivel de hiperpolarización de la diferencia del potencial eléctrico transepitelial). Específicamente, cuando comienza la hibernación la sensibilidad disminuye, y hacia el final de este periodo se restablece. En el caso de los animales que acumulan una gran cantidad de glicerol en los fluidos corporales como un criopreservador coligativo, durante la hibernación (cuando se almacena una alta concentración de glicerol), el animal permanece vivo, pero las funciones metabólicas disminuyen drásticamente gastando un mínimo de energía para sobrevivir.

A pesar de que la sustancia de estudio dista de las concentraciones fisiológicas, podemos analizar de forma paralela el efecto que el cambio en la temperatura ejerce sobre las propiedades de la muestra, que se relacionan con el desplazamiento de cargas, y la disminución y restablecimiento de las funciones metabólicas. El proceso de criopreservación involucra la participación de varios criopreservadores además del glicerol (como glucosa, trealosa, prolina, entre otros), por lo que es importante iniciar con un estudio más sencillo, considerando que el glicerol es el único criopreservador presente, donde se requiere una concentración de cuando menos 70 wt% para evitar la cristalización del agua. Las condiciones metabólicas pueden evocarse en nuestros resultados presentados en la sección anterior, los cuales muestran que conforme la temperatura disminuye, mientras en un ser vivo las funciones metabólicas decrecen en la figura 5.3 (a) se muestra que la energía almacenada aumenta y en consecuencia, la disipación cae (como se aprecia en la figura 5.6 (a)). Lo que nos permite sostener que cuando el animal finaliza el proceso de hibernación, su temperatura corporal aumenta y la viscosidad del glicerol disminuye, de tal forma que se restablece el transporte de cargas (como se ve en la figura 5.3 (b)) y, consecuentemente, la disipación de energía se revierte (como se observa en la figura 5.6 (b)). Es decir, para una concentración de glicerol menor al 70 wt% las condiciones de supervivencia no son óptimas. No solamente por la formación de cristales de hielo en el medio extracelular, sino porque la disipación energética es alta. Por supuesto, es claro que en estos experimentos fue

necesario trabajar en temperaturas por encima de aquellas en las que sucede el congelamiento, para poder analizar las señales que posiblemente toman lugar cuando los animales salen de la hibernación (porque en condiciones de congelamiento, las señales iónicas y de disipación desaparecen en la ventana de frecuencias utilizada, como lo indican las figuras 5.3 y 5.6).

Finalmente, es importante notar que la caída de la disipación en la región de los kHz sugiere una posible relación con las frecuencias donde el tráfico de iones se lleva a cabo. Esta sugerencia se basa en el siguiente razonamiento, que se ha mencionado previamente: se sabe que la célula se puede modelar como un circuito eléctrico que funciona en la región de kHz, y el transporte iónico a través de la membrana en las células de diferentes animales muestra un perfil conocido como potencial de acción. El tiempo de duración de los potenciales de acción es muy variado, pero siempre se encuentra en el intervalo de milisegundos [107, 108].

5.2 Agua bajo presión intrínseca

El propósito de esta sección fue estudiar el comportamiento del agua, pero mostramos los resultados del hielo Ih (una fase extensamente estudiada [12, 15, 16, 109], aunque no reportado de forma sistemática como aquí) sólo con fines comparativos. La figura 5.7 muestra la permitividad relativa como función de la frecuencia para el agua (a) y el hielo Ih (b) a diferentes temperaturas (los ajustes para ambas condiciones se hicieron utilizando la ecuación 3.6, $n = 2$). Puede observarse en (a) la respuesta dieléctrica característica para el agua desde 277 hasta 269 K (4 a -4°C), compuesta de una región donde la permitividad relativa es muy alta en las frecuencias más bajas, ocasionada por la polarización de los electrodos; y una segunda región donde la respuesta dipolar resulta en una contribución plana que corresponde al valor estático de ϵ' . Desde 267 hasta 239 K (-6 a -34°C) la relajación de Debye se desplaza a frecuencias más bajas conforme la temperatura disminuye. Resulta intrigante la respuesta en 267 K (-6°C): ésta se separa significativamente del resto de las curvas. Dicha respuesta es reproducible y desconcertante, porque normalmente la polarización de los electrodos desaparece

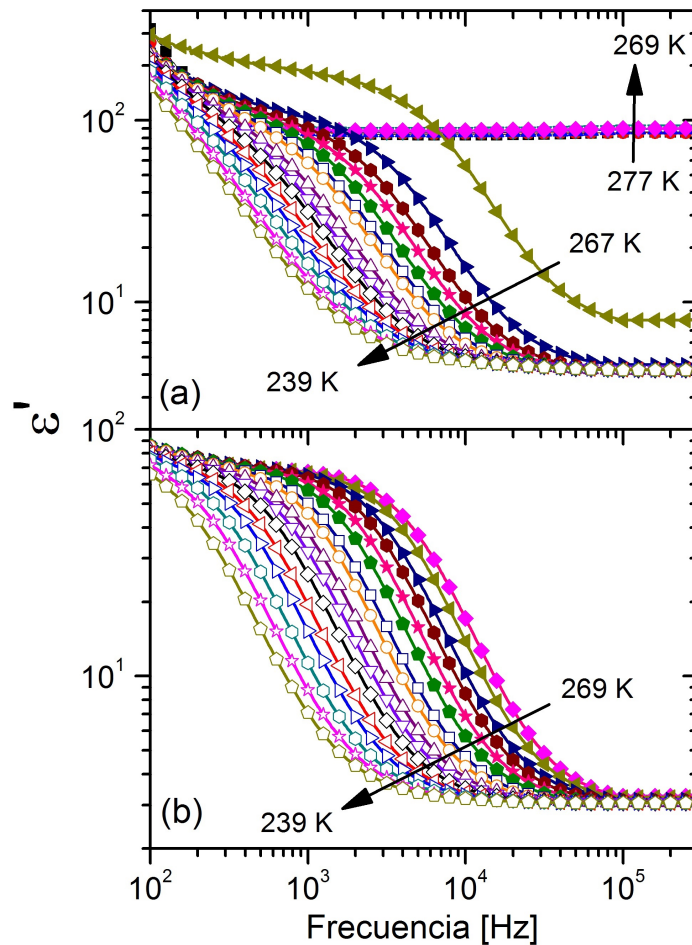


Figura 5.7. Permitividad relativa en función de la frecuencia, desde 277 K a 239 K (4 a -34°C) en intervalos de 2 K para (a) el agua y (b) el hielo lh. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto.

en frecuencias por debajo o cercanas a 10^3 Hz debido a que los iones tienen una difusión lenta y no responden a campos eléctricos rápidos. Sin embargo, como se ve en la figura 5.7 resulta claro que ϵ' es mayor a 100 aún en 10^4 Hz. Los dipolos no pueden ser la fuente de esta respuesta alta, por lo tanto, necesitamos explicar este efecto usando un mecanismo iónico, el cual se discute más adelante.

Aunque la señal de la pérdida dieléctrica está dada normalmente por la parte imaginaria de la función dieléctrica compleja, es preferible graficar la $\tan \delta$ para resaltar los detalles del pico de relajación principal (ver figura 5.8). Nuevamente, existe una clara diferencia entre la respuesta obtenida a 267 K (-6°C) y aquellas que se encuentran por debajo de esta temperatura. Además, mientras las

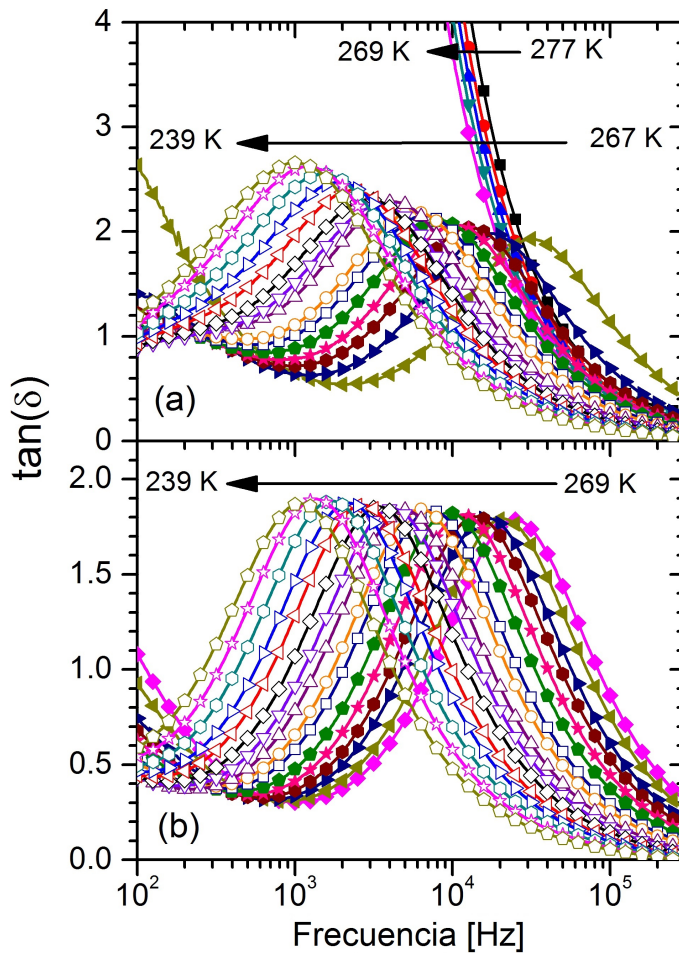


Figura 5.8. Tangente de la pérdida dieléctrica en función de la frecuencia, desde 277 K a 239 K (4 a -34°C) en intervalos de 2 K para (a) el agua y (b) el hielo Ih. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son los ajustes como se describen en el texto.

amplitudes máximas para el hielo Ih son prácticamente las mismas sin importar la temperatura, para el agua van aumentando conforme la temperatura disminuye.

El espectro dieléctrico en las figuras 5.7 y 5.8 (ϵ' y $\tan \delta$) fue ajustado utilizando la ecuación de Havriliak-Negami (ecuación (3.6)), considerando dos procesos dieléctricos: uno corresponde a la polarización de los electrodos (subíndice EP), y el otro a la relajación de Debye (subíndice 1). Además se considera la conductividad en corriente continua.

En la tabla I se presentan los parámetros de ajuste obtenidos al usar la ecuación 3.7 para el agua

T (K)	T (°C)	$\Delta\epsilon_{EP}$	$\Delta\epsilon_1$	τ_{EP}	τ_1	β_{EP}
267	-6	600 ± 725	169 ± 1	$6.71 \times 10^{-3} \pm 7.4 \times 10^{-3}$	$2.15 \times 10^{-5} \pm 5.34 \times 10^{-7}$	1.2 ± 0.1
265	-8	399 ± 33	92 ± 1	$3.63 \times 10^{-3} \pm 3.12 \times 10^{-4}$	$4.21 \times 10^{-5} \pm 4.47 \times 10^{-7}$	1.107 ± 0.013
263	-10	444 ± 19	83 ± 1	$3.63 \times 10^{-3} \pm 1.6 \times 10^{-4}$	$5.49 \times 10^{-5} \pm 3.41 \times 10^{-7}$	1.137 ± 0.007
261	-12	507 ± 20	82 ± 1	$3.78 \times 10^{-3} \pm 1.5 \times 10^{-4}$	$6.73 \times 10^{-5} \pm 3.85 \times 10^{-7}$	1.156 ± 0.006
259	-14	425 ± 14	80 ± 1	$3.05 \times 10^{-3} \pm 1.08 \times 10^{-4}$	$8.43 \times 10^{-5} \pm 7.68 \times 10^{-7}$	1.165 ± 0.009
257	-16	463 ± 15	80 ± 1	$3.15 \times 10^{-3} \pm 1.08 \times 10^{-4}$	$1.05 \times 10^{-4} \pm 1.06 \times 10^{-6}$	1.185 ± 0.009
255	-18	499 ± 15	79 ± 1	$3.3 \times 10^{-3} \pm 1.04 \times 10^{-4}$	$1.19 \times 10^{-4} \pm 1.27 \times 10^{-6}$	1.21 ± 0.01
253	-20	543 ± 20	78 ± 1	$3.52 \times 10^{-3} \pm 1.31 \times 10^{-4}$	$1.59 \times 10^{-4} \pm 2.56 \times 10^{-6}$	1.267 ± 0.017
251	-22	430 ± 13	83 ± 2	$2.9 \times 10^{-3} \pm 9.72 \times 10^{-5}$	$2.08 \times 10^{-4} \pm 4.35 \times 10^{-6}$	1.233 ± 0.024
249	-24	396 ± 14	89 ± 3	$2.65 \times 10^{-3} \pm 1.05 \times 10^{-4}$	$2.63 \times 10^{-4} \pm 6.68 \times 10^{-6}$	1.16 ± 0.03
247	-26	482 ± 24	91 ± 2	$3.32 \times 10^{-3} \pm 1.76 \times 10^{-4}$	$3.25 \times 10^{-4} \pm 9.04 \times 10^{-6}$	1.291 ± 0.048
245	-28	406 ± 13	83 ± 3	$2.81 \times 10^{-3} \pm 1.07 \times 10^{-4}$	$4.17 \times 10^{-4} \pm 9.33 \times 10^{-6}$	1.154 ± 0.041
243	-30	588 ± 71	105 ± 8	$4.37 \times 10^{-3} \pm 5.13 \times 10^{-4}$	$5.51 \times 10^{-4} \pm 1.41 \times 10^{-5}$	1.39 ± 0.08
241	-32	450 ± 25	102 ± 13	$3.72 \times 10^{-3} \pm 3.1 \times 10^{-4}$	$7.05 \times 10^{-4} \pm 3.13 \times 10^{-5}$	1.4 ± 0.1
239	-34	421 ± 38	172 ± 67	$4.33 \times 10^{-3} \pm 8.33 \times 10^{-4}$	$1.07 \times 10^{-4} \pm 1.82 \times 10^{-4}$	1.631 ± 0.115

Tabla 5.1. Parámetros de ajuste obtenidos usando la ecuación 3.7 para el agua bajo presión intrínseca a varias temperaturas

en un volumen restringido a diferentes temperaturas, donde en el proceso de relajación de Debye $\alpha_1 = 1$. Los parámetros β_1 y α_{EP} no se incluyen porque no existe un cambio apreciable en función de la temperatura, sus promedios son $\beta_1 = 0.8232 \pm 0.0017$ y $\alpha_{EP} = 0.9502 \pm 0.0014$. En contraste, el exponente β_{EP} exhibe un comportamiento peculiar: en un principio es un poco mayor a 1 y no cambia con la temperatura, después tiene un incremento apreciable por debajo del punto triple en 252 K (-23°C). La figura 5.9 muestra los tiempos de relajación dieléctrica obtenidos de los ajustes anteriores en función del inverso de la temperatura para el agua y el hielo lh. Los tiempos de relajación del agua son similares a los reportados para el hielo lh [14, 16, 110] pero comienzan a separarse en 251 K (-22°C). Para poder comprender este comportamiento, véase la figura 5.10, que ilustra el diagrama de fases del agua para presiones por debajo de 10^3 MPa [6] en el rango de temperaturas de este trabajo. Resulta evidente que, conforme el líquido se enfría por debajo de 273 K (0°C), la trayectoria termodinámica sigue la línea de coexistencia donde la presión se eleva a valores muy altos. De hecho, obedece a la ecuación de Clausius-Clapeyron:

$$\frac{dP}{dT} = \frac{\Delta H}{T\Delta V}, \quad (5.2)$$

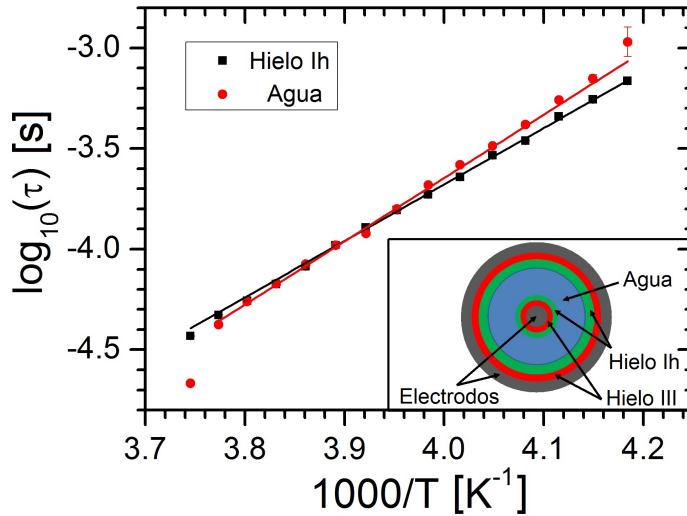


Figura 5.9. Tiempos de relajación dieléctrica en función del inverso de la temperatura para el agua (círculos rojos) y el hielo lh (cuadros negros). El recuadro muestra la sección transversal del capacitor con el agua rodeada por capas delgadas de hielo lh y hielo III.

donde P , T , H y V son la presión, temperatura, entalpía y volumen, respectivamente. La presión aumenta considerablemente contra los electrodos debido a que no se permite el incremento del volumen ($\Delta V = 0$). Así, puede observarse en la figura 5.7 que cerca de 267 K (-6°C) sucede una transición de fase. Sin embargo, esta transición no puede ser de líquido a hielo lh porque para que esto suceda, el hielo lh necesita expandirse. Como el volumen y la masa son constantes, la densidad no cambia. Por lo tanto, de acuerdo con el diagrama de fases, la muestra permanece líquida hasta aproximadamente 210 MPa (en 251 K (-22°C)), cuando se alcanza el punto triple. Esto coincide con la desviación mostrada en la figura 5.9. En este punto, una capa de hielo III comienza a nuclearse sobre la superficie de los electrodos debido a la alta presión sobre ellas. Puesto que el hielo III es más denso que el agua, tan pronto como éste aparece, deja espacio para que una pequeña capa de hielo lh se forme. En el recuadro de la figura 5.9 se muestra el esquema de esta situación. Obviamente, en el interior debe permanecer necesariamente agua líquida, que es la que ejerce presión para la existencia del hielo III.

Los tiempos de relajación en la figura 5.9 tienen un comportamiento de Arrhenius. Uno podría pensar que esto es natural debido a que dos fases están coexistiendo. Sin embargo, no es tan

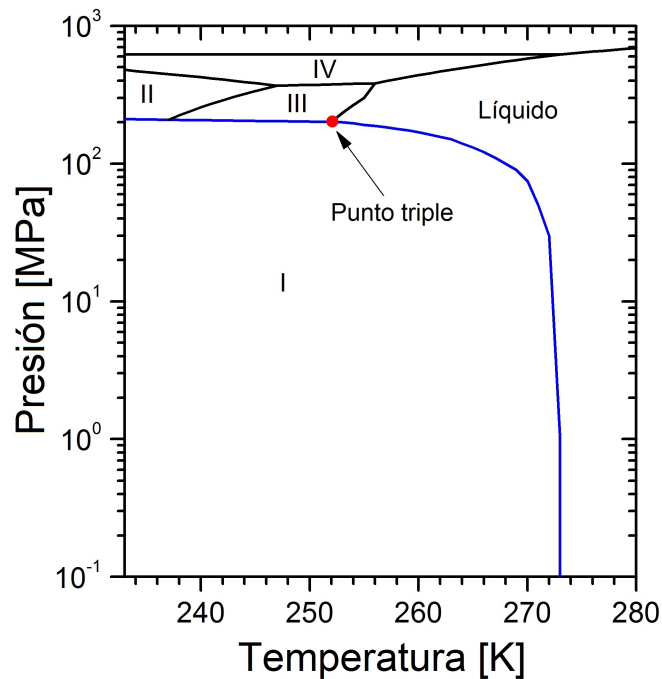


Figura 5.10. Sección del diagrama de fases del agua en el rango de presión y temperatura usado en este trabajo [75].

fácil entender porqué los tiempos de relajación del agua, bajo las condiciones de almacenamiento (presión y temperatura) usadas, son alrededor de 8 órdenes de magnitud mayores que en el agua bajo condiciones ambientales [111–114]. Es posible explicar tales resultados si se revisan trabajos previos [63, 115]. En ellos se establece que al ser comprimidas a muy altas presiones, las moléculas de agua incrementan el número de vecinos cercanos y la red tetraédrica de puentes de hidrógeno se interrumpe o distorsiona por este incremento a presiones altas. En consecuencia, el panorama energético está menos particionado y las moléculas pueden rotar con mayor libertad (la difusión rotacional aumenta [115]). Bajo estas condiciones, el campo eléctrico aplicado no puede alinear los momentos dipolares del agua tan fácilmente (porque la viscosidad aumenta), a menos que la frecuencia del campo sea baja. Por lo tanto, los tiempos de relajación son grandes. En otras palabras, en el hielo la dinámica de los dipolos es muy lenta, pero en el agua bajo presión los dipolos se encuentran anormalmente libres. Es fascinante encontrar que sus tiempos de relajación son similares. De igual

manera, las energías de activación, asociadas a los procesos de relajación dieléctrica, que se obtienen al linealizar los tiempos de relajación son similares: 3.97×10^{20} J para el hielo Ih y 4.54×10^{20} J para la muestra de agua-hielo Ih-hielo III.

Volvamos a la respuesta obtenida en 267 K (-6°C) de la figura 5.7 para analizarla en detalle. Como mencionamos previamente, la alta presión aumenta la rotación molecular. Este evento requiere que al menos dos puentes de hidrógeno se rompan [116]. Coincidentemente, esta reorganización de los puentes de hidrógeno promueve el mecanismo de Grotthuss, el cual se encuentra relacionado con el transporte rápido de protones [37]. A pesar de que algunos expertos indican que el mecanismo de Grotthuss requiere una revisión [117], la imagen generalmente aceptada de este mecanismo es que la difusión estructural en el agua ocurre. Esta difusión es promovida por la topología local de la red de puentes de hidrógeno, y se acopla a los flujos en las líneas de protones, específicamente a compresiones colectivas [118]. Por ello, pensamos que los altos valores de ϵ' se deben a la polarización de electrodos ocasionada por iones rápidos que pueden responder y acumularse a frecuencias mayores a 10^3 Hz. Si esta conjetura es correcta, la isoterma en 267 K (-6°C) de la figura 5.7 nos habla de que la topología de la red para que el mecanismo de Grotthuss suceda en el agua pura, es por demás única. Alejándose de estas condiciones (267 K (-6°C) y cerca de 100 MPa) la polarización de los electrodos decae como es usual. Hasta donde sabemos, esta es la primera ocasión en que la firma dieléctrica del mecanismo de Grotthuss ha sido observada en el estado líquido del agua pura.

5.3 Daño en las membranas de espermatozoides de ratón

Para confirmar la integridad de las membranas de espermatozoides utilizando diferentes condiciones de almacenamiento (no criopreservativas), se realizó el conteo de los mismos en una cámara de Neubauer, tiñéndolos con azul de tripano. El promedio de los resultados de 5 experimentos se ilustra en el histograma 5.11. Cada barra representa el porcentaje promedio de espermatozoides sin daño en la membrana celular. Podemos ver que en las muestras almacenadas a 293 K (20°C) el

porcentaje promedio de espermatozoides con la membrana íntegra es de 43.69 ± 3.84 %, ligeramente diferente del 50.40 ± 2.96 % que se obtiene del conteo de la muestra justo antes de depositarla en los recipientes. Es necesario considerar que en el trabajo de Gerris [119] se plantea que al obtener muestras de espermatozoides, no se espera que la totalidad de los mismos sean viables, debido a que la cantidad de espermatozoides en buen estado se reduce al paso del tiempo, y esta reducción tiene estrecha relación con el tipo de recipiente donde se almacenan las muestras.

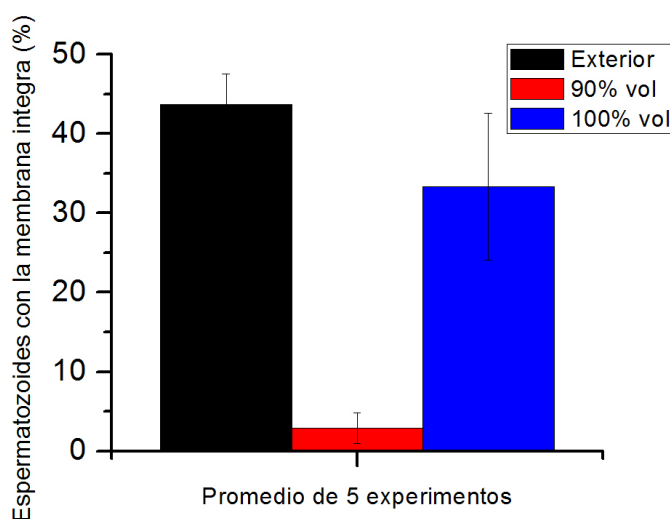


Figura 5.11. Porcentaje promedio de espermatozoides sin daño en la membrana después de ser almacenados en recipientes de acero, aplicando tres condiciones de almacenamiento distintas: 293 K en el exterior (20°C) (negro), 253 K (−20°C) permitiendo la expansión de la muestra (rojo); y 253 K (−20°C) restringiendo el volumen de la muestra (no hay expansión) (azul).

En el caso de los recipientes que fueron inmersos en el baño de circulación a 253 K (−20°C), podemos ver que para el recipiente llenado al 90 % de su capacidad (y que por lo tanto permite la formación de hielo Ih), el porcentaje promedio de espermatozoides con la membrana íntegra se reduce hasta aproximadamente 2.88 ± 1.93 %. Por otro lado, para el recipiente llenado al 100 % de su capacidad (se impide el cambio de volumen y por lo tanto, la formación de hielo Ih), el porcentaje se reduce hasta 33.34 ± 9.3 %. Los resultados sobre la integridad de la membrana al permitir o impedir la formación de hielo Ih, cumplen con las expectativas planteadas en este trabajo para un método de preservación en frío. En el recipiente que permite la formación de este hielo, el cambio de volumen

ocasionado a su vez, por el cambio en la estructura entre las moléculas de agua, produce suficiente estrés mecánico en la membrana de los espermatozoides como para desestabilizarla y dañarla de forma permanente. En el caso en donde el recipiente se llenó al 100 %, se fuerza a las moléculas de agua a permanecer en estado líquido, y al no haber un cambio estructural en el agua, se impide la ruptura de la membrana. Estos resultados confirman que la restricción en el cambio de volumen de la muestra, evita el daño en la membrana de los espermatozoides que resulta del congelamiento. Es posible que este resultado se pueda presentar en otras células al conservarlas bajo condiciones isocóricas.

5.4 Viabilidad de *Escherichia coli*

Se puede comparar el trabajo realizado en esta tesis con la técnica de conservación en alta presión, que se explicó en la sección 3.5, la cual tiene el atractivo de que las condiciones de presión que se utilizan causan un efecto de esterilidad en la muestra. A continuación discutiremos los resultados de los experimentos donde se evaluó la supervivencia (es decir, la viabilidad) de un grupo de bacterias al congelar las muestras en condiciones donde se restringe el volumen, utilizando *E. coli* como bacteria de estudio. En el histograma 5.12 se muestra el promedio de 5 experimentos donde se compara la viabilidad después de su almacenamiento en los recipientes, con la viabilidad del cultivo antes de colocarlo en el recipiente. En el recipiente almacenado en condiciones ambientales del laboratorio, a 293 K (20°C), el número de colonias que se obtiene es de 80.46 ± 32.47 %, cuyo porcentaje puede considerarse similar al número de colonias al inicio del experimento (100 %). En el caso del recipiente que fue llenado al 90 % de su volumen, el número de bacterias que sobreviven a las condiciones de congelamiento a 253 K (-20°C) se ve reducido a un 16.26 ± 11.5 %. En esas condiciones se favorece la formación de hielo Ih, por lo que las bacterias además de lidiar con el estrés térmico, también enfrentan estrés mecánico por el cambio de volumen que ocasiona la formación de hielo, que como ya se explicó antes, ocasiona una gran variedad de daños celulares (como desestabilización de la membrana, desbalance osmótico, etc.) que provocan la muerte de gran parte de la población bacteriana. Por

último, en el recipiente que se llenó al 100 % de su capacidad, el conteo de colonias difícilmente supera el 0.32 ± 0.3 % de la población original. Este último resultado indica que las condiciones de presión alcanzadas son suficientes para matar a las bacterias, como sucede en el proceso de congelamiento en alta presión. Además, nuestros resultados contrastan con lo afirmado por Bartlett [120]: "...la base de todos los efectos de la presión surgen de una sola influencia, es decir, el cambio en el volumen del sistema...", porque en nuestro caso, el daño ocasionado por la presión no proviene de un cambio en el volumen, por lo que el estrés mecánico ocasionado por la presión es el único responsable del daño celular. Es bien conocido que aplicando presiones superiores a 100 MPa por periodos de tiempo de al menos 15 minutos, se generan condiciones suficientes para que *E. coli* muera [120, 121], una de las condiciones a la que se atribuye generalmente es el daño en la membrana [121]. Cuando estas condiciones se presentan, solamente las mutantes barorresistentes de *E. coli* (LMM-1010, LMM-1020 y LMM-1030) sobreviven, y pueden ser seleccionadas por las condiciones de presión implementadas, eliminando a todas cuando la presión alcanza los 700 MPa [121]. Los resultados obtenidos para los espermatozoides de ratón y las bacterias *E. coli* en este trabajo son comparables con los que se obtienen a través de la técnica de conservación en alta presión.

En la última década Preciado y Rubinsky [122] propusieron utilizar un recipiente isocórico, previamente diseñado por Rubinsky [123], para hacer más eficiente la criopreservación de cultivos celulares. Los autores midieron las presiones alcanzadas en función de la temperatura aplicada en el recipiente isocórico teniendo en su interior agua y soluciones con criopreservadores. Estas presiones corresponden a la línea de coexistencia agua - hielo Ih. Los autores sugieren que se forma hielo Ih en esas condiciones, donde la densidad no cambia, y que independientemente de la magnitud de la presión que se puede alcanzar, la formación de este hielo permitiría la criopreservación de cultivos como los de *E. coli*. Sin embargo, en estos trabajos no se realizaron experimentos para comprobar la formación de hielo Ih al interior de los recipientes, como tampoco se utilizó algún cultivo celular para corroborar si la criopreservación podía ser exitosa. Cabe destacar que sus resultados sugieren dos aspectos que resultan contradictorios si se comparan con los resultados que obtuvimos en esta tesis. El primero se

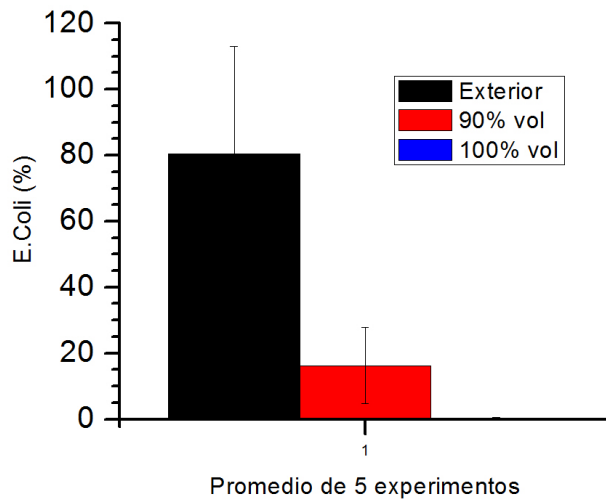


Figura 5.12. Viabilidad promedio de *E. coli* después de almacenar las muestras en recipientes de acero, aplicando tres condiciones de almacenamiento distintas: 293 K (20°C) en el exterior (negro), 253 K (−20°C) permitiendo la expansión libre de la muestra (rojo); y 253 K (−20°C) restringiendo el volumen de la muestra (no hay expansión) (azul).

relaciona con la propuesta de que hay nucleación de hielo Ih sin que la densidad cambie. Considerando que las condiciones de presión y temperatura que midieron los autores siguen la línea de transición entre ambos estados agua - hielo Ih, resulta imposible que el hielo Ih se forme porque, para formarlo, la densidad del hielo con respecto a la del agua en estado líquido debe disminuir. Por ese motivo, en esta tesis se ha argumentado que, al seguir la línea de transición de fase y no permitir el cambio de densidad, el agua permanece en un estado metaestable líquido hasta alcanzar el punto triple agua - hielo Ih - hielo III. En segundo lugar, a pesar de que la idea de utilizar dispositivos isocóricos para simplificar y mejorar la forma en que se criopreservan cultivos celulares resulta atractiva, no puede dejarse de lado el hecho de que las presiones alcanzadas pueden ocasionar suficiente estrés mecánico para volver inviable el cultivo. Este último es el motivo por el cual la técnica de preservación en alta presión no se utiliza para la criopreservación de cultivos celulares, sino en la preservación de productos alimenticios, donde el interés es garantizar ciertos aspectos de textura y calidad, como evitar el daño en las membranas y garantizar condiciones de esterilidad.

Capítulo 6

Conclusiones

En este trabajo se realizaron tres grupos de experimentos: En los dos primeros se hicieron mediciones dieléctricas en la región de frecuencias donde suceden los efectos de polarización de los electrodos debido al transporte iónico, y la relajación dipolar ($10^2 - 10^5$ Hz). En el primer experimento se estudiaron mezclas de agua y glicerol (de 283 a 323 K (10 - 50°C)); y en el segundo se estudió el agua (de 239 a 277 K (-34 - 6°C)) bajo condiciones isocóricas (el volumen del contenedor es constante). En el segundo caso esto genera una presión intrínseca de aproximadamente 200 MPa. El tercer grupo de experimentos consistió en someter en forma independiente a esas condiciones de presión y a una temperatura de 253 K (-20°C) dos tipos de muestras biológicas, espermatozoides de ratón y bacterias *E. coli*. De los resultados obtenidos y discutidos en el capítulo anterior, se desprenden las siguientes conclusiones para los tres experimentos realizados:

- Mezclas de agua y glicerol
 - Aún en las mezclas con concentraciones altas de glicerol, donde la matriz es muy viscosa, el transporte de cargas se lleva a cabo.
 - La disminución en la energía dieléctrica disipada debido al incremento en la concentración

de glicerol, pudiera relacionarse con la depresión en las funciones metabólicas que se presentan durante el proceso de hibernación.

– La caída en la respuesta de la disipación dieléctrica en la región de los kHz sugiere una posible relación con la escala de tiempos donde el transporte celular se lleva a cabo.

- Agua bajo presión intrínseca (condiciones isocóricas)

– La restricción en la expansión libre de la muestra, ocasiona que el pico de relajación α del agua se recorra a frecuencias similares a las del hielo Ih.

– Las condiciones de restricción de volumen macroscópico impiden la formación de hielo Ih y permiten mayor libertad a las moléculas, facilitando el proceso de Grotthuss.

– Se puede lograr la formación de hielo III por una nueva vía aplicando condiciones isocóricas.

- Presión intrínseca en muestras biológicas

– Al restringir el volumen del contenedor y someter a las muestras a una temperatura de 253 K (-20°C) se cumple con algunas de las características atractivas (la membrana no se rompe y hay esterilidad) de la técnica de congelamiento en alta presión, siendo el presente método más fácil de aplicar.

– A pesar de que se ha propuesto que el almacenamiento isocórico puede ser utilizado en la preservación de cultivos, esta técnica no parece apropiada para la criopreservación, debido a que, como sucede para el congelamiento en alta presión, la esterilidad sugiere que es posible que se presenten daños en las células lo suficientemente graves para matarlas durante el almacenamiento, por lo que el cultivo no podría ser recuperado.

Capítulo 7

Perspectivas

Considerando los resultados obtenidos en esta tesis, puede plantearse como trabajo a futuro:

- Incluir otros criopreservadores en la mezcla de agua y glicerol para estudiar el efecto en las propiedades dieléctricas.
- Extender el rango de temperaturas en los experimentos del agua bajo presión, hasta llegar al siguiente punto triple para explorar el cambio de las propiedades dieléctricas.
- Extender los experimentos a otras muestras celulares, por ejemplo eritrocitos, para determinar si los efectos de la presión que se alcanza en condiciones isocóricas son comparables con lo que se conoce para la preservación en frío.
- Estudiar por medio del uso de contenedores isocóricos el efecto de la presión en otras moléculas de relevancia biológica, como proteínas o ADN.
- Investigar el efecto que tiene agregar un criopreservador a una muestra biológica almacenada en condiciones isocóricas.

Capítulo 8

Aportaciones

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en la conferencia **Gordon Research Conference: Chemistry & Physics of Liquids**, celebrada del 4 al 9 de agosto del 2013 en New Hampshire, Estados Unidos.

Algunos de los resultados de esta tesis ya están citados en el sitio de internet especializado en el agua: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/index.html>.

Se publicó un artículo en una revista de circulación internacional indizada, la referencia es:

- Angulo-Sherman, A., Mercado-Uribe, H. (2014). Water under inner pressure: A dielectric spectroscopy study. *Physical Review E*, 89(2), 022406.

Bibliografía

- [1] Angulo-Sherman A., Mercado-Uribe H. *Chem. Phys. Lett.*, 503:p. 327, 2011.
- [2] Chaplin M. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 29:p. 54, 2001.
- [3] Finney J. L., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 359:p. 1145, 2004.
- [4] Canton J. *Phil. Trans. R Soc.*, 52:p. 640, 1761.
- [5] Canton J. *Phil. Trans. R Soc.*, 54:p. 261, 1764.
- [6] Chaplin M. *Water phase diagram*, page www1.lsbu.ac.uk/water/phase.html, 2009.
- [7] Malenkov G. *J. Phys.: Condens. Matter*, 21:283101, 2009.
- [8] Ball P. *Chem. Rev.*, 108:p. 74, 2008.
- [9] Angell C. A. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 34:p. 593, 1983.
- [10] Mishima O., Stanley H. E. *Nature*, 396:p. 329, 1998.
- [11] Debenedetti P. G., Stanley H. E. *Physics Today*, 56:p. 40, 2003.
- [12] Chan R. K., Davidson D. W., Whalley E. *J. Chem. Phys.*, 43:p. 2376, 1965.
- [13] Wilson G. J. et al. *J. Chem. Phys.*, 43:p. 2384, 1965.
- [14] Gough S. R., Davidson D. W. *J. Chem. Phys.*, 52:p. 5442, 1970.

- [15] Johari G. P. *J. Chem. Phys.*, 64:p. 3998, 1976.
- [16] Johari G. P., Whalley E. *J. Chem. Phys.*, 75:p. 1333, 1981.
- [17] Johari G. P., Andersson O. *Termochimica Acta*, 461:p. 14, 2007.
- [18] Bauer M. et al. *Phys. Rev. B*, 77:220105, 2008.
- [19] Taylor A. C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85:p. 595, 1960.
- [20] Sanz Martínez P. D. et al. Congelación de alimentos bajo alta presión. 2004.
- [21] LeBail A. et al. *Int. J. Refrig.*, 25:p. 504, 2002.
- [22] Frauenfelder H. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:p. 5129, 2009.
- [23] Jansson H., Bergman R., Swenson J. *Phys. Rev. Lett.*, 104:017802, 2010.
- [24] Stanley H. E. et al. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 12:p. A403, 2000.
- [25] Sharp K. A., Vanderkooi J.M. *Acc. Chem. Res.*, 43:p. 231, 2010.
- [26] Laney J. R., Richard E. L. *Climate Research*, 5:p. 53, 1995.
- [27] Yancey P. H. J. *Exp. Biol.*, 208:p. 2819, 2005.
- [28] Storey K. B. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.*, 117:p. 319, 1997.
- [29] Storey K. B., Storey J. M. *Freeze tolerance, in biological, physiological and health sciences.*
EOLSS.
- [30] Coriell L. L., Greene A. E., Silver R. K. *Cryobiology*, 1:p. 72, 1964.
- [31] Dashnau J.L. et. al. *J. Phys. Chem. B*, 110:p. 13670, 2006.
- [32] Towey J. J., Soper A. K., Dougan L. *J. Phys. Chem. B*, 115:p. 7799, 2011.

- [33] Chen C. et al. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 916:p. 37, 2009.
- [34] Eleftheria A., Paschalis A. *European Polymer Journal*, 46:p. 324, 2010.
- [35] Westh P., Rasmussen E.L., Koga Y. *J. Solution Chem.*, 40:p. 93, 2011.
- [36] Zhu S. M. et al. *J. Food Eng.*, 125:p. 1, 2014.
- [37] Agmon N. *Chem. Phys. Lett.*, 244:p. 456, 1995.
- [38] Cukierman S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757:p. 876, 2006.
- [39] Markovitch O. et. al. *J. Phys. Chem. B*, 112:p. 9456, 2008.
- [40] Eigen M., De Maeyer L. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 247:p. 505, 1958.
- [41] Bilgram J. H., Gränicher H. *Phys. Cond. Matter*2, 18:p. 275, 1974.
- [42] Kuroiwa D. *Union Geodesique et Geophysique Internationale. IASH*, 4:p. 52, 1956.
- [43] Angulo-Sherman A., Mercado-Uribe H. *Phys. Rev. E*, 89:022406, 2014.
- [44] Blythe T., Bloor D. *Electrical properties of polymers*. Cambridge University Press, 2a. Edición.
- [45] Mauritz K. A. Permittivity, <http://en.wikipedia.org/wiki/Permittivity>. 2008.
- [46] Kao K. C. *Dielectric phenomena in solids*. Elsevier Academic Press, 2004.
- [47] Reimers J. R., Watts R. O. *Chem. Phys.*, 85:p. 83, 1984.
- [48] Buchner R., Hefter G. *PCCP*, 11:p. 8384, 2009.
- [49] Marzec E. *J. Mater. Sci.*, 30:p. 5237, 1995.
- [50] Pietrucha K., Marzec E. *Biophys. Chem.*, 118:p. 51, 2005.
- [51] Marzec E. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 39:p. 558, 2001.

- [52] Viciosa M. T. et al. *Biomacromolecules*, 5:p. 2073, 2004.
- [53] Jarozyk F., Marzec E. *J. Mater. Sci.*, 29:p. 5353, 1994.
- [54] Yongjun L., Mamiko F., Hiroshi K. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 33:p. 393, 1998.
- [55] Barringer S. A., Bican C. Advances in microwave and radio frequency processing, Part II, International Conference on Microwave and High Frequency Heating. 2006.
- [56] Marzec E., Pietrucha K. *Biophys. Chem.*, 132:p. 89, 2007.
- [57] Marzec E., Warchol W. *Bioelectrochemistry*, 65:p. 89, 2005.
- [58] Buchner R. *Pure Appl. Chem.*, 80:p. 1239, 2008.
- [59] Runt J. P., Fitzgerald J. J. Dielectric Spectroscopy of Polymeric Materials. 1997.
- [60] Richert R. *J. Chem. Phys.*, 133:074502, 2010.
- [61] Benedict W. S., Gailar N., Plyler E. K. *J. Chem. Phys.*, 24:p. 1139, 1956.
- [62] Kupfer K. *Electromagnetic Aquametry*. Springer, 2005.
- [63] Kaatze U., Behrends R., Pottel R. *J. Non-Cryst. Solids*, 305:p. 19, 2002.
- [64] Shiue Y. S., Matthewson M. J. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 22:p. 2325, 2002.
- [65] Huang C. et. al. *PNAS*, 106:p. 15214, 2009.
- [66] Lide D. R. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 88va. edición, 2008.
- [67] Sasaki N. *Biopolymers*, 23:p. 1725, 1984.
- [68] Buff M., Steer M., Lazzi G. Design of a microwave dielectric surrogate for soil using aqueous gelatin-syrup solutions, Eur. Microwave Conference. 2005.
- [69] Arunan E. et. al. *Pure Appl. Chem.*, 83:p. 1637, 2011.

- [70] Lynden-Bell R. M. *Water and life: the unique properties of H₂O*. CRC Press.
- [71] Mizuno K. et. al. *Phys. Chem.*, 99:p. 3225, 1995.
- [72] Hayashi Y., Puzenko A., Feldman Y. *J. Non-Cryst. Solids.*, 352:p. 4696, 2006.
- [73] Hayashi Y. et. al. *J. Phys. Chem. B*, 109:p. 9174, 2005.
- [74] Doess A. et. al. *Phys. Rev. Lett.*, 88:095701, 2002.
- [75] Hayashi Y., Puzenko A., Feldman Y. *J. Phys. Chem. B*, 109:p. 16979, 2005.
- [76] Shinyashiki N. et. al. *J. Phys.: Condens. Matter*, 19:205113, 2007.
- [77] Wang Y., Li Y., Zhang J. *J. Chem. Phys.*, 134:114510, 2011.
- [78] Gainaru C. et al. *J. Chem. Phys.*, 128:174505, 2008.
- [79] Vanderkooi J. M., Dashnau J. L., Zelent B. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 1749:p.214, 2005.
- [80] Weng L. et al. *J. Phys. Chem. A*, 115:p. 4729, 2011.
- [81] Park I. S., Saruta K., Kojima S. *J. Thermal Anal.*, 57:p. 687, 1999.
- [82] Kataoka Y. et al. *Appl. Spectrosc.*, 65:p. 436, 2011.
- [83] Puzenko A. et. al. *J. Phys. Chem. B*, 109:p. 6031, 2005.
- [84] Behrends R. et al. *J. Chem. Phys.*, 124:144512, 2006.
- [85] Lunkenheimer P., Loidl A. *Chem. Phys.*, 284:p. 205, 2002.
- [86] Richert R., Agapov A., Sokolov A. P. *J. Chem. Phys.*, 134:104508, 2011.
- [87] Sudo S. et al. *J. Non-Cryst. Solid.*, 307:p. 356, 2002.

- [88] Sengwa R. J., Sankhla S., Shinyashiki N. *J. Solution Chem.*, 37:p. 137, 2008.
- [89] Emmert S. et al. *Eur. Phys. J. B*, 83:p. 157, 2011.
- [90] Wubbenhorst M., van Turnhout J. *J. Non-Cryst. Solids.*, 305:p. 40, 2002.
- [91] Sangoro J. R., Kremer F. *Acc. Chem. Res.*, 45:p. 525, 2012.
- [92] Segur J. B., Oberstar H. E. *Ind. Eng. Chem.*, 43:p. 2117, 1951.
- [93] Nakagata N. *Mamm. Genome*, 11:p. 572, 2000.
- [94] Liu L. et al. *J. Vis. Exp.*, 58:e3713, 2011.
- [95] Watson P. F. *Anim. Reprod. Sci.*, 60:p. 481, 2000.
- [96] Parks J. E., Graham J. K. *Theriogenology*, 38:p. 209, 1992.
- [97] Hsu H. Y., et al. *Food Microbiol.*, 40:p. 25, 2014.
- [98] Robinson G. W., Cho C. H., Urquidi J. *J. Chem. Phys.*, 111:p. 698, 1999.
- [99] Angell C. A. *J. Non-Cryst. Solids.*, 354:p. 4703, 2008.
- [100] Towey J. J., Koper A. K., Dougan L. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13:p. 9397, 2011.
- [101] Kostál V. et al. *J. Comp. Physiol. B*, 183:p. 749, 2013.
- [102] Pedersen S. A. Zachariassen K. E., Kristiansen E. *Cryobiology*, 48:p. 126, 2004.
- [103] Zachariassen K. E. Kristiansen E. *J. Insect. Physiol.*, 47:p. 585, 2001.
- [104] Flanigan J. E. Guppy M., Fuery C. J. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B:p. 175, 1994.
- [105] Muller M. *Frog Neurobiology*. Springer-Verlag.
- [106] Tyrakowski T. Kosik-Bogacka D. I. *Folia Biologica*, 55:p. 47, 2007.

- [107] Phillips R., Kondev J., Theriot J. *Physical biology of the Cell*. 2009.
- [108] Nelson P. *Biological Physics*. 2008.
- [109] Kawada S. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 47:p. 1850, 1979.
- [110] Bruni F., Consolini G., Careri G. *J. Chem. Phys.*, 99:p. 538, 1993.
- [111] Agmon N. *J. Phys. Chem.*, 100:p. 1072, 1996.
- [112] Buchner R., Barthel J., Stauber J. *Phys. Rev. Lett.*, 306:p. 57, 1999.
- [113] Okada K. et al. *J. Chem. Phys.*, 110:p. 3026, 1999.
- [114] Bertolini D., Cassettari M., Salvetti G. *J. Chem. Phys.*, 76:p. 3285, 1982.
- [115] Prielmeier F. X. et al. *Phys. Rev. Lett.*, 59:p. 1128, 1987.
- [116] Bagchi B. *Chem. Rev.*, 105:p. 3197, 2005.
- [117] Hassanali A. et al. *PNAS*, 110:p. 13723, 2013.
- [118] Codorniu-Hernández E., Kusalik P. G. *PNAS*, 110:p. 13697, 2013.
- [119] Gerris J. *Hum. Reprod. Update*, 5:p. 211, 1999.
- [120] Bartlett D. H. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1595:p. 367, 2002.
- [121] Hauben K. J. et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:p. 945, 1997.
- [122] Preciado J. A., Rubinsky B. *Cryobiology*, 60:p. 23, 2010.
- [123] Rubinsky B., Perez P. A., Carlson M. E. *Cryobiology*, 50:p. 121, 2005.