



Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Monterrey

**Deshidratación de una membrana biológica por
evaporación en un ambiente con condensación restringida**

Tesis que presenta

Gustavo Armando Hernández Galván

**para obtener el Grado de
Doctor en Ingeniería y Física Biomédicas**

Directora de Tesis

Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

Apodaca, Nuevo León

Agosto 2024

Agradecimientos

Un agradecimiento grande a la Dra. Hilda Mercado, por su infinita paciencia y su guía en todo el proyecto, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Al Dr. Carlos Ruíz por sus consejos, su apoyo y su ayuda con parte del equipo para realizar experimentos.

A mis amigos, Ricardo y Kevin que me apoyaron aclarando dudas y platicando de todo un poco.

A mi compañero Daniel Ortega, gracias por tu amistad.

A mi amigo Ángel, quien me ayudó a finalizar este proyecto.

A mis papás, quienes me apoyaron en todo momento.

A mi hermana Yadira, quien me escuchó y apoyó cuando era necesario.

Al CONAHCYT por el apoyo proporcionado estos 4 años.

Al CINVESTAV-Unidad Monterrey por permitir desarrollarme y por el uso de sus instalaciones.

Resumen

El estudio del proceso de deshidratación en una membrana celular nos permite comprender mejor cómo se une el agua a ella. Si bien los estudios previos sobre la deshidratación celular se analizan comúnmente en condiciones de estrés osmótico, en el presente trabajo nos centramos en la deshidratación provocada por la evaporación en un ambiente de condensación restringida. Utilizando el método de termogravimetría, estudiamos la deshidratación de *Escherichia coli* mediante evaporación isotérmica en presencia de un flujo de gas. Para determinar la pérdida de masa en esta situación, primero evaluamos la dinámica de la evaporación del agua de una suspensión de liposomas multilaminares. Descubrimos que la evaporación de moléculas de agua de suspensiones liposomales compuestas de lípidos individuales es constante, aunque ligeramente restringida por la presencia de liposomas, mientras que la evaporación de suspensiones liposomales compuestas de una mezcla de diferentes lípidos sigue una disminución exponencial. Esto se explica considerando que la presión interna en la interfaz aire-agua es proporcional a la cantidad de agua unida. La evaporación del agua de una muestra de biomasa sigue este último comportamiento.

Abstract

The study of the dehydration process in a cell membrane allows a better understanding of how water is bound to it. While prior studies of cell dehydration are commonly analyzed in osmotic stress conditions, in the present work we focus on the dehydration driven by evaporation in a restricted condensing environment. Using a thermogravimetry method we studied the dehydration of *Escherichia coli* through isothermal evaporation in the presence of a gas flux. To figure out the loss of mass in this situation, we first evaluated the dynamics of water evaporation from a suspension of multilamellar liposomes. We found that the evaporation of water molecules from liposomal suspensions composed of individual lipids is constant, although slightly restricted by the presence of liposomes, while the evaporation from liposomal suspensions composed of a mixture of different lipids, follows an exponential decay. This is explained considering that the internal pressure at the air-water interface is proportional to the amount of bound water. The evaporation of water from a biomass sample follows this last behavior.

Índice general

Capítulo I

Introducción	1
1.1 Importancia del agua	1
1.1.1 Daños por deshidratación en DNA y RNA.....	6
1.1.2 Daños por deshidratación en proteínas.....	6
1.1.3 Daños por deshidratación en la membrana citoplasmática	6
1.1.4 Otros mecanismos de daño por deshidratación	6
1.1.5 Especies de bacteria.....	7
1.1.6 Condiciones de crecimiento	7
1.1.7 Concentración celular	7
1.1.8 Rehidratación.....	7
1.2 <i>Escherichia coli</i>	8
1.2.1 Membrana de <i>E. coli</i>	14
1.3 Liposomas	15
1.3.1 Sonicación	16
1.3.2 Extrusión.....	17
1.3.3 Película delgada	17
1.3.4 Características de los liposomas.....	17
1.4 Uso de la termogravimetría en la biología	19
1.5 Agua confinada	20
1.6 Hipótesis.....	22

1.7 Objetivo general.....	22
18. Objetivos específicos.....	22
Capítulo II	23
Materiales y Métodos.....	23
2.1 Preparación de liposomas	23
2.2 Preparación del cultivo de bacterias	23
2.3 Análisis de la evaporación del agua mediante TGA.....	24
2.4 Efectos de un flujo de helio en el proceso de evaporación	24
2.5 Preparación de muestras de <i>E. coli</i>	24
2.7 Análisis termogravimétrico de los liposomas	25
Capítulo III	26
Resultados.....	26
3.1 Efectos de un flujo de helio constante	26
3.2 Isotermas de liposomas.....	27
3.2.1 Isoterma de liposoma DPPC.....	27
3.2.1 Isoterma de liposoma DMPC	27
3.2.3 Isoterma de liposoma DMPC-DPPC (50:50)	30
3.2.4 Isoterma de suspensión de <i>E. coli</i>	30
Capítulo IV.....	37
Discusión	37
Capítulo V.....	42
Conclusiones	42

Perspectivas.....43

Bibliografía..... 44

Índice de tablas

Tabla 1 Temperaturas de incubación de bacterias..... 8

Tabla 2 Temperaturas de transición lípidos 25

Índice de figuras

Figura 1 Descripción del proceso de evaporación de un cuerpo de agua líquido.	3
Figura 2 Bacteria deshidratada a) al aire b) por ósmosis	5
Figura 3 Esquematización de la pared externa de <i>E. coli</i>	10
Figura 4 Patrones de evaporación de gotas. a) <i>E. coli</i> MTCC443 mótil, b) <i>E. coli</i> DH5a mótil, c) <i>L. salivarius</i> no-mótil, d) <i>E. coli</i> MTCC443 no-mótil, e) <i>E. coli</i> DH5a no-mótil y f) <i>L. salivarius</i> no-mótil	11
Figura 5 Micrografías de <i>E. coli</i> a diferentes niveles de deshidratación, diferentes choques osmóticos: a) medio isoosmótico, b) 26 MPa, b) 40 MPa, d) 80 MPa	13
Figura 6 Estructura de un liposoma con una bicapa lipídica.	16
Figura 7 Efecto de un flujo de helio constante (60 ml/ min) en el proceso de evaporación de una gota de agua.....	26
Figura 8. a) Proceso de evaporación a 47°C de 50 µl de una solución de DPPC al 2% comparando con una muestra control (agua Mili-Q).....	28
Figura 9. a) Proceso de evaporación de una suspensión al 2% de DMPC en comparación con agua Mili-Q a 37°C. b) Primera derivada como función del tiempo.	29
Figura 10. a) Proceso de evaporación de una suspensión de DMPC-DPPC (50:50) a 37°C comparando con una muestra control (agua). b) Primera derivada como función del tiempo.	31
Figura 11 a) Dinámica de la evaporación de una suspensión de <i>E. coli</i> al 5%, medida a 37 °C. En color negro se muestra el caso del agua Mili-Q. b) Primera derivada como función del tiempo.....	32
Figura 12. Pérdida de peso en función del tiempo (línea continua) y su ajuste (línea a trazos) en casos representativos de la suspensión DMPC-DPPC y la biomasa de <i>E. coli</i>	35

Capítulo I

Introducción

1.1 Importancia del agua

El agua es uno de los recursos más importantes en el mundo, está presente en casi todos los aspectos de la humanidad, se usa en un sinnúmero de actividades. Los humanos estamos constituidos por tres partes de esta sustancia. El agua es una de las moléculas más estudiadas en la Tierra, por lo que es sorprendente saber que no sólo la gente común, sino también los científicos tienen un entendimiento muy pobre de ella, pero esto es debido a sus propiedades muy peculiares (Chaplin, 2001).

Se conocen algunos aspectos del agua, su fórmula química es H_2O , forma puentes de hidrógeno, por lo que sus moléculas tienden a compactarse en agregados, los cuales a su vez forman redes; al exponer los agregados al calor, estos tienden a disminuir su tamaño, su integridad y proporción. El agua tiene varias propiedades "anómalas", como lo son, su comportamiento diferente cuando se encuentra en medios confinados, el cambio de la densidad con la temperatura y el cambio de la viscosidad con la presión, la presencia de pentámeros y hexámeros en su conformación, su habilidad como solvente de iones, etc. Estas propiedades pueden ser explicadas por la estructura que puede tomar (Chaplin, 2001).

El agua en la biología tiene un papel importante. Las moléculas de agua son componentes críticos en los mecanismos de reacción, además de que contribuyen a la estabilidad de proteínas, DNA, lípidos, y confieren un orden estructural a la célula (Potts, 1994). Hasta 1980, la mayoría de los biólogos no tomaban en cuenta las propiedades del agua y la función que ésta tiene en la maquinaria celular. De hecho, sólo era tomada en cuenta para el desdoblamiento de proteínas. El agua en las células representa alrededor del 70-80% de su masa total, se creía que ésta sustancia sólo servía para el proceso de difusión y no participaba activamente en el transporte de metabolitos y la actividad molecular, como ya es muy conocido.

Por su ubicación dentro de las células, el agua se clasifica de dos maneras: la extracelular, que es aquella que se encuentra en el exterior de la célula, y la intracelular, la que se encuentran dentro de la célula, en el protoplasma. Dentro del mismo protoplasma, el agua se puede encontrar en diferentes compartimientos: citoplasma y periplasma (Potts, 1994). En el interior de la célula, el agua se puede clasificar en dos grandes grupos, el agua en bulto, que se encuentra en mayor cantidad dentro de la célula y a la que se le atribuye la difusión de moléculas; y el agua ligada, la cual se encuentra estrechamente asociada a proteínas y macromoléculas. Las moléculas de agua se localizan inmediatamente alrededor de las proteínas e interaccionan constantemente con éstas para realizar funciones relevantes, como el plegamiento de éstas, intercambio de iones, y reacciones químicas (Mentré, 2012). Por sus funciones y relevancia que el agua tiene sobre las células y los organismos, el estudio de la pérdida de ésta tiene relevancia biológica.

Una de las formas en que se puede dar la pérdida de agua en un sistema, es mediante la deshidratación. La deshidratación se refiere al déficit de agua en un cuerpo, que viene acompañado de una disrupción del proceso metabólico y ocurre cuando la pérdida de agua libre excede la entrada de ésta al sistema. Otra forma en la que se puede perder el agua es mediante la evaporación. A pesar de que ha existido una investigación extensiva respecto al proceso de evaporación, muchas interrogantes quedan sin responder respecto a la evaporación y a la condensación del agua, esto dado por los numerosos parámetros interdependientes y su mecanismo físico correspondiente. Para dar un ejemplo, durante la evaporación del agua, se da simultáneamente el proceso de condensación, por lo que, los coeficientes de condensación y evaporación son relevantes para describir el proceso. Hay más factores a tomar en cuenta en este proceso, como lo son la presión, la temperatura y la masa (Marek & Straub, 2001).

En la figura 1 se puede observar que, durante la evaporación, ocurre un proceso de condensación simultáneamente. El agua en estado líquido se vuelve gas e intenta escapar a la atmósfera, pero al mismo tiempo sobre este líquido se encuentra agua en estado gaseoso, por lo que al momento de querer incorporarse a

la atmósfera pueden pasar tres situaciones. 1) Logra incorporarse a la atmósfera. 2) Al momento de salir es reflejada y se vuelve a reincorporar a la capa líquida, o 3) Sustituye a una molécula de vapor de agua, pero una molécula en estado gaseoso se incorpora al líquido. Así mismo, en la condensación de las moléculas de agua en estado gaseoso, se pueden dar tres procesos 1) Una molécula en estado gaseoso se incorpora al líquido. 2) Una molécula de gas se incorpora sustituyendo a una molécula de agua, o 3) Es reflejada por las moléculas de agua en estado líquido y no logra condensarse.

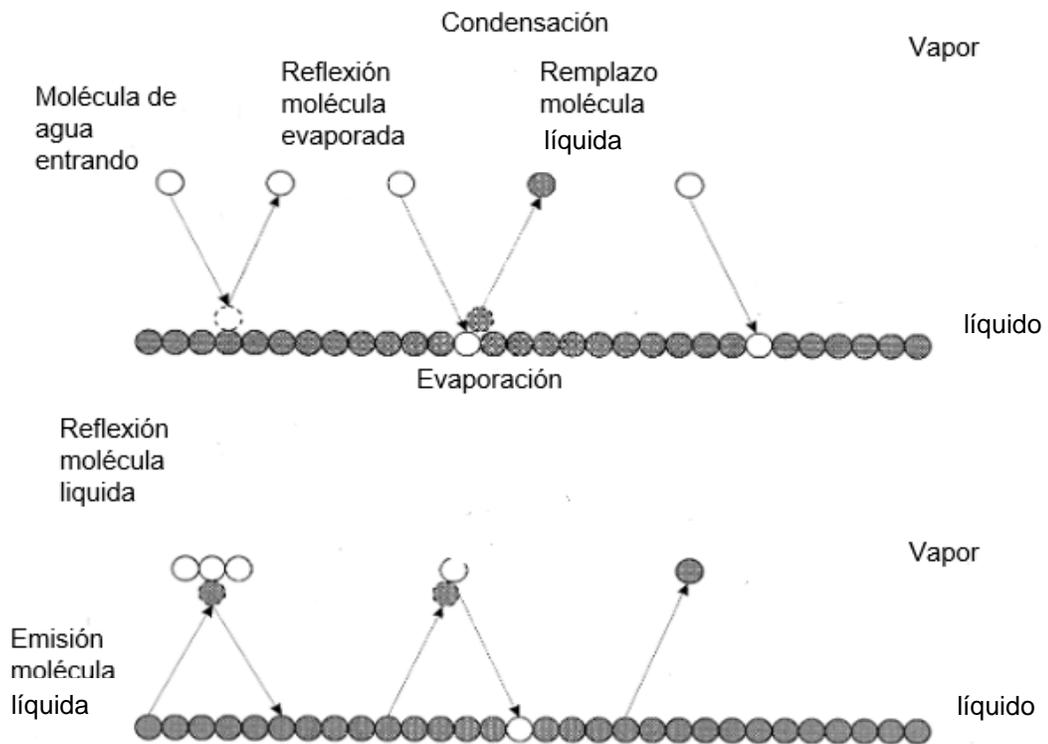


Figura 1 Descripción del proceso de evaporación de un cuerpo de agua líquido (Mark & Strauss, 2001).

El proceso de evaporación de una gota de agua se ha descrito a través de diferentes ecuaciones matemáticas, una de la más usada es la ecuación Hertz-knudsen-Schrage (Marek & Straub, 2001):

$$\frac{dm_{net}}{dt} = \frac{2}{2-C_C} \left(\frac{M}{2\pi R} \right)^{1/2} \left[C_C \frac{P_V}{T_V^{1/2}} - C_V \frac{P_L}{T_L^{1/2}} \right], \quad (1)$$

donde los términos involucrados representan lo siguiente:

C_C = Coeficiente de condensación

C_V = Coeficiente de evaporación

M = Masa por mol ($\frac{kg}{mol}$)

P = Presión ($\frac{N}{m^2}$)

R = Constante universal de los gases ($\frac{J}{(mol)(k)}$)

T = Temperatura (k)

l = Líquido

V = Vapor

La ecuación (1) describe los diferentes parámetros que afectan la evaporación de una gota de agua, mostrando lo relevante del coeficiente de condensación. En el caso de los organismos, la pérdida de agua puede conllevar a un estado de deshidratación. La habilidad de perder agua para después rehidratarse y tener una tolerancia a la deshidratación es una capacidad que no es abarcada por un conjunto de organismos en particular, y solo se tienen registros de tolerancia a la deshidratación de bacterias, plantas, semillas, insectos, levaduras, hongos, crustáceos (Potts, 1994a).

A nivel celular, los mecanismos posibles por los cuales una célula puede perder el agua son dos: el secado al aire y la ósmosis, siendo el último mecanismo el más

usado para estudiar el proceso en bacterias y células (Potts, 1994a).

La pérdida de agua dentro de una célula se puede dar a una velocidad rápida o lenta, dependiendo del agua total que la célula pierde, se puede causar un déficit de agua a un grado mediano, moderado, severo o extremo; y esto conlleva a diferentes tipos de respuestas por parte de la célula (Lievensse & van't Riet, 1994).

La figura 2 muestra la representación del medio interno y externo de una bacteria deshidratada bajo dos tipos de tratamientos distintos, a) al aire y b) por ósmosis. La salida del agua se indica por la flecha negra vertical, y los solutos por círculos sólidos. La deshidratación se produjo de manera rápida (segunda columna) y lenta (tercera columna). Como se puede ver, la deshidratación lenta en cualquiera de los dos tratamientos, ósmosis o al aire, ayuda a que se conserve de mejor manera la estructura de la bacteria.

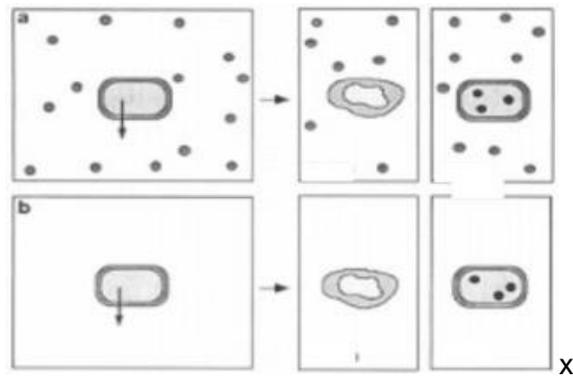


Figura 2 Bacteria deshidratada a) al aire b) por ósmosis, modificada de Potts, 1994a.

La pérdida de agua lleva a la inactivación por calor de las células y bacterias. Aún no se sabe cómo es que está inactivación funciona, pero se ha reportado que hay cuatro sitios en los cuales se pueden causar daños irreversibles que conllevan a la muerte celular, estos son: 1. DNA, 2. RNA, 3. proteínas y enzimas

4. El daño por pérdida de agua puede ocurrir en toda la célula, por lo que es difícil determinar cuál de ellos es el que causa la muerte celular, pero se cree que es el DNA y RNA quienes tienen el papel más importante (Lievensse & van't Riet, 1994).

1.1.1 Daños por deshidratación en DNA y RNA

Los daños causados por la deshidratación en el DNA y RNA han sido observados en levaduras, donde en el proceso de congelado-secado, la cromatina de las levaduras se condensa como una forma de defensa a la pérdida de agua (Lieveense & van't Riet, 1994).

1.1.2 Daños por deshidratación en proteínas

En el caso de las proteínas, se cree que el calor causa una reacción entre los grupos amino de las proteínas y los componentes carbonílicos de las células. Así mismo se piensa que removiendo el agua de la célula, se remueve el agua ligada, a la que se le atribuye una función en la estructura de las proteínas, por lo que removerla, afectaría la estabilidad de las proteínas (Lieveense & van't Riet, 1994).

1.1.3 Daños por deshidratación en membrana citoplasmática

Se asume que es el principal lugar de daño al momento de la deshidratación celular. Es evidente que, al dañarse la pared celular, componentes intracelulares salgan de ésta, como lo son cationes, nucleótidos, enzimas, proteínas, aminoácidos o materiales de absorción de luz ultravioleta (UV). Se cree que los daños de la membrana en bacterias como *E. coli*, ocurren en los fosfolípidos que se encuentran ahí. Se pasa de una conformación alfa a beta al irse removiendo las moléculas de agua que se encuentran intercaladas entre las cabezas de los lípidos, lo que influye en la fluidez de la membrana (Lieveense & van't Riet, 1994).

1.1.4 Otros mecanismos de daño por deshidratación

Conforme se va perdiendo el agua, la concentración de solutos dentro de la célula va cambiando, lo que causa un cambio en la ósmosis, que puede llevar a una plasmosis (Lieveense & van't Riet, 1994).

Para poder resistir la deshidratación, hay varios mecanismos y factores que ayudan a una bacteria a sobrellevar este proceso. Éstos son los siguientes: la especie de bacteria, las condiciones de crecimiento, la concentración celular y proceso de

rehidratación.

1.1.5 Especies de bacteria

La resistencia que se tiene contra la deshidratación difiere dependiendo del tipo de bacteria, siendo las grampositivas las más resistentes (Lieveense & van't Riet, 1994).

1.1.6 Condiciones de crecimiento

La fase de crecimiento de las bacterias es importante para su sobrevivencia. La composición de la membrana celular posiblemente cambie con las condiciones del medio de cultivo, así como la fase de crecimiento en la que se encuentran. Las bacterias son más resistentes al proceso de deshidratación en la fase estacionaria, aunque no se sabe en qué tiempo de la fase estacionaria se logran mejores resultados, pero se sabe que en esta fase se acumula ATP, cosa que en la fase exponencial no sucede, se cree que este ATP podría ayudar al momento de la rehidratación. De igual manera, la composición del medio de crecimiento ayuda a la resistencia contra la deshidratación (Lieveense & van't Riet, 1994).

1.1.7 Concentración celular

Deshidratar un gran número de bacterias concentradas ayuda a la sobrevivencia, esto se cree que es porque al irse deshidratando, las bacterias liberan compuestos al ambiente que pueden servir como protección para las otras bacterias presentes. (Lieveense & van't Riet, 1994).

1.1.8 Rehidratación

La rehidratación bacteriana es de los procesos más complejos, se tienen que tomar en cuenta condiciones como composición del medio, osmolaridad, temperatura y pH del medio de rehidratación. Al querer rehidratar un conjunto de bacterias deshidratadas, nos encontramos con que se pueden encontrar en tres procesos. Estos son: muertas, dañadas y sin haber sido afectadas.

El medio importa porque células dañadas, quizás no crezcan en un medio hecho

para células intactas, pero sí en medios que estén diseñado para células deshidratadas. En algunos casos, como lo es el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, un medio mínimo se ha registrado como el que tiene mejores resultados, esto se cree que es porque los medios complejos podrían tener componentes que interfieren con los mecanismos de reparación de la célula (Lievense & van't Riet, 1994).

Así mismo, la temperatura a la cual se lleva la rehidratación es importante, no hay un estándar para todas las bacterias, depende de la cepa, y la temperatura óptima de crecimiento de ésta no siempre es la usada, ya que en ocasiones otras temperaturas tienen un efecto más favorable. En la tabla 1 se pueden observar diferentes temperaturas óptimas, así como sus máximas de crecimiento.

Clasificación	Ejemplo	Mínima	Óptima	Máxima
Psicotróficos	<i>Vibrio marinus</i>	0 < 15	20	> 20
Mesoófilos	<i>E. coli</i>	15 - 20	35 - 42	> 45

Tabla 1 Temperaturas de incubación de bacterias, grados Celsius (°C).

1.2 *Escherichia coli*

El uso de organismos modelo para la investigación de algún tema es algo muy frecuente. Varios de los descubrimientos realizados durante el siglo XX se dieron sólo usando seis organismos: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus* (Matthews & Vosshall, 2020). Dentro de estos organismos, las bacterias son organismos ampliamente usados siendo *Escherichia coli* una de las bacterias más usadas hoy en día.

Escherichia coli, fue descubierta por un pediatra alemán en 1885, es una enterobacteria flagelada que se puede encontrar en la flora intestinal de todos los seres humanos, se localiza en los intestinos de diferentes organismos de sangre caliente, y constituye alrededor del 0.1% de la flora normal de los intestinos. Es una bacteria gramnegativa, anaerobia facultativa y no esporuladora. Sus medidas son 2 micrómetros de largo y 0.25 a 1 micrómetro de ancho. Su temperatura de crecimiento

óptima es de 37°C, pero puede crecer en temperaturas de hasta 49°C. Su forma de división es por fisión binaria, la cual consiste en que a partir de una célula se dan dos células genéticamente iguales, a menos que se de alguna mutación (Taj, M. K., Samreen, Z., Ling, J. X., Taj, I., Hassan, T. M., & Yunlin, 2014). Esta bacteria puede llegar a ser patógena, siendo su principal forma de transmisión oral-fecal. No puede sobrevivir mucho tiempo en el medio ambiente, por lo que es usada normalmente como un indicador de contaminación fecal (Taj, M. K., Samreen, Z., Ling, J. X., Taj, I., Hassan, T. M., & Yunlin, 2014).

E. coli es una de las bacterias más diversas en cuanto a fenotipo se refiere, de hecho, sólo alrededor del 20% del genoma es igual en todas las cepas. Siendo la cepa K-12 una de las más utilizadas para los estudios de recombinación de DNA. Las cepas de *E. coli* tienen características únicas, que van desde cambios en los ciclos fisiológicos o de vida, la habilidad de usar una fuente de carbono diferente, resistencia a algún agente antimicrobiano, entre otras. La mayoría de estas cepas son exclusivas de algún organismo, lo que les permiten ser usadas como indicadores de contaminación fecal, además de poder dilucidar de que organismo proviene esta contaminación.

De todas las cepas, la más virulenta es la cepa O157:H7, que causa enfermedades serias en personas inmunocomprometidas, niños y ancianos (Taj, M. K., Samreen, Z., Ling, J. X., Taj, I., Hassan, T. M., & Yunlin, 2014).

Como modelo de estudio, *E. coli* ha sido utilizada por alrededor de 60 años. Puede ser crecida de forma fácil y barata. Es un organismo flexible para la producción de proteínas heterólogas, por lo que es utilizada para la producción de proteínas recombinantes y es fácil su producción masiva a nivel industrial. *E. coli* ha sido modificada para ser usada en el desarrollo de vacunas, en los procesos de biorremediación y en la fabricación de biocombustibles.

En estudios de laboratorio, *E. coli* es modificada para hacerla inmune a antibióticos o se le añaden marcadores, como la proteína gfp, que es un marcador que le permite brillar y poder diferenciar la cepa utilizada (Taj, M. K., Samreen, Z., Ling, J. X., Taj, I., Hassan, T. M., & Yunlin, 2014).

Una de las características más conocidas y estudiadas de *E. coli* es su pared

celular. Se han utilizado un conjunto de técnicas diferentes para dilucidar la composición de esta membrana, como es la microscopia electrónica. Gracias a estas pruebas se conoce que la capa externa de la membrana está compuesta por una mezcla de proteínas, lípidos y polisacáridos, como se puede observar en la Figura 3 (Amro et al., 2000).

Las bacterias gramnegativas poseen una membrana externa fuera de la capa de peptoglicanos, la cual le sirve como una barrera de permeabilidad selectiva, además, protege a la bacteria de agentes dañinos, como detergentes, medicamentos, toxinas y enzimas degradadoras (Amro et al., 2000).

En el caso de *E. coli*, ésta cuenta con una capa bilipídica asimétrica, en la cual su parte interna está conformada por lípidos empaquetados, mientras que la externa por polisacáridos. Ésta cumple un papel importante en la sobrevivencia de *E. coli*, dado que es la encargada de actuar como una barrera de permeabilidad selectiva. La permeabilidad está dada por la densidad y el arreglo de los lipopolisacáridos (Amro et al., 2000).

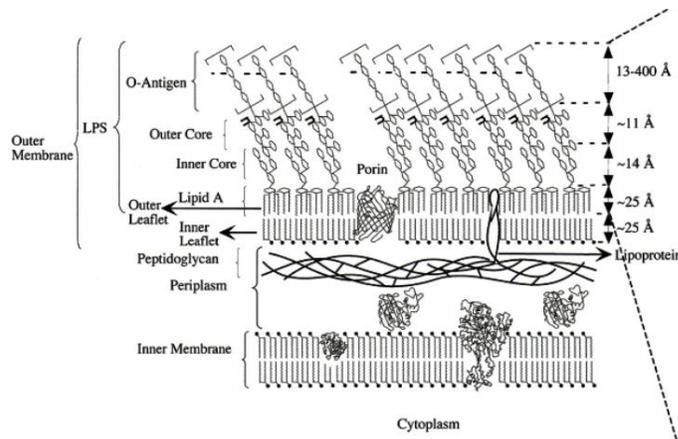


Figura 3 Esquematización de la pared externa de *E. coli* (Amro et al., 2000).

Son las características anteriormente mencionadas, las que han hecho que *E. coli* sea utilizada en un sinnúmero de experimentos, entre los cuales se incluyen ensayos relacionados con los efectos de deshidratación, como en los siguientes:

En el artículo "Patrones de evaporación inducida por gotas que contienen bacterias móviles y no-móviles" (Sommer & Dan, 2007), se estudiaron tres diferentes cepas de bacterias, *E. coli* MTCC433, *E. coli* DH5a y *Lactobacillus salivarius*. Las tres cepas se usaron con y sin motilidad (La motilidad es la facultad de moverse de cierta materia viva en presencia de ciertos estímulos). El objetivo era formar gotas con soluciones de las diferentes bacterias y observar su patrón al irse evaporando. En la Figura 4 se pueden observar los diferentes patrones obtenidos después de la evaporación y cómo es que la forma se conserva en bacterias móviles.

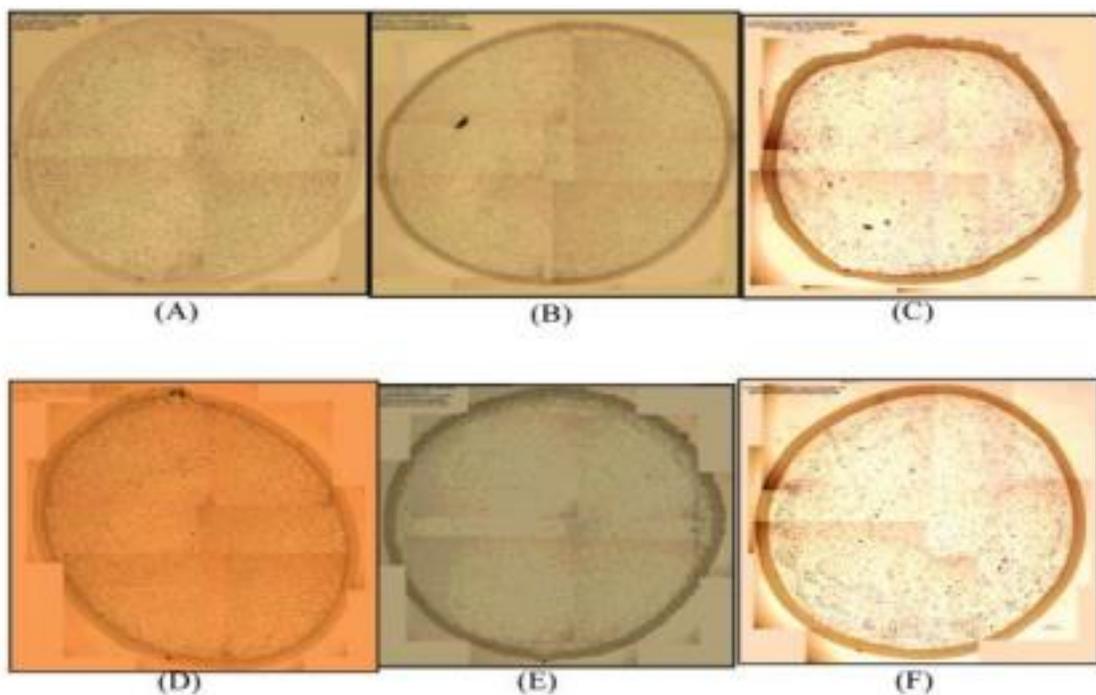


Figura 4 Patrones de evaporación de gotas. a) *E. coli* MTCC443 móvil, b) *E. coli* DH5a móvil, c) *L. salivarius* no-móvil, d) *E. coli* MTCC443 no-móvil, e) *E. coli* DH5a no-móvil y f) *L. salivarius* no-móvil (Sommer & Dan, 2007).

Si bien, en el artículo anterior se puede ver los efectos de la evaporación del agua que contiene bacterias, hay estudios que se enfocan en los efectos que la pérdida de agua tiene sobre los organismos, y en específico, sobre *E. coli*.

En el artículo publicado por L. Beney et al. en el 2004, se analizaron los efectos de la deshidratación por ósmosis en *E. coli*. Para esto realizaron tres ensayos con los

que se logró caracterizar los efectos en los diferentes niveles de deshidratación, los cuales fueron, micrografía electrónica, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y medición de la anisotropía fluorescente de la membrana bacteriana. El ensayo se llevó a cabo utilizando *E. coli* en la fase estacionaria, la cual fue expuesta a diferentes concentraciones de glicerol para cambiar la presión osmótica, y, por ende, el nivel de deshidratación. En el caso de los ensayos de fluorescencia y micrografía, se utilizaron cultivos de *E. coli*, mientras que en el ensayo de FT-IR se utilizaron lípidos extraídos de la membrana de *E. coli*.

En la Figura 5 se pueden ver los cambios morfológicos que sufre *E. coli* a diferentes niveles de deshidratación.

En los ensayos de fluorescencia y FT-IR, se observaron cambios. En el ensayo de fluorescencia anisotrópica se obtuvo un aumento de dicha fluorescencia, lo que indica un aumento en la rigidez de la membrana, y esto nos quiere decir que, conforme los niveles de deshidratación aumentan, la fluidez disminuye. El análisis por FT-IR mostró el movimiento de un -CH₃ en el punto 2853 cm⁻¹. Este carbono correspondiente a los lípidos encontrados en la membrana sufrió un desplazamiento, lo que indica un cambio en la conformación de los lípidos, pasando de una conformación alfa (fase en la que los lípidos de la membrana se encuentran de forma fluida) a una beta (fase en la que los lípidos de la membrana se compactan y aumentan su rigidez); es decir, hubo un compactamiento de la estructura, lo que lleva a una disminución de la fluidez de la membrana (Beney et al., 2004).

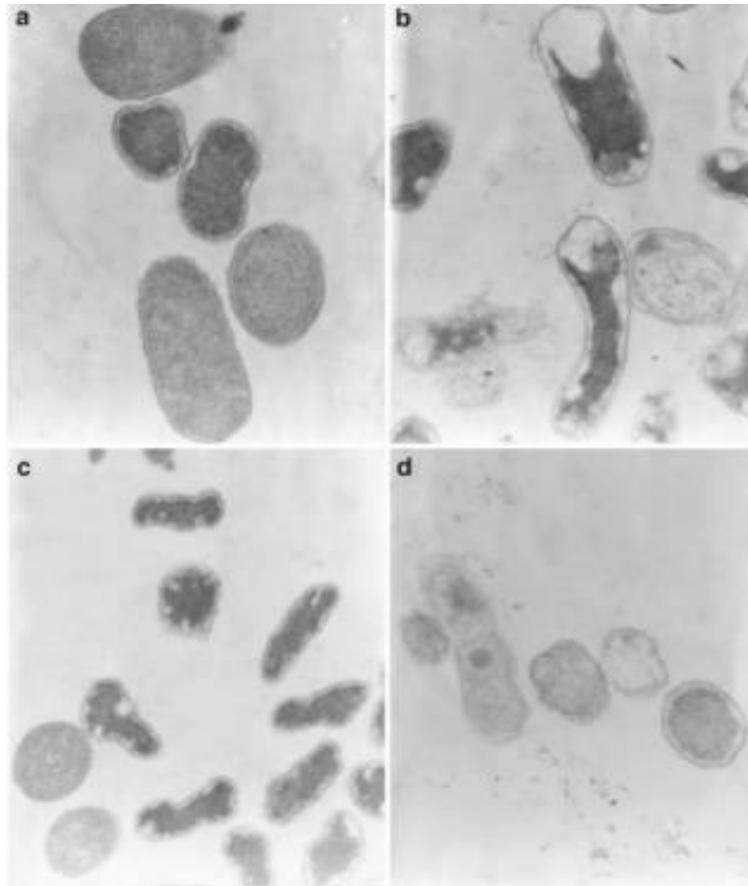


Figura 5 Micrografías de *E. coli* a diferentes niveles de deshidratación, diferentes choques osmóticos: a) medio isoosmótico, b) 26 MPa, b) 40 MPa, d) 80 MPa (Beney et al., 2004).

Si bien este tipo de ensayos nos permiten ver los efectos de la deshidratación en *E. coli*, este proceso aun no es estudiado en su totalidad y hay un sinfín de ensayos y técnicas que nos pueden ayudar a entender el proceso de una mejor forma, como lo son la termogravimetría, FT-IR, la microscopia de fuerza atómica, pruebas de viabilidad, etc. Cabe resaltar que, la mayoría de los estudios de deshidratación, utilizan la ósmosis como forma de deshidratación y no el secado al ambiente. Además de enfocarse en los efectos que tiene sobre la bacteria y no en la dinámica del proceso.

1.2.1 Membrana de *E. coli*

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por tener dos membranas, la interna y la externa. La interna, llamada membrana plasmática, está compuesta por una bicapa de fosfolípidos. Mientras que la membrana externa consiste en proteínas, porinas, receptores y una distribución asimétrica de lípidos, así como lipopolisacáridos. Estas dos membranas están separadas por un espacio de alrededor de 4 nm de ancho, llamado periplasma (Chatterjee & Chaudhuri, 2012). La pared celular se puede encontrar en una gran variedad de formas y tamaños, siendo sus cualidades más importantes la tolerancia al estrés y el mantenimiento de la forma. Se ha demostrado que la forma de la célula juega un papel fundamental en las regulaciones de funciones importantes en las bacterias, como lo son la motilidad y la diferenciación celular (Chatterjee & Chaudhuri, 2012).

Se estima que la pared de *E. coli* tiene un grosor de 4 nm (K. C. Huang et al., 2008). Esta estructura tiene varias funciones, por ejemplo, actúa como una barrera protectora y selectiva para la difusión de sustancias hacia el interior o exterior de la célula (Marek & Straub, 2001). *E. coli* ha sido usada como organismo modelo para el estudio de la membrana y sus propiedades tanto estructurales como funcionales. Se sabe que su pared contiene canales hidrofílicos que permiten el transporte no específico a través de la membrana externa. Así mismo, cuenta con proteínas transmembranales que permiten el transporte de diferentes sustancias, como lo es el hierro, ácidos grasos, vitamina B12, entre otras (Molloy et al., 2000).

Las características mencionadas con anterioridad han sido estudiadas y abordadas por diferentes autores y de diferentes maneras. En un experimento se midieron los efectos que tenía la presencia de etanol en la membrana celular, observando que este alcohol en el ambiente cambia la conformación de la pared celular, reduciendo el número de fosfolípidos presentes en ésta, y con ello, disminuyendo el área de lípidos presentes, y por lo tanto reduciendo el fenómeno de difusión pasiva, evitando el escape de iones de la célula. Se evaluó cómo los cambios en la temperatura cambian la fluidez de la membrana, al igual que el etanol.

En este experimento se describe que la membrana de *E. coli* tiene un gradiente de fluidez, así como se hace hincapié en el aumento de fluidez que da el aumento de temperatura, el mismo fenómeno se repite con el aumento del porcentaje de etanol presente en el ambiente (Dombek & Ingram, 1984).

Una parte importante del estudio de la membrana es uno de sus componentes en específico, los lípidos presentes, dado que estos juegan un papel importante en el mantenimiento de las funciones de la membrana, como se ha ido mencionando hasta el momento. Por lo que se han usado modelos biofísicos como biofilms o liposomas para su estudio.

1.3 Liposomas

Los liposomas son vesículas cerradas formadas por material lipídico, que se puede suspender en un medio acuoso. Cuentan con una o más capas, que asemejan a la estructura de la membrana celular, separando de esta forma el agua exterior de la interior (Huang et al., 2014).

Los liposomas se componen de fosfolípidos, que son moléculas con una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Una de las capas conformadas por las cabezas se encuentra atraída por el agua ambiental, mientras que la otra capa formada por las cabezas se encuentra en el interior atraídas por el agua dentro de la célula. Mientras que las colas de las dos capas se encuentran interaccionando entre ellas, formando así la bicapa lipídica (Jodhpur, Shivalik Jodhpur, 2012). Un ejemplo puede verse en la Figura 6.

Los liposomas se pueden clasificar según su morfología en los siguientes grupos: vesículas multilaminares (MLV), las cuales contienen varias capas, vesículas unilaminares pequeñas (SUV), vesículas unilaminares grandes (LUV); y mutivesículas y vesículas gigantes (GUVs). Estas estructuras pueden ser obtenidas mediante el autoensamblaje de ciertas moléculas anfipáticas (Maja et al., 2020).

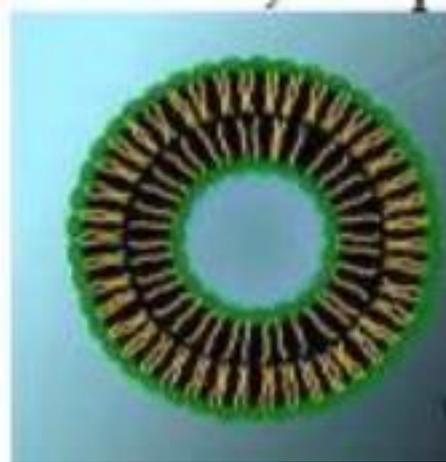


Figura 6 Estructura de un liposoma con una bicapa lipídica. Se observa cómo las cabezas hidrofílicas están orientadas hacia los cuerpos de agua externos e internos, mientras que las colas interaccionan entre sí.

Los liposomas tienen usos muy variados, que van desde vehículos acarreadores de fármacos, coadyuvantes en vacunas, potenciadores de señal para diagnósticos médicos y en bioquímica analítica (Daraee et al., 2016). En el área alimentaria, los liposomas son usados como acarreadores de sabores y nutrientes, así como acarreadores de antimicrobianos (Khanniri et al., 2016). Los liposomas han sido utilizados ampliamente para imitar las membranas biológicas y estudiar la oxidación de los fosfolípidos, e interacciones proteínas-lípidos (Chen et al., 2013).

Existen diferentes maneras de formar los liposomas, entre las que se encuentran las siguientes:

1.3.1 Sonicación

La sonicación es el método más utilizado para la preparación de SUVs. Se utilizan dos tipos, ya sea con aguja o con baño de sonicación. Las desventajas de este método es que se obtiene un bajo porcentaje de encapsulación y se eliminan moléculas grandes (Akbarzadeh et al., 2013).

1.3.2 Extrusión

Se trata de pasar la solución de liposomas por poros del tamaño que queramos la partícula. Una de las desventajas es que se trabajan con volúmenes pequeños, siendo 50 ml el límite máximo (Akbarzadeh et al., 2013).

1.3.3 Película delgada

Para la formación de liposomas compuestos de lípidos poco solubles, se utiliza la técnica de película delgada, la cual consiste en diluirlos en algún solvente, sea alcohol, cloroformo, etc. Se mezclan y se evaporan hasta formar una película delgada, la cual es rehidratada posteriormente para la formación de los liposomas (Oropeza-Guzman & Ruiz-Suárez, 2018).

1.3.4 Características de los liposomas

Por sus usos tan variados, existen un número de propiedades físicas y químicas que se analizan, como lo son, la morfología, el tamaño, el índice de polidispersidad, su composición química, número de capas y carga de superficie (Chen et al., 2013).

En el caso de la cantidad de capas ideales para los liposomas, los unilaminares han sido ampliamente utilizados para el transporte de diferentes sustancias (Chun et al., 2013).

Una vez formados los liposomas, hay primordialmente dos mecanismos con que los liposomas se desestabilizan, que son la oxidación y la hidrólisis. En el caso de la oxidación, aunque todos los ácidos grasos son susceptibles, los insaturados lo son aún más. Mientras que la hidrólisis se da en los enlaces éster (Ingvarsson et al., 2011).

La estabilidad en los liposomas es uno de los factores más importantes, dado que la pérdida de ésta es la que ocasiona la liberación del contenido. Se busca que éste no sea liberado antes de llegar a su destino, por lo que una buena estabilidad es indispensable. Uno de los factores que la afectan, es la composición de los liposomas. El agregar colesterol en ciertos porcentajes a la mezcla, ayuda a que los liposomas tengan mayor estabilidad.

Las cadenas saturadas en las colas de los lípidos, también la aumentan. Otra de las opciones para la estabilidad, es formar liposomas con lípidos que contengan diferentes temperaturas de transición (temperatura en la cual la mitad de los lípidos se encuentran en estado gel y la otra mitad en estado cristalino) (Anderson & Omri, 2004).

En el caso de la eficacia de encapsulación, es interesante el mencionar como lípidos de cola corta son la mejor opción. Mientras más corta sea la cola, más eficaz es la encapsulación (Anderson & Omri, 2004).

Al ser los liposomas vehículos de transporte, es importante conocer la velocidad con que liberan su contenido, esto se ve afectado por varios factores, entre los que se encuentra el coeficiente de difusión lateral de los lípidos (las moléculas se difunden de manera lateral dentro de la misma capa). Una de las técnicas que se han utilizado para medirlo, es la resonancia magnética nuclear (Gaede & Gawrisch, 2003). En un trabajo con la bacteria *T. acidophilum*, se comprobó que al aumentar la temperatura 20°C arriba de la recomendada para su crecimiento, la difusión lateral de los lípidos de su membrana aumentaba para mantener la fluidez de ésta (Jarrell et al., 1998). Adicionalmente, se ha visto que al disminuir la hidratación del liposoma entre un 15-40% el coeficiente de difusión lateral de los lípidos se ve reducido considerablemente, aun cuando se encuentre en fase cristalina (Wu & Huang, 1981).

El estudio de la velocidad con que las sustancias salen del liposoma por difusión ha sido a través de la permeabilidad de la membrana y de ensayos indirectos. Aunque hay métodos más directos con los que se podría intentar hacer un acercamiento, siendo uno de éstos la termogravimetría.

1.4 Uso de la termogravimetría en la biología

Hay métodos térmicos para la investigación de elementos, estos métodos son utilizados para caracterizar un sistema (elemento, compuesto o mezcla) al medir los cambios en sus propiedades fisicoquímicas en función al incremento de la temperatura. Dos métodos comunes para este tipo de ensayos son: a) el análisis térmico diferencial, que mide los cambios en el contenido de calor al incrementar la temperatura y b) la termogravimetría, que mide los cambios en la masa de la muestra con respecto al incremento de temperatura (Bottom, 2008).

En el caso de la termogravimetría, es necesario dos cosas: una balanza sumamente precisa y un horno que permita controlar cuidadosamente el incremento de temperatura (Bottom, 2008). Esta estrategia se logra con el equipo TGA (*thermogravimetric analyzer*), el cual permite calentar una muestra a una temperatura fija o a una rampa de temperatura usando un flujo constante de gas para tener una atmósfera controlada. Esta técnica nos permite obtener información sobre procesos como fusión, vaporización, sublimación, absorción, adsorción, desorción, degradación oxidativa y descomposición (Bottom, 2008).

En un estudio del 2002, se analizó la evaporación de agua salada, recreando las condiciones del mar a través de un arreglo experimental en el que se controló el calor, la corriente de aire que corría sobre el agua y la salinidad de ésta. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: cuando había una corriente de aire sobre el agua, el proceso de evaporación de ésta se daba de una forma más rápida. Esto se le atribuye al que, al haber una corriente de aire constante, se está reduciendo/eliminando el proceso de condensación que se da simultáneamente. Otra de las cosas que observaron fue que, al haber una mayor cantidad de sal, la velocidad de evaporación disminuía (Al-Shammiri, 2002).

Aunque hay experimentos que estudian la evaporación o la pérdida de agua, en el caso de las bacterias no hay ningún antecedente, ni para ver cómo concentraciones diferentes de bacterias cambian la dinámica de evaporación del agua, ni cómo es que se pierde el agua dentro de una bacteria, ya sea en estado óptimo o después de haber sufrido de algún tipo de tratamiento, como la lisis por calor, o tras haber sido expuesta a algún agente antimicrobiano.

1.5 Agua confinada

En las bacterias podemos hablar de diferentes tipos de agua, la extracelular y la intracelular, siendo la extracelular toda el agua que se encuentra fuera de la célula y la intracelular la que está dentro de ésta. El agua dentro de la bacteria se puede clasificar en dos, el agua libre o en bulto, que es la que se encuentra en mayor medida dentro de la célula y es la que se encarga de funciones como la difusión. Mientras que el agua ligada, es aquella que se encuentra circundando proteínas, organelos, enzimas, etc. Esta agua tiene funciones de tipo estructural (Ball, 2002).

Elucidar el rol que tiene el agua confinada nos permite investigar el mecanismo molecular que rige la fricción, adhesión, transporte en canales de iones y las fuerzas entre superficies que son mediadas por agua (Malani et al., 2009). Así, se ha estudiado el agua confinada en diferentes tipos de sistemas, uno de estos sistemas han sido los nanotubos de carbón. En un experimento realizado en el 2017, se demostró la aparición de diferentes estructuras de agua, dependiendo del tipo de nanotubo que la confinara. En el caso de nanotubos de carbón angostos, se vio la formación de filas sencillas de agua, mientras que, en nanotubos de carbón más anchos, aparecieron estructuras del tipo n-gonal (Chakraborty et al., 2017).

En otro estudio realizado en el 2001 se confirmó que usando una combinación de técnicas experimentales en combinación con simulaciones de dinámica molecular, se podían obtener y caracterizar mejores resultados. En este caso, se utilizó la microscopía electrónica para ayudar a elucidar la estructura del agua (Bellissent Funel, 2001).

Uno de los aspectos interesantes respecto al agua confinada, es las interacciones que ésta tiene con superficies hidrofóbicas. Durante más de 25 años se ha discutido de la existencia de este tipo de fuerza, sin embargo, la mayoría de los estudios para analizar esto eran realizados en superficies lisas. En 2006 se encontró que esto no aplicaba para superficies rugosas, descubriendo que el rango de las interacciones hidrofóbicas podía llegar a niveles de micrómetros (Singh et al., 2006). Por lo anterior, se buscó analizar la dinámica de evaporación del agua libre, así como del agua confinada.

1.6 Hipotésis

Es posible el distinguir el agua confinada del agua libre dentro de una célula.

1.7 Objetivo general

Identificar los diferentes tipos de agua dentro de una célula.

1.8 Objetivos específicos

- Caracterizar la dinámica de evaporación de Eschericia Coli.
- Uso de un modelo biofísico para la emulación de la bicalipida de E. coli.
- Caracterizar la dinámica de evaporación del modelo biofísico.
- El uso de un modelo matemático para el análisis de las dinámicas de evaporación obtenidas.

Capítulo II

Materiales y Métodos

2.1 Preparación de liposomas

Se utilizaron lípidos liofilizados para la preparación de liposomas: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) y 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin, (DPPC), todos ellos adquiridos en Avanti Polar Lipids. Estos lípidos están compuestos de cadenas de 14 y 16 átomos de carbono, respectivamente. Cada muestra de lípidos fue pesada utilizando una balanza analítica (Explorer EX224, OHAUS) para preparar una solución acuosa de vesículas multilaminares (MLVs). El liofilizado de lípidos (3 mg) fue hidratado en 150 µl de agua desionizada (Milli-Q) para obtener una concentración final del 2%. Las muestras fueron puestas en un agitador magnético a 280 rpm durante 1 h, y calentadas arriba de la temperatura de transición del lípido usado. Las suspensiones fueron conservadas en un frasco ámbar hasta su uso.

2.2 Preparación del cultivo de bacterias

Escherichia coli K12-MG-1655 fue cultivada usando el caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) y glicerol al 20%. Para los experimentos se inoculó 1 ml de medio con *E. coli*, en un matraz que contenía 25 ml de medio LB, y se incubó a 37°C a 180 rpm. Las muestras fueron tomadas cada 15 minutos para medir su densidad óptica usando un espectrofotómetro. Las muestras fueron medidas cuando su densidad óptica fue de alrededor de 0.5, lo que garantizó que estuvieran en fase exponencial.

2.3 Análisis de la evaporación del agua mediante TGA

La medición y el análisis de las muestras se llevó a cabo usando un Analizador Termogravimétrico (TGA) Q500 (TA, Instruments). Se vertieron 50 µl de agua Mili-Q en una charola de platino, y se evaluaron los cambios en la pérdida de masa de la muestra. Las mediciones concluían cuando la muestra estaba completamente seca.

Los experimentos fueron realizados por triplicado. El control utilizado fue agua desionizada (Mili-Q). Se realizó la evaporación termogravimétrica utilizando para empezar, las siguientes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100°C.

2.4 Efectos de un flujo de helio en el proceso de evaporación

En el equipo TGA se evaluaron los efectos que tiene un flujo de helio constante en la evaporación (Marek & Straub, 2001). Se vertieron 50 µl de agua MiliQ en una charola de platino, se procedió a calentarla usando dos temperaturas distintas, 30°C y 40°C, durante un lapso de 120 minutos. Con dos condiciones de flujo de gas, la primera, con un flujo de helio constante de 60 ml/min y la segunda, sin exposición a gas. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.5 Preparación de muestras de *E. coli*

Se evaluaron dos tipos de muestras: líquidas y sólidas.

Muestras líquidas (suspensiones):

Se realizaron mediciones de suspensiones de *E. coli* en fase exponencial. Esto se logró suspendiendo la biomasa en 50 µl de agua Mili-Q, obteniendo una concentración final del 5%. Para homogenizarla, se llevó la suspensión a un vórtex y se expuso a una agitación de 180 rpm durante 1 minuto.

Muestra sólida (biomasa):

En tubos falcon de 50 ml se depositaron 50 ml de medio LB, el cual contenía *E. coli* en fase exponencial. Posteriormente, se centrifugó a 4500 rpm durante un lapso de 10 minutos, hasta la formación de un pellet de 10 mg.

2.7 Análisis termogravimétrico de los liposomas

Se vertieron 50 μ l de las respectivas suspensiones de liposomas en una charola de platino. Una vez que la balanza termogravimétrica alcanzó la temperatura deseada y se estabilizó, se realizó la medición de la pérdida de peso de la muestra en función del tiempo, exponiendo cada suspensión a temperaturas arriba de su temperatura de transición (TM). A continuación, se anexa una tabla del lípido, su TM y la temperatura a la cual se analizó.

Lípido	Temperatura de transición reportada(°C)	Temperatura usada (°C)
DPPC	42	37
DMPC	22	47
DPPC-DMPC	-	37

Tabla 2 Temperaturas de transición lípidos usados en este estudio.

Capítulo III

Resultados

3.1 Efectos de un flujo de helio constante

Antes de iniciar el estudio de la evaporación de las muestras de interés, se realizó un análisis para evaluar la influencia de un flujo de gas en este proceso usando una muestra de agua Mili-Q. Se observó que la presencia de un flujo de helio en el proceso de evaporación de la gota de agua disminuye considerablemente el tiempo en que ocurre este proceso, para ambas temperaturas de interés (30°C y 40°C), como se observa en la Figura 7. Por otra parte, la pendiente es mayor cuando se usa una temperatura más elevada.

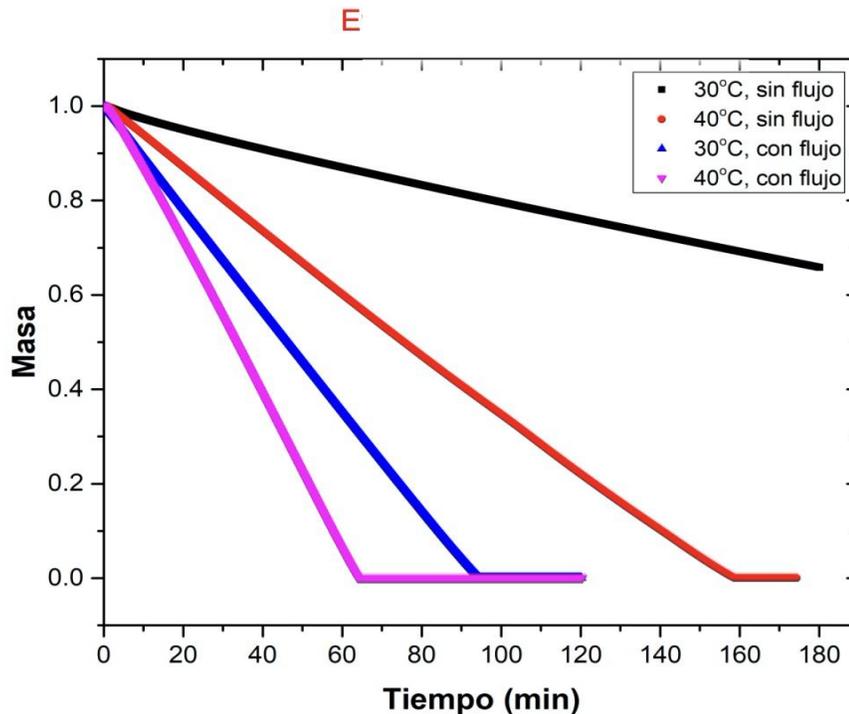


Figura 7 Efecto de un flujo de helio constante (60 ml/ min) en el proceso de evaporación de una gota de agua.

3.2 Isotermas de liposomas

3.2.1 Isotherma de liposoma DPPC

Las mediciones subsecuentes fueron realizadas en presencia de un flujo de helio (60 ml/ min) a través de ensayos isotérmicos, en el caso de los liposomas, arriba de su temperatura de transición de fase. En cada muestra se obtuvo la respuesta de la pérdida de peso y la primera derivada respecto al tiempo. En la Figura 8 se presenta el caso de los liposomas de DPPC. Se puede notar que la estabilización de la temperatura ocurre durante los dos primeros minutos de la medición. Ambas muestras (control y suspensión) se evaporan en forma constante, pero en la muestra de interés esto ocurre más lentamente; es decir, los lípidos afectan la evaporación de las moléculas de agua. Se destaca una curva al final de proceso de evaporación, que no se presenta en el control (ver el inset). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

3.2.1 Isotherma de liposoma DMPC

Se procedió en forma análoga para los liposomas de DMPC, los cuales fueron medidos a una temperatura de 37°C. Como era de esperarse, la evaporación ocurre más lentamente que en el caso anterior, ya que las isotermas se realizan a temperatura menor, ver Figura 9. Nuevamente, antes de que finalice la medición, el proceso de evaporación se desacelera, como se observa en el caso anterior.

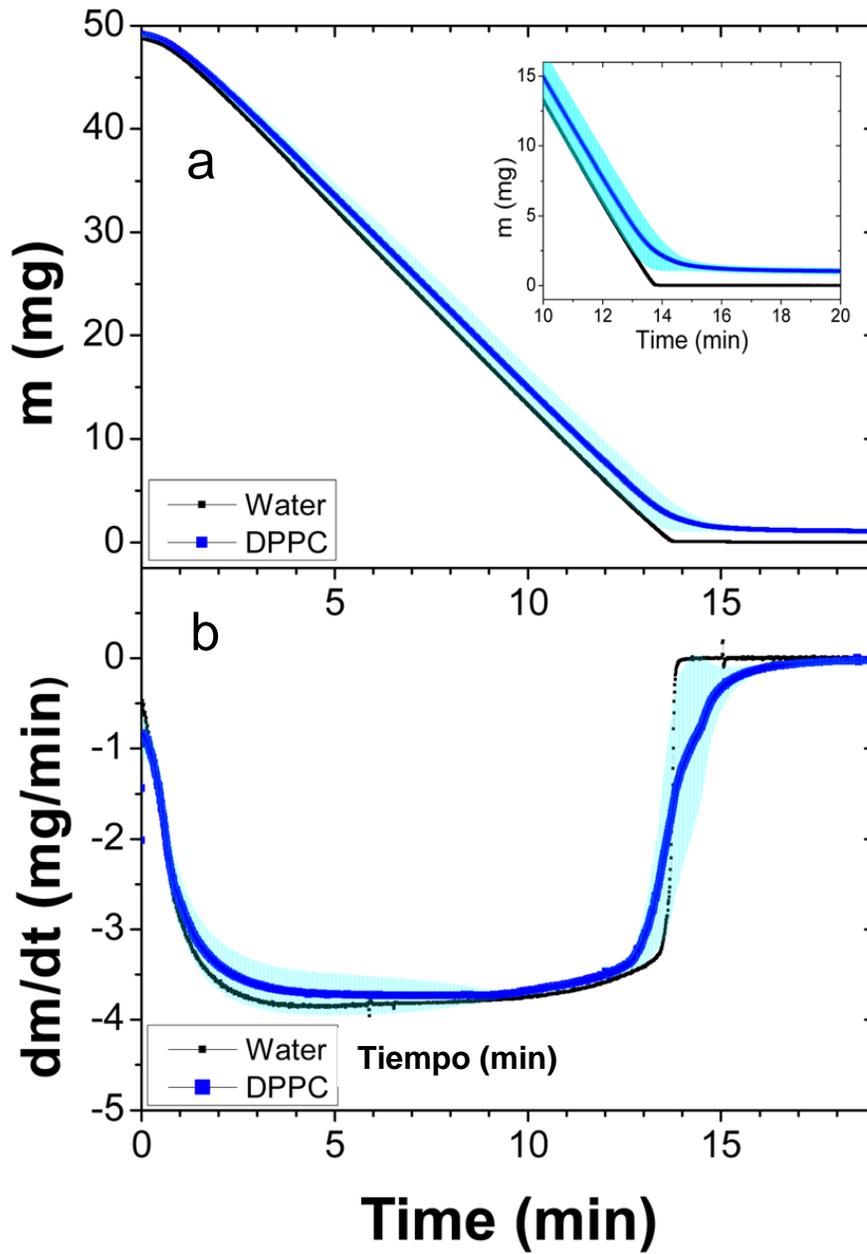


Figura 8. a) Proceso de evaporación a 47°C de 50 μ l de una solución de DPPC al 2% comparando con una muestra control (agua Mili-Q). En el inset se muestra la pérdida de peso durante los últimos minutos de la evaporación. b) Primera derivada como función del tiempo (Mercado & Hernandez, 2023).

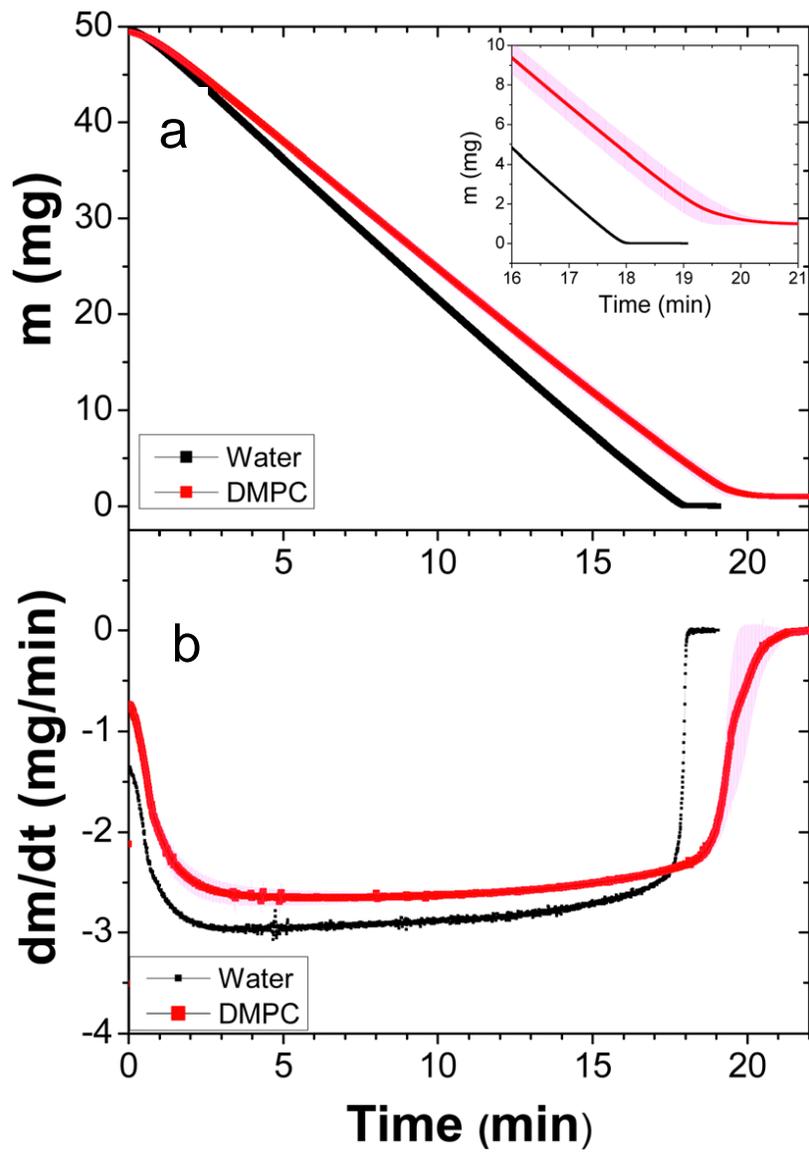


Figura 9. a) Proceso de evaporación de una suspensión al 2% de DMPC en comparación con agua Mili-Q a 37°C. b) Primera derivada como función del tiempo (Mercado & Hernandez, 2023).

3.2.3 Isotherma de liposoma DMPC-DPPC (50:50)

En la Figura 10 se muestra el caso de la mezcla DMPC-DPPC. Es evidente que el proceso de evaporación es completamente contrastante a los casos de los lípidos puros (Figuras 8 y 9). Este resultado muestra que la mayor parte de las moléculas liberadas pertenecen al agua en bulto. La primera derivada permite ver claramente que hay una evaporación muy restringida en la mezcla de liposomas, o sea, que gran parte de las moléculas de agua componen la capa de hidratación. De esto se abundará en el siguiente capítulo.

3.2.4 Isotherma de suspensión de *E. coli*

En la Figura 11 se muestra el proceso de evaporación de biomasa de *E. coli* a una concentración del 5%, medida a través de una isoterma (37 °C). Estos resultados muestran una notable similitud entre la dinámica de evaporación de esta muestra y la mezcla de liposomas, aun cuando el tiempo en que se evaporan sea diferente y la masa remanente también. Se discutirá este punto en el siguiente capítulo. Durante la medición se recolectan muchos datos, por esta razón, las barras de error se presentan en barras coloreadas alrededor del promedio (línea más acentuada).

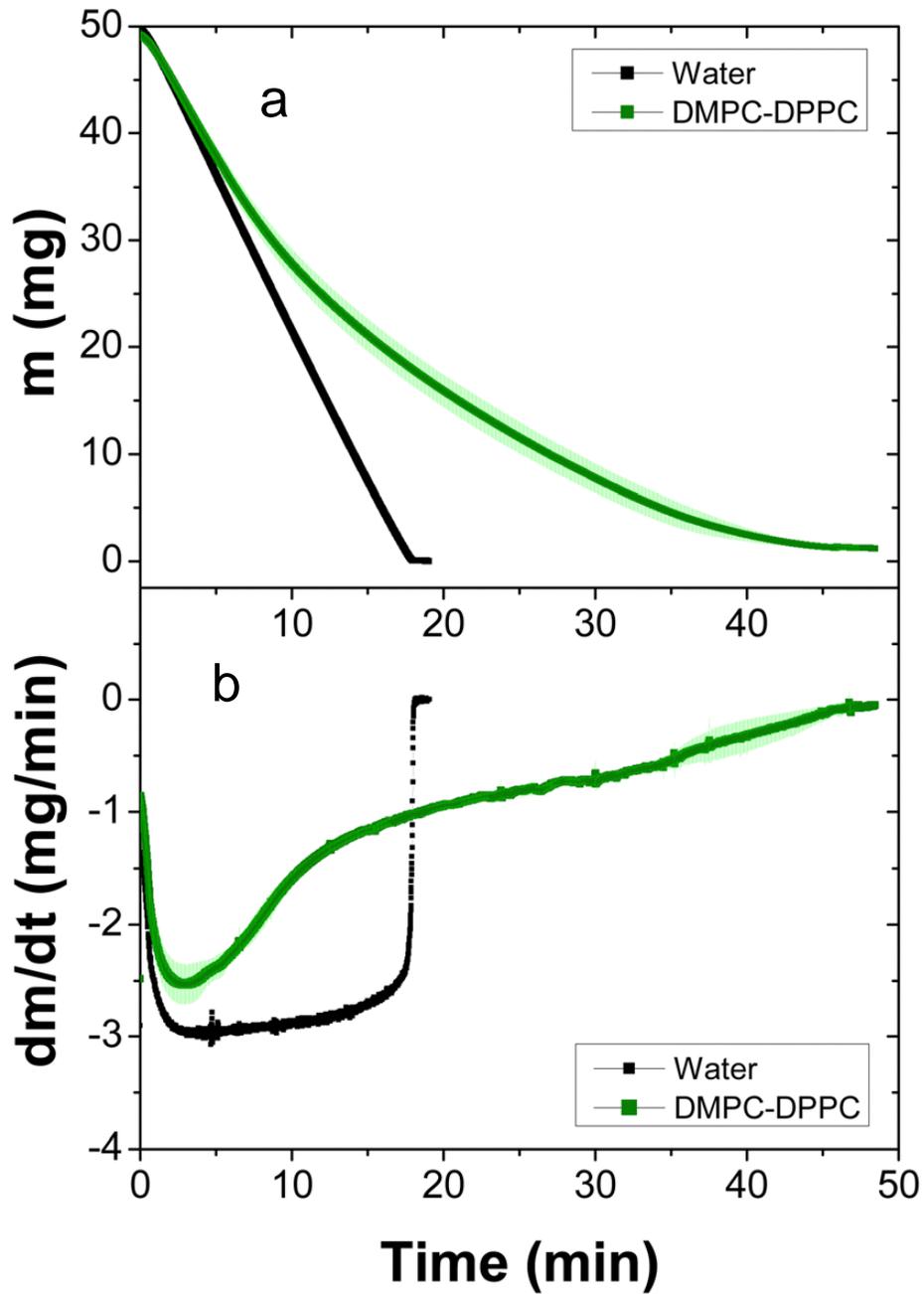


Figura 10. a) Proceso de evaporación de una suspensión de DMPC-DPPC (50:50) a 37°C comparando con una muestra control (agua). b) Primera derivada como función del tiempo (Mercado & Hernandez, 2023).

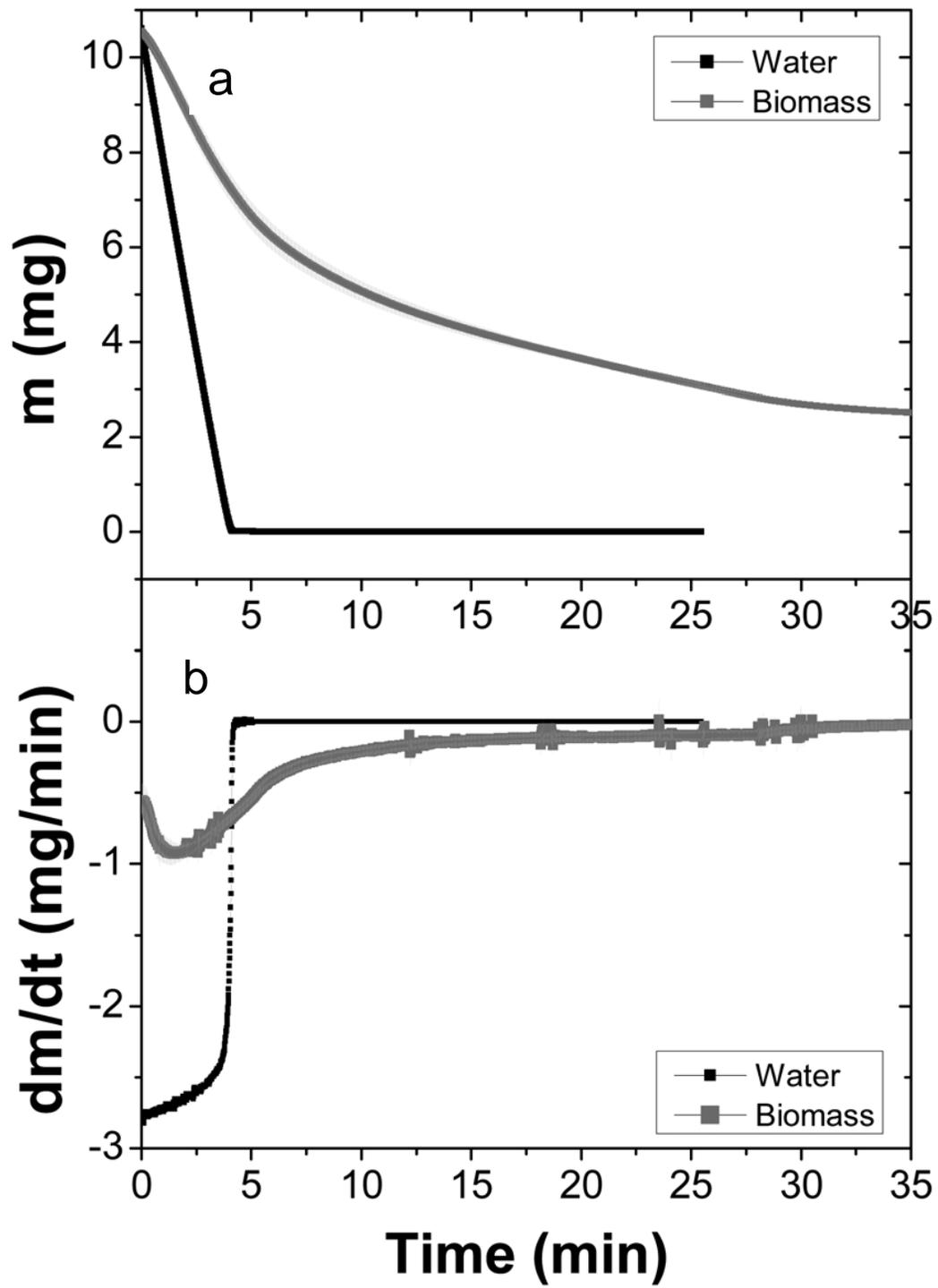


Figura 11 a) Dinámica de la evaporación de una suspensión de *E. coli* al 5%, medida a 37 °C. En color negro se muestra el caso del agua Mili-Q. b) Primera derivada como función del tiempo (Mercado & Hernandez, 2023).

A continuación, haremos un paréntesis para discutir un poco más estos resultados. En el capítulo I se explicaron los mecanismos físicos que se dan durante la evaporación, haciendo énfasis en que éste ocurre simultáneamente con el proceso de condensación. Formalmente, esto se condensa en la ec. (1), conocida como la ecuación de Hertz–Knudsen–Schrage (Marek & Straub, 2001). Como se pudo apreciar, por todas las variables involucradas, el fenómeno es complejo. Con el propósito de simplificarlo, los experimentos en este estudio se llevaron a cabo usando un flujo de gas, de esta manera, todas las moléculas de agua que se van liberando, son arrastradas por el flujo de gas que se inyecta sobre la muestra. Así, el coeficiente de condensación C_C de la ecuación es nulo, y $C_V=1$. Con ello, la ec. (1), se simplifica (Mercado & Hernandez, 2023).

$$\frac{dm_{net}}{dt} = - \left(\frac{M}{2\pi R} \right)^{1/2} \left(\frac{P_l}{T^{1/2}} \right) \quad (2)$$

o bien,

$$\frac{dm_{net}}{dt} = -AP_l \quad (3)$$

en donde,

$$A = \left(\frac{M}{2\pi RT_l} \right)^{1/2} \quad (4)$$

El signo negativo significa que en todo el proceso de evaporación hay una pérdida de masa. Si vemos el caso control (agua) en las Figuras 8-10, esta ecuación describe todo el proceso, excepto al final de este.

En la ec. (3) P_l es la presión que ejercen las moléculas de agua sobre la interface agua-aire. Hay que tomar en cuenta que hay moléculas de agua libre (o en bulto) y de agua ligada empujando, y P_l es constante para el primer caso, pero proporcional a la masa, en el caso del agua ligada, depende de la interacción electrostática de las cabezas polares de los lípidos. En otras palabras,

$$P_l = C m_{net} \quad (5)$$

Usando las ecs. (3) y (4), tenemos:

$$\frac{dm_{net}}{dt} = -A m_{net} \quad (6)$$

que al integrar nos da

$$m_{net} = m_{net_0} e^{-\mu(t-t_0)} \quad (7)$$

donde $\mu = AC$. Es decir, t_0 es el tiempo en el cual el agua libre (o en bulto) se evaporó completamente, y el agua ligada empieza a evaporarse siguiendo un decaimiento exponencial, siendo m_{net_0} la cantidad de agua ligada.

En la Figura 12 se hace uso de la ecuación anterior para ajustar la pérdida de peso en función del tiempo de la mezcla de liposomas (DMPC-DPPC) y la biomasa de *E. coli*. En la Figura 13 se presenta la derivada en función del tiempo para estos casos, mostrando en forma más clara la transición de la evaporación del agua libre al agua ligada. Nótese que μ es un parámetro sensible para poder describir los dos regímenes de evaporación. Éste es mayor a uno en el caso de los liposomas puros (1.41 para DPPC y 2.11 para DMPC), y para el liposoma híbrido y la biomasa de *E. coli* es menor a uno (0.05 y 0.07, respectivamente), por lo que la diferencia entre agua libre y ligada es evidente.

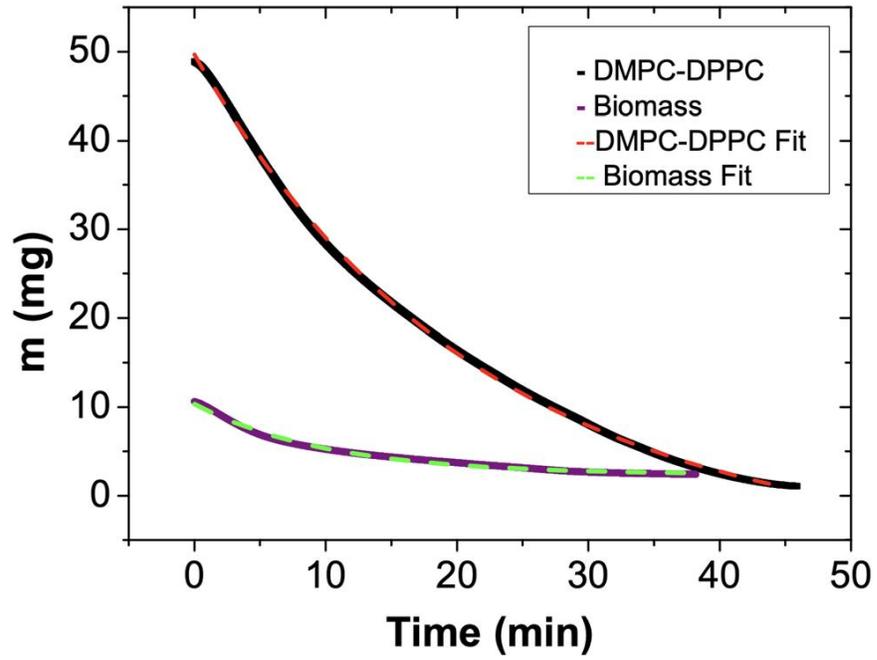


Figura 12. Pérdida de masa en función del tiempo (línea continua) y su ajuste (línea a trazos) en casos representativos de la suspensión DMPC-DPPC y la biomasa de *E. coli*. Las mediciones fueron realizadas en isotermas de 37 °C (Mercado & Hernandez, 2023).

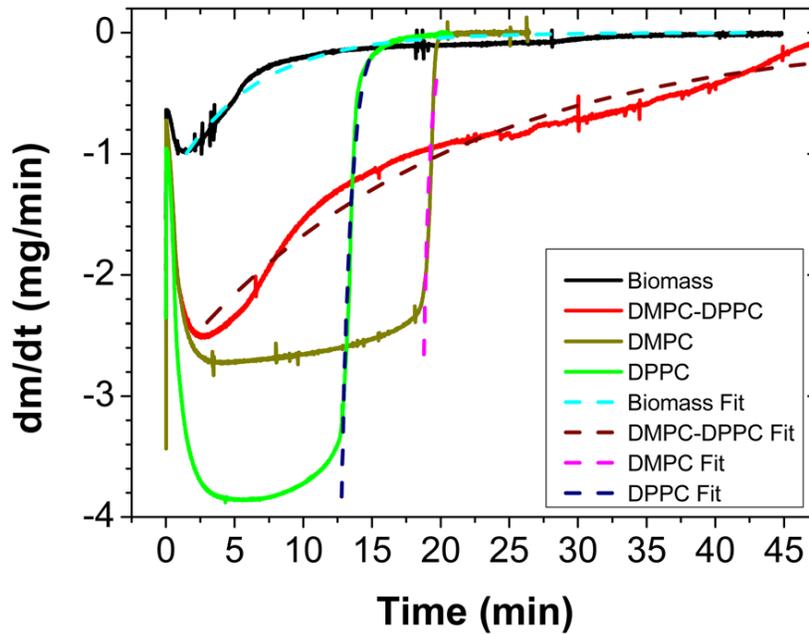


Figura 13. Derivada (línea continua) como función del tiempo y ajustes obtenidos usando la ec. (7) en casos representativos de liposomas de DMPC, DPPC, DMPC-DPPC y biomasa de *E. coli*. Las mediciones fueron realizadas en todos los casos con isotermas de 37 °C (Mercado & Hernandez, 2023). excepto para DPPC, a 47 °C (Mercado & Hernandez, 2023).

Capítulo IV

Discusión

La evaporación del agua es un tema relevante por varias razones: el efecto del cambio climático en la tierra, el control de la temperatura corporal de los seres vivos y una gran cantidad de procesos de enfriamiento industrial (Carrier et al., 2016). No por ello, muchas preguntas respecto al tema y al proceso de condensación del agua (que en general se da en forma simultánea a la evaporación) siguen sin resolverse, debido a los numerosos parámetros interdependientes y a la complejidad de los mecanismos físicos involucrados (Marek & Straub, 2001).

Se ha buscado comprender el proceso de evaporación del agua en diferentes sistemas (Carrier et al., 2016), incluyendo el caso muy interesante del agua confinada, que está involucrada en un sinnúmero de tratamientos como lo son, el flujo y la desalinización de aparatos, en generadores de voltaje, sensores de flujo, en nanofluidos; así como en procesos biológicos, por ejemplo, el flujo de iones dentro de la célula (Chakraborty et al., 2017).

Dada la complejidad de la célula, y el hecho de que la bicapa lipídica constituye el esqueleto de la célula, y la composición de los lípidos determina la fluidez de la membrana, el estudio de las biomembranas ha sido abordado utilizando diferentes modelos, siendo uno de éstos, los liposomas. Éstos se conforman de dos capas de lípidos, las cuales son moléculas anfifílicas, con una cabeza polar y una cola hidrofóbica con dos cadenas de ácidos grasos (Palaiokostas, et al 2018). Las propiedades de los lípidos dependen de la longitud de la cola, la cabeza, el tipo de grupo, su estructura química y su polaridad (Palaiokostas, et al 2018) (Kučerka, et al, 2019).

Las membranas lipídicas no se forman en ausencia de agua, pues su presencia garantiza su ensamblaje y estabilidad termodinámica (Disalvo, 2015). Curiosamente, las moléculas de agua exhiben propiedades termodinámicas distintivas, dependiendo de su ubicación en la membrana.

Por ejemplo, cada fosfolípido se mantiene estrechamente unido a moléculas de agua, y son necesarios 40 kJ/mol (entalpía de vaporización a 25 °C) para romper los enlaces de hidrógeno y eliminar las moléculas. Por tanto, la dinámica de la evaporación de las moléculas de agua proporciona información sobre su ubicación en la membrana. En particular, las moléculas fuertemente delimitadas dentro de la región de interfaz forman agua de hidratación (también llamada agua interfacial). Esta región está delimitada por dos planos ideales: el que incluye los grupos carbonilo y el que está bordeado por los grupos fosfato. Está compuesta por 6-7 moléculas por lípido, y aporta alrededor del 40% del total espesor bicapa.

Las moléculas de hidratación se colocan entre las cabezas de los lípidos que tienen grados de libertad restringidas la mayor parte del tiempo y con propiedades termodinámicas contrastantes respecto a las moléculas en bulto (Disalvo, 2008) (Ball, 2008) (Aksan, et al, 2009). El último, es un tipo de agua que básicamente no se ve afectada por las superficies de las biomoléculas, normalmente llamada agua “libre”.

Son estas las razones por las que se decidió estudiar el proceso de evaporación en liposomas y *E. coli*. El primer punto para evaluar fue ver que tanto influía el proceso de condensación en la evaporación de un cuerpo de agua, según lo planteado en la ecuación de Hertz Knudsen-Schrage (Marek & Straub, 2001). El uso de un flujo de helio simplifica el proceso de evaporación (como se observa en la ec. (2) y en la Figura 7). En ausencia del gas acarreador de moléculas de agua, la velocidad de evaporación disminuye significativamente,

Para entender el proceso de evaporación en membranas biológicas, en este trabajo se usó un modelo de membrana común que se ha mencionado anteriormente, el liposoma. Se analizaron liposomas de DMPC, DPPC y una mezcla de DMPC:DPPC. Los resultados para este último fueron muy relevantes (ver Figura 10). El tamaño de la cola de los lípidos afecta el grosor de región hidrofóbica, y la manera en que el grupo colina queda hidratado. Se ha reportado de estudios de dinámica molecular que para DPPC hay aproximadamente 10.2 moléculas de agua fuertemente ligadas, mientras que para DMPC son alrededor de 7.

Lo anterior indica que, en el caso híbrido, el tamaño de las colas que componen el liposoma da lugar a protuberancias ocasionadas por los grupos polares de los lípidos de DPPC, como las que se esquematizan en la caricatura de la Figura 14. Esto da lugar a que en el proceso de evaporación sean pocas las moléculas de agua que se liberan, que corresponden al agua libre. Posteriormente, el proceso es cada vez más lento, que corresponde a la remoción de moléculas de agua ligadas. Posteriormente, se procedió a analizar la evaporación de *E. coli*, cuya membrana es más compleja que los casos anteriores. Su composición se basa en diferentes lípidos: fosfatidiletanolamine (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CA) y otros, donde el primero es un lípido zwitteriónico y los dos últimos están cargados negativamente. Esto implica que las interacciones electrostáticas son muy diferentes al caso de los liposomas. En éstos los lípidos poseen varios dipolos, uno localizado al inicio de las colas (en los grupos carbonilos) y en las cabezas polares, donde es más intenso, y va orientado del grupo fosfato al grupo colina. El grupo fosfato es muy pequeño y con una densidad superficial de carga intensa que atrae fuertemente a las moléculas de agua circundantes (K, GAwrich, et al, 1992) (Saak, et al, 2023) (la capa de hidratación).

En el caso de la membrana de *E. coli*, la interacción de las moléculas de agua no es una interacción dipolar con la cabeza del lípido, como se dijo arriba, existen lípidos cargados que hacen que las interacciones electrostáticas se intensifiquen. Además, la *E. coli* posee más de 1600 proteínas en su membrana (Sukei et al, 2020) cuyos aminoácidos componentes están cargados, lo que hace que sus cadenas laterales interaccionen con las moléculas de agua fuertemente, El resultado es que el proceso de liberación de agua libre es más corto y la masa residual más grande que en el caso del liposoma híbrido (Mercado & Hernandez, 2023).

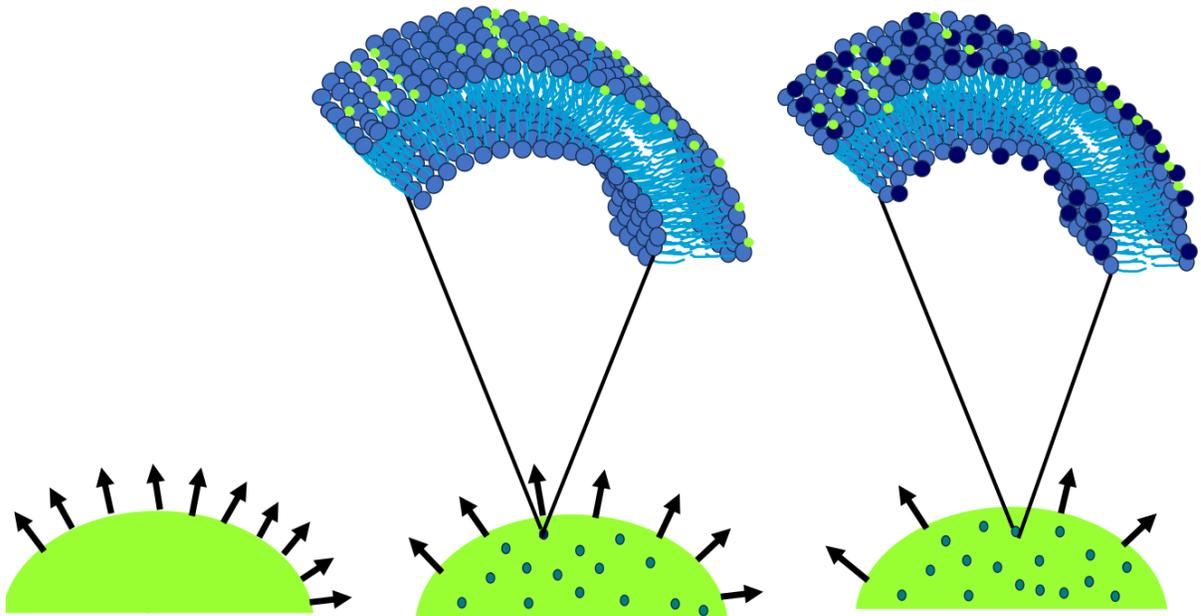


Figura 14 Esquema pictográfico, de izquierda a derecha, agua y dos diferentes tipos de liposomas: uno formado puramente del lípido DMPC y el otro, una mezcla de los lípidos (DMPC-DPPC) 50:50; después de la fase de transición (líquida o desordenada). Los grupos de las cabezas de los lípidos DMPC y DPPC están representados en cian y azul respectivamente, las moléculas de agua en verde. Las flechas negras representan el coeficiente de evaporación. Como el tamaño de la cola de los lípidos no es el mismo en la mezcla, el área de hidratación alrededor de las cabezas polares es mayor para los lípidos DPPC que para los DMPC (Mercado & Hernández, 2023)

Por otro lado, en el caso del agua libre, se ha visto como la presencia de otros agentes, cambia la tasa de evaporación del agua (Potts, 1994), por lo que se esperaba un cambio al agregar *E. coli* en cierta concentración al agua pura, más aún al ser la

membrana de *E. coli* hidrofílica (Binahmed et al., 2018), se esperaba que la tasa de evaporación del agua disminuyera, tal y como lo hizo en los experimentos realizados.

En este trabajo logramos mostrar dos fases de evaporación en las muestras estudiadas: la primera es atribuida al agua libre o en bulto (línea recta), y la segunda al agua ligada o de hidratación (sección curva al final de la evaporación). La contribución de cada una depende de la muestra estudiada.

Como se pudo observar, el agua confinada dentro de *E. coli* se pierde de una forma más lenta respecto a los casos de los liposomas, debido a que es un sistema más complejo, en donde las interacciones electrostáticas y los componentes de la membrana son determinantes.

Algo interesante para el caso de liposomas es que, independientemente de la fase en la que se encontraran, sea gel, líquida o en la fase de transición; había un cambio en la tasa de evaporación del agua libre.

En resumen, para los liposomas híbridos, la tasa de evaporación del agua cambia drásticamente, esto se da por varias razones, la primera es el hecho de que los lípidos que los conforman tienen diferentes temperaturas de transición, lo cual les da mayor estabilidad (Akbarzadeh et al., 2013). También, al estar conformados por lípidos de diferentes tamaños, su superficie no es plana, sino rugosa, y las interacciones superficiales con el agua circundante cambian respecto al caso de liposomas puros (Singh et al., 2006).

Capítulo V

Conclusiones

Estudiar el proceso de deshidratación en las células permite tener una mejor comprensión del funcionamiento de este sistema biológico en la situación de equilibrio. Generalmente, este tipo de estudios se realiza en condiciones de estrés osmótico. En este trabajo, el problema se simplificó creando un ambiente de condensación restringida (eliminando el coeficiente de condensación de la ecuación de Hertz-Knudsen-Schrage), lo cual se realizó usando un flujo de gas durante la medición de la evaporación, con una balanza termogravimétrica. En el estudio se usó un modelo de membrana lipídica (DMPC, DPPC y DMPC:DPPC (50:50), así como una biomasa de *E. coli*. Se encontró que la dinámica de evaporación depende de la ubicación de las moléculas de agua en la membrana. Este comportamiento es regido por las interacciones electrostáticas entre las moléculas de agua y la cabeza polar de los lípidos, y esto se observa claramente por la deshidratación de los liposomas DMPC:DPPC.

Perspectivas

- Investigar la dinámica de evaporación de las mismas muestras a través de rampas de temperatura, con el propósito de tener más información sobre el proceso.
- Explorar un modelo para calcular las energías de activación implicadas en la dinámica de evaporación medida con TGA.
- Realizar experimentos de termogravimetría con un lípido de mayor longitud (por ejemplo, DSCP, de 18C) para analizar los cambios en el proceso de evaporación.

Bibliografía

- AD, R. (2003). Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science Progress*, 86, 115–137.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., & Zarghami, N. (2013). Liposome: classification, preparation aspects of liposomes, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(102), 1–9. <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- Al-Shammiri, M. (2002). Evaporation rate as a function of water salinity. *Desalination*, 150(2), 189–203. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00943-8](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00943-8)
- Amro, N. A., Kotra, L. P., Wadu-mesthrige, K., Bulychev, A., Mobashery, S., & Liu, G. (2000). High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the Escherichia coli Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. 15, 2789–2796. <https://doi.org/10.1021/la991013x>
- Anderson, M., & Omri, A. (2004). The Effect of Different Lipid Components on the in Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1080/10717540490265243>
- Ball, P. (2002). Life's Matrix. 1–19. http://www.philipball.co.uk/images/stories/docs/pdf/water_lifes_matrix.pdf http://www.philipball.co.uk/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=13&Itemid=16
- Bellissent-Funel, M. C. (2001). Structure of confined water. *Journal of Physics Condensed Matter*, 13(41), 9165–9177. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/13/41/308>
- Beney, L., Mille, Y., & Gervais, P. (2004). Death of Escherichia coli during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 457–464. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1574-x>
- Benintende, S., & Sanchez, C. (2011). Crecimiento bacteriano. *Universidad Nacional*

De Entre Ríos, C, 6.

- Binahmed, S., Hasane, A., Wang, Z., Mansurov, A., & Romero-Vargas Castrillón, S. (2018). Bacterial Adhesion to Ultrafiltration Membranes: Role of Hydrophilicity, Natural Organic Matter, and Cell-Surface Macromolecules. *Environmental Science and Technology*, 52(1), 162–172. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03682>
- Bottom, R. (2008). Thermogravimetric Analysis. *Principles and Applications of Thermal Analysis*, 1(906), 87–118. <https://doi.org/10.1002/9780470697702.ch3>
- Carrier, O., Shahidzadeh-Bonn, N., Zargar, R., Aytouna, M., Habibi, M., Eggers, J., & Bonn, D. (2016). Evaporation of water: Evaporation rate and collective effects. *Journal of Fluid Mechanics*, 798, 774–786. <https://doi.org/10.1017/jfm.2016.356>
- Chakraborty, S., Kumar, H., Dasgupta, C., & Maiti, P. K. (2017). Confined Water: Structure, Dynamics, and Thermodynamics. *Accounts of Chemical Research*, 50(9), 2139–2146. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00617>
- Chaplin, M. F. (2001). Water: Its importance to life. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29(2), 54–59. [https://doi.org/10.1016/S1470-8175\(01\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S1470-8175(01)00017-0)
- Chen, C., Zhu, S., Huang, T., Wang, S., & Yan, X. (2013). Analytical techniques for single-liposome characterization. *Analytical Methods*, 5(9), 2150–2157. <https://doi.org/10.1039/c3ay40219c>
- C.-M. Saak, L. Dreier, K. Machel, M. Bonn and E. H. Backus, Faraday Discuss., 2023
- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., & Akbarzadeh, A. (2016). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(1), 381–391. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633>
- Disalvo, E. A., Lairion, F., Martini, F., Tymczynszyn, E., Frías, M., Almaleck, H., & Gordillo, G. J. (2008). Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(12), 2655–2670. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.025>
- Hernández-Galván, G., and H. Mercado-Uribe. "Dehydration of biological membranes in a non-condensing environment." *Soft Matter* 19.47 (2023): 9173-9178.

- Huang, Z., Li, X., Zhang, T., Song, Y., She, Z., Li, J., & Deng, Y. (2014). Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.001>
- Ingvarsson, P. T., Yang, M., Nielsen, H. Mø., Rantanen, J., & Foged, C. (2011). Stabilization of liposomes during drying. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(3), 375–388. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.553219>
- Jarrell, H. C., Zukotynski, K. A., & Sprott, G. D. (1998). Lateral diffusion of the total polar lipids from *Thermoplasma acidophilum* in multilamellar liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1369(2), 259–266. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00228-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00228-9)
- Jodhpur, Shivalik Jodhpur, R. (2012). Review Article LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*.
- Khanniri, E., Bagheripoor-Fallah, N., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., Khosravi Darani, K., & Mohammad, R. (2016). Application of Liposomes in Some Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 484–493. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.779571>
- K. Gawrisch, D. Ruston, J. Zimmerberg, V. Parsegian, R. Rand and N. Fuller, *Biophys. J.*, 1992, 61, 1213–1223
- Lievense, L. C., & van't Riet, K. (1994). *Convective drying of bacteria*. 51, 71–89. <https://doi.org/10.1007/bfb0008734>
- Maja, L., Željko, K., & Mateja, P. (2020). Sustainable technologies for liposome preparation. *Journal of Supercritical Fluids*, 165. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>
- Malani, A., Ayappa, K. G., & Murad, S. (2009). Influence of hydrophilic surface specificity on the structural properties of confined water. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(42), 13825–13839. <https://doi.org/10.1021/jp902562v>
- Marek, R., & Straub, J. (2001). Analysis of the evaporation coefficient and the

- condensation coefficient of water. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 44(1), 39–53. [https://doi.org/10.1016/S0017-9310\(00\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0017-9310(00)00086-7)
- Matthews, B. J., & Vosshall, L. B. (2020). How to turn an organism into a model organism in 10 “easy” steps. *Journal of Experimental Biology*, 223. <https://doi.org/10.1242/jeb.218198>
- Mentré, P. (2012). Water in the orchestration of the cell machinery. Some misunderstandings: A short review. *Journal of Biological Physics*, 38(1), 13–26. <https://doi.org/10.1007/s10867-011-9225-9>
- N. Kučerka, J. Gallova and D. Uhríkova, Chemistry and physics of lipids, 2019, 221, 140-144.
- Oropeza-Guzman, E., & Ruiz-Suárez, J. C. (2018). Dehydration/Rehydration Cycles for Mixing Phospholipids without the Use of Organic Solvents. *Langmuir*, 34(23), 6869–6873. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00799>
- Potts, M. (1994a). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*, 58(4), 755–805.
- Potts, M. (1994b). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*, 58(4), 755–805. <https://doi.org/10.1128/membr.58.4.755-805.1994>
- Scherber, C. M., Schottel, J. L., & Aksan, A. (2009). Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(11), 2427–2435. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.011>
- Schnaitman, Carl, A. (1970). Protein Composition of the Cell Wall and Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 104(2), 890–901.
- Singh, S., Houston, J., Van Swol, F., & Brinker, C. J. (2006). Superhydrophobicity: Drying transition of confined water. *Nature*, 442(7102), 526. <https://doi.org/10.1038/442526a>
- Sommer, A. P., & Dan, Z. (2007). Comment on evaporation-induced patterns from droplets containing motile and nonmotile bacteria. *Langmuir*, 23(23), 11941. <https://doi.org/10.1021/la7021159>

- Stark, J. M., & Firestone, M. K. (1995). Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 218–221. <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.218-221.1995>
- A. Sueki, F. Stein, M. M. Savitski, J. Selkrig and A. Typas, *Msystems*, 2020, 5, e00808–e00819
- Taj, M. K., Samreen, Z., Ling, J. X., Taj, I., Hassan, T. M., & Yunlin, W. (2014). *Escherichia coli* as a model organism. *International Journal of Engineering Research and Science and Technology*, 3(2), 1-8.
- Webb, B. S. J. (2017). Dehydration Damage by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbio*, 58(1969), 317–326.
- Wu, W. G., & Huang, C. H. (1981). Effect of water mobility on lateral diffusion of phospholipids in liposomes. *Lipids*, 16(11), 820–822. <https://doi.org/10.1007/BF02535036>