



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS EN FÍSICA Y  
MATEMÁTICAS

CAMPUS I

**PATRONES DE PROTEINAS EN  
GOTAS SECAS: UN ESTUDIO SOBRE  
SU COMPLEJIDAD**

TESIS

Que para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias Físicas**

PRESENTA:

**Montserrat Ancheyta Palacios X180067**

Director de Tesis:

Dr. Jorge González Gutiérrez

Co-Directora de Tesis:

Dra. Yojana Jautzi P. Carreón Herrera



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; Abril de 2025.

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
26 de Marzo de 2025  
Oficio No. FCFM/0190/25

**Dr. Jorge González Gutiérrez**  
Director de tesis.  
Profesor de tiempo completo  
Facultad de Ciencias en Física y Matemáticas Unach.  
**p r e s e n t e**

**Estimado Dr. Jorge**

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

***"Patrones de proteínas en gotas secas: un estudio sobre su complejidad"***

Ha sido aceptada para sustentar el examen de grado de la Maestría en Ciencias Físicas de la Lic.  
**Monserrat Ancheyta Palacios** con matrícula escolar X180067

Por lo tanto, se Autoriza la Impresión de la tesis, en virtud de haber cumplido con los requisitos correspondientes.

Sin más por el momento quedo de Usted, enviándole un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"Por la conciencia de la necesidad de servir"**



**Dr. Orlando Díaz Hernández**  
Director

C. c. p. Dra. María del Rosario Soler Zapata, Secretaria Académica de la FCFM  
Mtro. René Solís López.-, Encargado del Control Escolar Posgrado de la FCFM  
Archivo.

Oficio FCFM/CIP/004/2025

**A quién corresponda**

El que suscribe, Comité de Investigación y Posgrado de la Facultad de Ciencias en Física y Matemáticas de la universidad autónoma de Chiapas, hace constar que mediante minuta FCFM/MCF/002/2024 de los integrantes del NA de la Maestría en Ciencias Físicas, que la **Dra. Yojana Jautzi P. Carreón Herrera**, investigadora posdoctoral CONAHCYT en la FCFM UNACH, miembro del SNII nivel 1 fue autorizada para ser Co-directora de la estudiante **Lic. Monserrat Ancheyta Palacios**.

Sin más por el momento, reciba un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

“Por la conciencia de la necesidad de servir”

Grado académico y nombre completo	Cargo en el CIP	Firma
Dr. Orlando Díaz Hernández	Presidente	
Dr. Ariel Flores Rosas	Secretario	
Dr. Roberto Arceo Reyes	Representante de los Cuerpos Académicos	
Dr. Víctor Iván Ruiz Pérez	Vocal titular del Consejo Consultivo de Investigación y Posgrado	
Dr. Armando Mendoza Pérez	Representante de los Núcleos Académicos de los Programas de Posgrado	
Dr. Javier Sánchez Martínez	Representante de las profesoras y los profesores con reconocimiento vigente en el ámbito de la investigación científica, tecnológica, humanística y de innovación.	
Lic. Jesús Erick Pérez Pérez	Representación estudiantil de la Maestría en Ciencias Físicas	



Código: FO-113-05-05

Revisión: 0

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

La alumna (s) o él alumno (s) Montserrat Ancheyta Palacios, autora (s) o autor (es) de la tesis bajo el título de Patrones de proteínas en gotas secas: un estudio sobre su complejidad presentada y aprobada en el año 2025 como requisito para obtener el título o grado de Maestra en Ciencias Físicas, autorizo licencia a la Dirección del Sistema de Bibliotecas Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), para que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para su consulta, reproducción parcial y/o total, citando la fuente, que contribuya a la divulgación del conocimiento humanístico, científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

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

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 01 días del mes de abril del año 2025.

Nombre y firma de la alumna (s) o él alumno (s)

# Agradecimientos

*Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Jorge González Gutiérrez y la Dra. Yojana Jautzi P. Carreón Herrera. Este proyecto no habría sido posible sin su valiosa orientación y apoyo.*

*Extiendo mi reconocimiento a los sinodales por dedicar su valioso tiempo a la revisión de esta tesis y por sus observaciones, las cuales han fortalecido significativamente este trabajo.*

*Agradezco a la Universidad Autónoma de Chiapas y a la Facultad de Ciencias en Física y Matemáticas por brindarme la oportunidad de avanzar en mi carrera profesional y permitirme desarrollarme en un entorno académico de excelencia.*

*A los integrantes del Grupo Colegiado de Sistemas Dinámicos y Complejidad por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.*

*Asimismo, agradezco al Dr. Víctor M. Luna Pineda por otorgar los fondos para esta investigación, financiada a través de recursos federales del HIMFG (subvención HIM-2022-062, V.L.) y de Ciencia de Frontera-Conahcyt, México (subvención CF-2023-G-93, V.L.).*

*Finalmente, mi gratitud se extiende al SECIHTI por el apoyo financiero otorgado durante mis estudios de posgrado.*

# Dedicatoria

*Dedico esta tesis con amor y gratitud a mi madre, Verónica Palacios Pérez; a mi abuela, Reyna Pérez Archila; y a mi mejor amigo y compañero en estos últimos años, Mauricio J. D. Estrada Su apoyo incondicional y amor han sido mi mayor fortaleza a lo largo de cada día de mi vida.*

*Con todo mi corazón, les agradezco por su amor y por estar siempre a mi lado. Este logro es también de ustedes.*

**Monserrat Ancheyta  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Abril 2025.**

# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vi</b>
<b>Introducción General</b>	<b>vii</b>
<b>Planteamiento del Problema</b>	<b>ix</b>
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>x</b>
<b>1 Metodología General</b>	<b>1</b>
1.1 Preparación y almacenamiento de soluciones proteicas . . . . .	1
1.2 Arreglo experimental . . . . .	1
1.3 Protocolo de limpieza . . . . .	2
1.4 Adquisición de imágenes . . . . .	2
<b>2 Cristalización impulsada por gravedad en gotas de proteínas y NaCl</b>	<b>1</b>
2.1 Resumen . . . . .	1
2.2 Introducción . . . . .	2
2.3 Metodología específica . . . . .	4
2.3.1 Arreglo Experimental . . . . .	4
2.3.2 Desnaturalización térmica . . . . .	4
2.3.3 Evaporación de gotas . . . . .	4
2.4 Resultados . . . . .	6
2.5 Discusión . . . . .	22
2.6 Conclusiones . . . . .	24
<b>3 Patrones de Gotas Secas como Indicadores de Estados Conformacionales de Proteínas de BSA</b>	<b>25</b>
3.1 Resumen . . . . .	25
3.2 Introducción . . . . .	26
3.3 Metodología específica . . . . .	29
3.3.1 Tratamiento térmico . . . . .	29
3.3.2 Evaporación de gotas . . . . .	29
3.3.3 Análisis de imágenes . . . . .	29
3.3.4 Análisis de cambios conformacionales mediante espectroscopia UV-Vis	33

3.4	Resultados . . . . .	34
3.5	Discusión . . . . .	52
3.6	Conclusiones . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Conclusiones Generales</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Apéndice</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Productos científicos</b>	<b>61</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>67</b>

# Resumen

La formación de patrones en depósitos de gotas secas de proteínas no solo refleja los procesos subyacentes de transporte y autoensamblaje molecular, sino que también abre nuevas perspectivas para aplicaciones en microfabricación, diseño de materiales funcionales y biotecnología. Este trabajo explora dos enfoques experimentales que manipulan la cristalización en gotas: la orientación vertical y los tratamientos térmicos intermitentes, utilizando soluciones de albúmina sérica bovina (BSA) y cloruro de sodio (NaCl). Se observó que la orientación vertical genera un notable gradiente en la distribución de solutos y la cristalización a lo largo del depósito. En la región superior, la elevada tasa de evaporación genera una sobresaturación local que favorece una nucleación anisotrópica y un rápido crecimiento de estructuras dendríticas. Por el contrario, en la parte inferior, la evaporación más lenta permite una acumulación progresiva de solutos, dando lugar a un crecimiento cristalino más uniforme y compacto.

En el estudio de tratamientos térmicos, se analizaron soluciones proteicas con concentraciones de NaCl (1 wt % y 0.1 wt %) sometidas a diferentes ciclos térmicos intermitentes. Los depósitos de proteína en estado nativo formaron patrones típicos de “anillo de café”, mientras que los tratamientos térmicos modificaron la conformación de la BSA, generando patrones únicos como el “ojo”. El uso de las curvas ROC y el área bajo la curva (AUC) confirmó la capacidad de distinguir eficazmente entre diferentes estados conformacionales de proteína basado en el análisis de Entropía configuracional. Este trabajo demuestra cómo el control de parámetros como la orientación y los tratamientos térmicos intermitentes puede revelar patrones cristalinos distintivos, estableciendo nuevas bases para la manipulación precisa de estructuras en sistemas coloidales y biomoleculares.

# Abstract

The formation of patterns in dry deposits of protein droplets not only reflects the underlying processes of molecular transport and self-assembly but also opens new perspectives for applications in microfabrication, functional material design, and biotechnology. This work explores two experimental approaches to manipulate crystallization in droplets: vertical orientation and intermittent thermal treatments, using solutions of bovine serum albumin (BSA) and sodium chloride (NaCl). It was observed that vertical orientation generates a notable gradient in solute distribution and crystallization throughout the deposit. In the upper region, the high evaporation rate produces local supersaturation, favoring anisotropic nucleation and rapid growth of dendritic structures. In contrast, in the lower region, slower evaporation allows for progressive solute accumulation, resulting in more uniform and compact crystalline growth.

In the study of thermal treatments, protein solutions with NaCl concentrations (1 wt % and 0.1 wt %) were subjected to different intermittent thermal cycles. Protein deposits in their native state formed typical “coffee ring” patterns, while thermal treatments altered the conformation of BSA, generating unique patterns such as the “eye”. The use of ROC curves and the area under the curve (AUC) confirmed the ability to effectively distinguish between different protein conformational states based on configurational Entropy analysis. This work demonstrates how controlling parameters such as orientation and intermittent thermal treatments can reveal distinctive crystalline patterns, establishing new foundations for the precise manipulation of structures in colloidal and biomolecular systems.

# Introducción General

La detección de proteínas y los cambios conformacionales en ellas son áreas de gran relevancia tanto en la biología como en la medicina [1]. El estado conformacional de las proteínas es clave en procesos biológicos que incluyen desde la regulación de reacciones hasta la señalización celular [2, 3]. Las alteraciones en su estructura pueden generar disfunciones que desencadenan la aparición de enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson [4, 5, 6]. La caracterización precisa de estas macromoléculas permite no solo el monitoreo de su estabilidad estructural, sino también la identificación de posibles malformaciones asociadas a condiciones patológicas [7, 8, 4]. En este contexto, la investigación sobre la formación de patrones en soluciones de proteínas durante el secado de gotas se ha consolidado como una metodología prometedora para la detección y caracterización de proteínas [9, 10, 11]. Este enfoque ofrece nuevas perspectivas para el estudio de la estabilidad y funcionalidad proteica en sistemas complejos.

Las gotas secas, al evaporarse, dejan patrones que revelan información sobre la distribución de solutos y las interacciones moleculares presentes [12, 13, 14]. Estos patrones se ven influenciados por las corrientes capilares y de Marangoni dentro de las gotas [15, 16, 17]. Los cambios conformacionales de las proteínas, inducidos por factores como la concentración de soluto y las condiciones ambientales, pueden servir como indicadores de procesos de desnaturalización, agregación o estabilización de proteínas [18, 19, 20]. La agregación de proteínas en soluciones con sales como el cloruro de sodio (NaCl) modifica tanto la dinámica de evaporación de gotas como la cinética de agregación proteica, promoviendo la nucleación y el crecimiento cristalino que facilitan la identificación de biomarcadores [21, 22, 23].

Se han explorado diversas estrategias de secado para mejorar la detección de biomarcadores en depósitos de gotas secas [24, 25, 26, 27]. La inclinación del sustrato durante el secado de gotas ha emergido como un factor crucial para promover la agregación de moléculas de relevancia [28, 29, 30, 31]. En superficies verticales, el efecto de la gravedad altera la distribución de solutos, promoviendo la formación de estructuras cristalinas más complejas y mejor definidas en la base de las gotas secas [30, 28, 32]. Esta orientación no solo afecta las dinámicas de evaporación, sino también la nucleación y crecimiento de cristales, optimizando la detección y caracterización de proteínas en entornos de diagnósticos y de biofabricación [33, 34].

Los tratamientos térmicos ofrecen una herramienta poderosa para investigar los cambios moleculares y conformacionales en las proteínas [35, 36, 37, 38]. Durante el tratamiento térmico, las proteínas pueden sufrir desnaturalización y renaturalización, lo que les permite reconfigurarse en estados conformacionales más estables [39, 40]. El tratamiento térmico

puede llevar a la formación de agregados amiloides o estados fibrilares que son clave para la investigación biomédica y el desarrollo de nuevos biomateriales [41, 6, 42, 43, 44]. Estos tratamientos facilitan la observación de fenómenos como transiciones de fase, los cuales son indicadores de alteraciones en las estructuras proteicas [45, 46]. Por lo tanto, el tratamiento térmico en proteínas surge como un excelente punto de partida para explorar la detección de cambios conformacionales sutiles en proteínas modelo.

A pesar de los importantes avances en la comprensión de la formación de patrones en gotas secas de soluciones proteicas, aún queda por explorar de manera más profunda cómo factores externos, como la gravedad y los tratamientos térmicos, influyen en la configuración final de estos patrones. Una mayor investigación que combine la orientación vertical de las gotas y la manipulación térmica podría proporcionar avances significativos en la optimización de procesos en la detección de cambios conformacionales de proteínas. Además, abre nuevas oportunidades en el diseño de materiales biomédicos al mejorar la estabilidad, flexibilidad y funcionalidad de los agregados proteicos en depósitos.

En este trabajo, exploramos la formación de patrones en depósitos de gotas secas de soluciones de albúmina sérica bovina (BSA) y NaCl bajo dos enfoques: orientación vertical y tratamientos térmicos intermitentes. La orientación vertical generó gradientes de solutos que produjeron patrones distintivos en las regiones superior e inferior del depósito. Por otro lado, los tratamientos térmicos modificaron la conformación de la BSA, transformando patrones típicos en estructuras únicas como “ojo”. Utilizando curvas ROC, demostramos que es posible diferenciar eficazmente entre estados conformacionales de la proteína, destacando la relevancia de estos patrones para aplicaciones en biotecnología y ciencia de materiales.

El contenido de esta tesis está organizado de la siguiente manera: el capítulo 1 describe los materiales y métodos generales utilizados en esta investigación. En el capítulo 2 se examina la cristalización impulsada por gravedad en gotas de proteínas y NaCl, mientras que el capítulo 3 explora los patrones de gotas secas como indicadores de estados conformacionales de proteínas de BSA. Los capítulos 2 y 3 se enfocan en el estudio experimental y análisis de patrones en gotas secas, incluyendo en cada uno su resumen, introducción, metodología específica, resultados, discusión y conclusiones. Esta estructura, junto con la metodología general, facilita al lector comprender el contenido de cada capítulo de manera completa, sin requerir la consulta de otras secciones del documento. El capítulo 4 presenta las conclusiones generales del proyecto. El apéndice con información complementaria se encuentra en el capítulo 5, y finalmente, el capítulo 6 muestra los productos científicos generados durante este proyecto.

# Planteamiento del Problema

Aunque en la literatura se ha reportado sobre la capacidad del análisis de gotas secas para la detección de cambios conformacionales en macromoléculas, la capacidad de identificar múltiples estados conformacionales de una misma proteína permanece inexplorada. Aumentar la eficiencia en la detección de dichos cambios podría revelar nuevas perspectivas en la caracterización de estructuras moleculares.

# Hipótesis y Objetivos

## Hipótesis

El análisis de gotas secas de proteínas tiene la capacidad de revelar cambios conformacionales producidos por tratamientos térmicos.

## Objetivos

**Objetivo General.** Estudiar la formación de patrones en gotas secas de proteínas con diferentes procesos de recocido.

### **Objetivos Específicos.**

1. Encontrar las condiciones experimentales óptimas de concentración, humedad relativa y temperatura para alcanzar una alta reproducibilidad en los patrones de gotas secas de proteínas en configuración sésil y vertical.
2. Estudiar el efecto de las superficies verticales sobre la formación de patrones de proteínas sometidas a procesos de recocido.
3. Encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo procesos de recocido sobre proteínas.
4. Estudiar el efecto de diferentes procesos de recocido sobre la formación de patrones en gotas secas de proteínas.
5. Estudiar los mecanismos de transporte de masa durante el secado de gotas de proteínas en estado nativo y desnaturalizado.
6. Caracterizar los diferentes patrones de gotas secas de proteínas a través de análisis de textura.

# Capítulo 1

## Metodología General

En este capítulo, se describe la metodología general aplicada a los capítulos 2 y 3 de esta tesis. Posteriormente, cada capítulo desarrollará su metodología específica, diseñada para abordar los problemas particulares de interés en cada caso.

### 1.1. Preparación y almacenamiento de soluciones proteicas

Se emplearon polvos de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, A2153) y cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker 3624-01) de alta pureza para la preparación de las soluciones madres. Los polvos fueron disueltos en agua desionizada (Mili-Q, R=18.2 M $\Omega$ cm), obteniendo concentraciones del 2 wt % bajo condiciones controladas de 25°C. Posteriormente, las soluciones madre de BSA y NaCl fueron diluidas hasta alcanzar las concentraciones finales:  $\phi_p = 1$  wt % para BSA, y  $\phi = 1$  wt % (alta concentración) y  $\phi = 0.1$  wt % (baja concentración) para NaCl. Las soluciones preparadas se almacenaron a 2°C y se dejaron reposar a temperatura ambiente antes de ser utilizadas en los experimentos.

### 1.2. Arreglo experimental

El arreglo experimental consiste de una cámara digital acoplada a un microscopio óptico, que captura imágenes frontales de alta resolución de los depósitos. Paralelamente, se utiliza un microscopio digital para obtener imágenes laterales del proceso de evaporación. Ambos dispositivos están montados en soportes fijos sobre una plataforma móvil sellada con una bolsa transparente, lo que permite crear un microambiente controlado. En la superficie de la platina del microscopio se coloca un portaobjeto de acrílico, junto con un sensor de temperatura y humedad relativa (Xiaomi NUN4126GL). La humedad relativa se controló utilizando el efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ) mediante gel de sílice, un material poroso que captura las moléculas de agua del aire. La actividad del agua mide la cantidad de vapor de agua en un material respecto al agua pura a la misma temperatura, varía entre 0 y 1, mientras que la humedad relativa (HR) muestra el porcentaje de humedad en el aire. La efectividad del gel de sílice para reducir la actividad del agua depende de sus

propiedades, temperatura y humedad inicial [47]. En la Figura 1.1 se muestra un esquema del arreglo experimental.

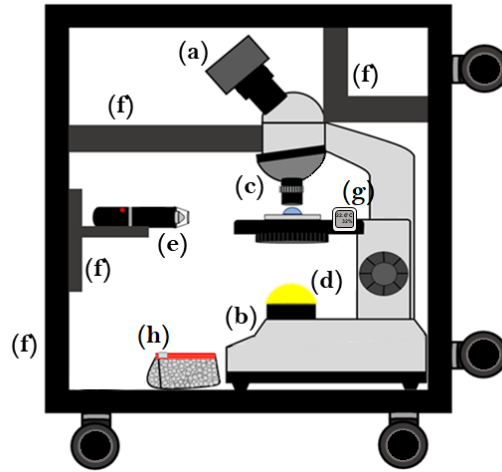


Figura 1.1: **Representación esquemática de la configuración experimental.** El sistema está compuesto por una cámara digital (a), un microscopio óptico (b) y una fuente de luz (d) para capturar imágenes frontales de la gota sobre el sustrato (c). Un microscopio digital (e) registra imágenes laterales durante el proceso de evaporación. Ambos microscopios están montados en soportes fijos (f). La temperatura y la humedad se controlan mediante un sensor (g) y gel de sílice (h).

### 1.3. Protocolo de limpieza

Se emplearon sustratos de poli(metilmacrilato) (PMMA) en su estado original para el depósito de las gotas. Antes de su uso, se retiró cuidadosamente la película protectora que los recubre, y la superficie fue limpiada con un paño especial para lentes, eliminando posibles impurezas. Para neutralizar cargas estáticas, los sustratos se pusieron en contacto con una lámina de aluminio. Cada sustrato se utilizó una única vez para evitar la contaminación.

### 1.4. Adquisición de imágenes

El proceso de secado fue monitorizado mediante capturas de imágenes de alta calidad en vistas frontal y lateral. Para la perspectiva frontal, se utilizó una cámara montada en un microscopio óptico, con parámetros ajustados según cada capítulo: en el capítulo 2, se adquirieron 3600 imágenes a 1024x822 píxeles (resolución espacial de 0.0037 mm/píxel) con intervalos de 2 segundos, mientras que en el capítulo 3, se obtuvieron 300 imágenes a 4512x3000 píxeles (resolución espacial de 0.015 mm/píxel) cada 30 segundos. En ambos capítulos, la perspectiva lateral se capturó utilizando un microscopio digital USB-1600x, que registró imágenes con una resolución de 640x480 píxeles (0.015 mm/píxel). Para cada capítulo, se adquirieron 2600 imágenes con un intervalo de 5 segundos entre capturas.

# Capítulo 2

## Cristalización impulsada por gravedad en gotas de proteínas y NaCl

### 2.1. Resumen

La manipulación de la orientación de las gotas durante la evaporación surge como un método potencialmente revolucionario para controlar la formación de patrones en soluciones de proteínas y sales, crucial para aplicaciones en tecnologías de recubrimiento y microfabricación. Presentamos un estudio experimental que investiga el impacto de la orientación vertical en la dinámica de evaporación y los patrones de cristalización en gotas que contienen soluciones de albúmina de suero bovino (BSA) y cloruro de sodio (NaCl). Descubrimos que la configuración vertical crea un gradiente notable en la distribución de solutos y morfologías cristalinas a lo largo del depósito. En la parte superior del depósito, las estructuras dendríticas se forman rápidamente debido a una alta tasa de evaporación que promueve la sobresaturación local, lo que resulta en la nucleación anisotrópica y el crecimiento de cristales. En contraste, la parte inferior presenta un crecimiento de cristales más homogéneo y compacto, lo que resalta una tasa de evaporación más lenta y una acumulación gradual de solutos. La orientación vertical impacta significativamente tanto en el efecto de anillo de café como en la cinética de cristalización. Este comportamiento constante en distintos volúmenes de gotas y concentraciones de NaCl demuestra el impacto significativo de la gravedad en la orientación y la velocidad de crecimiento de los cristales. La relevancia de este fenómeno es fundamental para la formación de patrones, con importantes implicaciones en el diseño de procesos de biofabricación y la ingeniería de materiales funcionales.

## 2.2. Introducción

El estudio de las proteínas es esencial en biología y medicina, desempeñando roles clave que van desde la catalización de reacciones bioquímicas hasta la regulación de procesos celulares que influyen en el desarrollo de enfermedades como el cáncer y los trastornos neurodegenerativos [48, 49]. Los avances en técnicas como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) y la microscopía de fuerza atómica (AFM) han permitido grandes avances en el entendimiento de las dinámicas de proteínas. [50, 51]. Además, un estudio con solución polimérica con paracetamol explora cómo el incremento en la viscosidad contribuye a evitar patrones de distribución no deseados durante el secado de gotas, promoviendo aplicaciones farmacéuticas más uniformes y efectivas [52]. En este contexto, la investigación sobre la formación de patrones en soluciones de proteínas durante el secado de gotas ha emergido como un área crucial para aplicaciones diagnósticas y farmacéuticas, centrándose en el estudio de gotas secas y biofluidos [53, 54, 55]. Esto resalta la necesidad de explorar estos fenómenos en otras formas de secado, como el secado de gotas verticales [30, 56, 57, 28, 29].

El proceso de secado de gotas sésiles es un fenómeno complejo que ha captado el interés de investigadores en áreas como la física de fluidos y la biotecnología, debido a su relevancia en diversos procesos científicos e industriales [58, 59, 60, 61]. Durante el secado, se generan principalmente dos tipos de flujos dentro de la gota: los flujos capilares y los de Marangoni [15, 62]. Los flujos capilares, impulsados por los gradientes de presión causados por la curvatura de la interfaz líquido-aire, tienden a mover el solvente del centro de la gota hacia los bordes, produciendo el conocido efecto anillo de café, caracterizado por la acumulación de partículas en el perímetro de la gota [63, 64, 65]. En contraste, los flujos de Marangoni, resultante de los gradientes de tensión superficial inducidos por cambios en la temperatura o composición de la superficie de la gota, pueden redirigir el transporte de solutos, contrarrestando o potenciando los flujos capilares [66, 67, 68]. Estos flujos son cruciales para entender la distribución final de los solutos y la morfología de los patrones de secado, influyendo en aplicaciones que van desde la impresión por inyección de tinta hasta la creación de biosensores y el desarrollo de diagnósticos médicos, lo que hace que su estudio sea un área de interés científico y tecnológico de gran relevancia [27, 69, 70].

La investigación sobre el secado de gotas verticales, definidas como aquellas depositadas en una superficie perpendicular al plano horizontal, muestra que la gravedad tiene un impacto clave sobre las gotas, ya que no solo modifica la distribución de solutos, sino que también afecta la dinámica de evaporación y cristalización [30, 28, 32]. En comparación con las gotas sésiles, donde la evaporación y los patrones de depósito son relativamente simétricos, las gotas verticales exhiben un comportamiento distinto: la gravedad induce un flujo descendente del solvente que lleva a una acumulación de solutos en la parte inferior de la gota [71, 72, 29, 73]. Esto resulta en una evaporación más rápida en la parte superior y una región de mayor concentración de soluto en la parte inferior. Este gradiente no solo impacta la uniformidad del depósito, sino que también puede llevar a variaciones en la cinética de nucleación y crecimiento cristalino, produciendo estructuras más grandes y posiblemente más complejas en la base. Por otro lado, se ha observado que la gravedad también influye en el comportamiento de gotas coloidales levitadas acústicamente al pro-

vocar la sedimentación de partículas, lo que altera la distribución de la capa superficial elástica y genera invaginaciones [74]. Asimismo, los campos de ultrasonido aceleran significativamente la evaporación en gotas salinas y mejoran la calidad de los cristales de NaCl [75].

El secado de gotas que contienen proteínas es un área de investigación que ha atraído considerable atención debido a su relevancia en campos como los diagnósticos médicos, el desarrollo farmacéutico y las tecnologías de microarrays de proteínas [76, 77, 78]. Durante el proceso de secado, las interacciones entre proteínas, solutos y el solvente dentro de una pequeña gota pueden llevar a la formación de patrones y estructuras complejas como anillos, filamentos y dendritas [79, 80]. El estudio de estos patrones puede proporcionar información valiosa sobre la estabilidad y funcionalidad de las proteínas. Estos patrones están significativamente influenciados por los flujos de Marangoni y capilares, así como por la concentración inicial de proteínas y la presencia de otros solutos como sales o azúcares. Las investigaciones han demostrado que la presencia de sales puede inducir la cristalización de proteínas durante el secado, afectando la morfología del residuo seco [81, 82]. Además, la velocidad de evaporación del solvente, que puede ser manipulada controlando la temperatura y la humedad ambiente, desempeña un papel crucial en la cinética de agregación y desnaturalización de proteínas [83, 84].

A pesar de los avances en la comprensión de la formación de patrones en gotas secas de soluciones de proteínas y NaCl, existe una necesidad crucial de explorar más a fondo las dinámicas específicas de las gotas depositadas en superficies verticales. Comprender como la orientación vertical influye en los patrones formados en soluciones de proteínas y NaCl podría proporcionar avances significativos en el conocimiento de la cristalización y la nucleación, ofreciendo información clave para optimizar procesos en la ciencia de materiales y biofabricación.

En este capítulo, nos centramos en la formación de patrones en gotas verticales de soluciones de proteínas y NaCl. Mediante experimentación detallada, investigamos cómo la orientación vertical influye en la distribución y la morfología final de los solutos después del proceso de secado. Esta investigación no solo busca profundizar en la comprensión de la física de fluidos de las gotas en orientación vertical, sino también en cómo manipular las condiciones experimentales para influir en las interacciones moleculares entre proteínas y sales, afectando la formación de cristales.

## 2.3. Metodología específica

### 2.3.1. Arreglo Experimental

El sistema experimental descrito en el capítulo 1 se amplía para incluir una funcionalidad de rotación, permitiendo el análisis de configuraciones horizontales y verticales. El sistema gira a una velocidad angular de  $\omega = 0.25\text{rad/s}$  hasta alcanzar un ángulo de  $90^\circ$ , lo que permite observar la transición de una configuración horizontal (panel I) a una vertical (panel II) en la Figura 2.1.

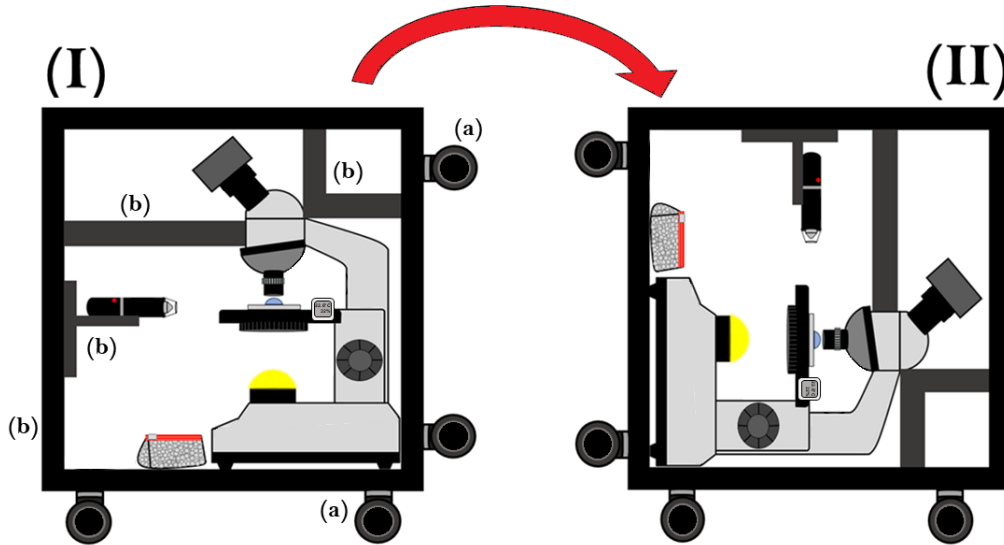


Figura 2.1: Esquema del sistema experimental con capacidad de rotación. (I) Configuración inicial con el sustrato orientado a  $0^\circ$ , donde la gota permanece en posición horizontal. La reorientación se realiza utilizando las ruedas (a) acopladas a los soportes fijos (b). (II) Configuración ajustada, en la que el dispositivo se posiciona a  $90^\circ$ , permitiendo la observación de gotas verticales.

### 2.3.2. Desnaturalización térmica

Las soluciones de BSA, preparadas con concentraciones altas y bajas de NaCl, se sometieron a una exposición térmica constante de  $90^\circ\text{C}$  en un Mini Dry Bath Incubator (TC0401005). Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar y alcanzar el equilibrio térmico a temperatura ambiente durante un periodo de 20 minutos.

### 2.3.3. Evaporación de gotas

Utilizando una micropipeta, se depositó una gota de BSA y NaCl, de entre  $3$  y  $15\ \mu\text{L}$ , sobre el portaobjetos de acrílico que ya estaba previamente montado en nuestro arreglo experimental (ver Figura 2.1). Para evaluar la repetibilidad en la formación de patrones, se colocó otra gota en el mismo portaobjetos. Este procedimiento de deposición y evaluación se repitió 4 veces bajo las mismas condiciones para cada volumen. La evaporación se llevó

acabo bajo condiciones controladas, con temperaturas entre 21.5°C y 24°C, y una humedad relativa entre 31–36 %.

## 2.4. Resultados

### Patrones en gotas verticales secas

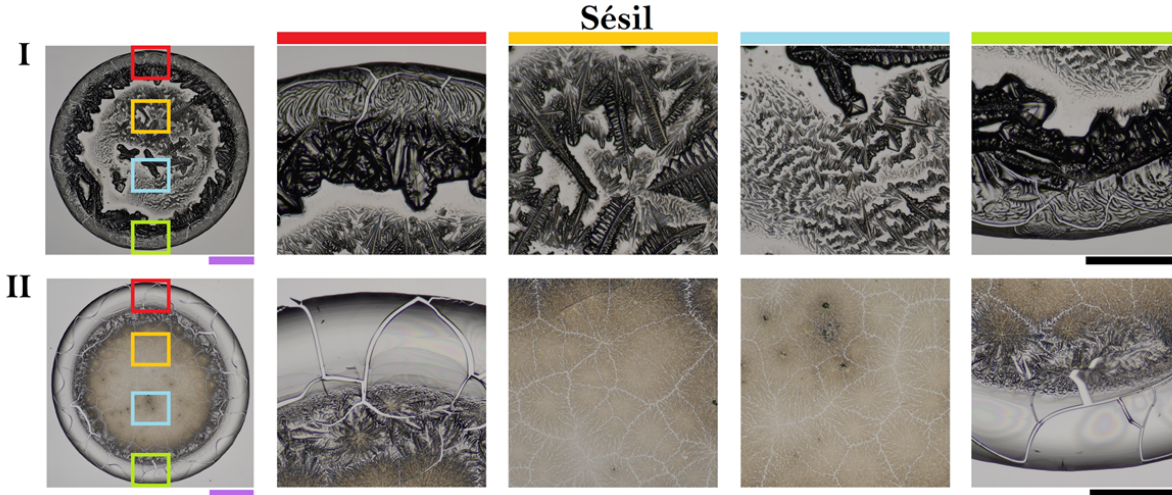


Figura 2.2: **Patrones en depósitos de gotas sésiles con proteínas y NaCl.** El panel I ilustra la simetría radial y complejidad estructural en el depósito de una gota sésil que contiene 1 wt % de BSA y 1 wt % de NaCl. El panel II muestra cristales más pequeños y un efecto de anillo de café pronunciado en una mezcla con 1 wt % de BSA y 0.1 wt % de NaCl. El volumen de las gotas fueron de  $15 \mu\text{L}$ . Las barras de color rojo, amarillo, azul y verde indican regiones marcadas por los recuadros de colores respectivos. Las líneas moradas representan una escala de 1 mm, mientras que las líneas negras denotan 0.5 mm.

La Figura 2.2 muestra depósitos generados por la evaporación de gotas en configuración sésil que contienen proteínas y NaCl. En el panel I, se presentan imágenes de un depósito con  $\phi_p = 1 \text{ wt } \%$  de BSA y  $\phi = 1 \text{ wt } \%$  para NaCl. El depósito exhibe simetría radial, caracterizado por patrones complejos con bordes claramente definidos. La periferia, resaltada con el recuadro en rojo, muestra un efecto típico de anillo de café, con acumulación de material en el borde externo, donde las partículas sólidas son transportadas hacia el perímetro de la gota a medida que el líquido se evapora. En contraste, el centro del depósito revela morfologías diversas. La sección resaltada en amarillo muestra estructuras alargadas y puntiagudas que se asemejan a cristales con forma de aguja y de helecho, indicativos de una cristalización rápida debido a una sobresaturación local significativa. Estas estructuras reflejan un crecimiento controlado por difusión, donde las cinéticas de agregación de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  son considerablemente rápidas. En la sección resaltada en azul, aparecen pequeños cristales amorfos con forma de aguja interconectados sin una clara preferencia direccional. Una comparación entre las dos áreas centrales indica un gradiente de deposición, desde agregados amorfos en la periferia hasta cristales más grandes y bien formados hacia el centro, reflejando variaciones en la concentración de proteínas y NaCl, y, por ende, en la tasa de nucleación a lo largo del sustrato. La zona resaltada en verde refleja características similares a las observadas en la región marcada en rojo, en

concordancia con la simetría radial del depósito.

El Panel II de la Figura 2.2 ilustra una serie de imágenes que detallan la morfología de los patrones en una mezcla que contiene  $\phi_p = 1$  wt% de BSA y  $\phi = 0.1$  wt% de NaCl. Este depósito, simétrico radialmente, presenta cristales más pequeños en comparación con los observados a mayores concentraciones de NaCl. Cabe destacar que el anillo de café (recuadro rojo y verde) muestra grietas prominentes, junto a una zona de agregados cristalinos amorfos. Estos agregados probablemente se deben a procesos de precipitación desordenados, donde incrementos rápidos en la concentración local de solutos, causados por la evaporación del solvente, superan la capacidad de los iones para organizarse de manera ordenada en cristales bien definidos. Además, los recuadros amarillo y azul resaltan la formación de islas dendríticas en toda la región central. Esto sugiere que la sobresaturación de iones es rápida en esta área, lo que provoca una nucleación que supera el crecimiento lateral de las facetas cristalinas, generando así una morfología ramificada.

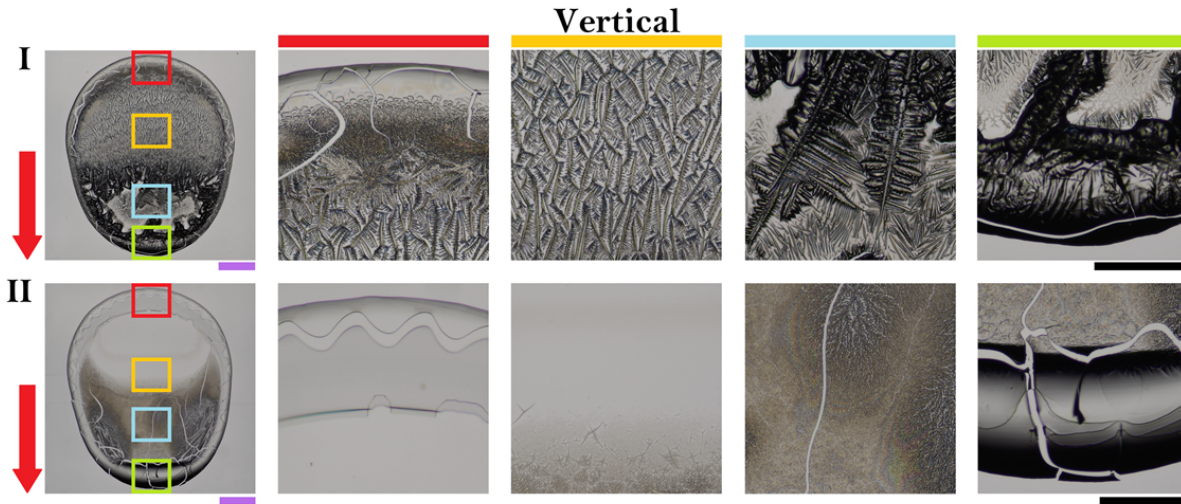


Figura 2.3: **Patrones en depósitos de gotas verticales con proteínas y NaCl.** Panel I, muestra el impacto de la gravedad en la cristalización dentro de una gota que contiene  $\phi_p = 1$  wt% de BSA y  $\phi = 1$  wt% de NaCl, destacando el crecimiento direccional y la formación de patrones. El Panel II detalla el transporte de solutos y su depósito en una gota vertical con menor concentración de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt%). El volumen de las gotas fue de  $15 \mu\text{L}$ . Las barras de color rojo, amarillo, azul y verde indican regiones marcadas por los recuadros de colores respectivos. Las líneas moradas representan una escala de 1 mm, mientras que las líneas negras denotan 0.5 mm. Las flechas rojas indican la orientación de la gravedad.

En el Panel I de la Figura 2.3 se presentan imágenes de los patrones de cristalización formados durante el secado de una gota que contiene  $\phi_p = 1$  wt% de BSA y  $\phi = 1$  wt% para NaCl sobre una superficie vertical. Estos patrones reflejan nucleación heterogénea y crecimiento dirigido influenciado por la gravedad (flechas rojas). La región superior del

depósito (recuadro rojo) muestra estructuras dendríticas con un desarrollo ramificado alineado con la aceleración gravitacional. Las dendritas suelen formarse bajo condiciones de alta concentración de soluto, donde la sobresaturación y el crecimiento anisotrópico se favorecen debido a la evaporación rápida y la difusión limitada, creando un entorno ideal para su nucleación. En gotas verticales, este efecto se acentúa en la región superior debido a la interacción entre las dinámicas de evaporación y la redistribución del soluto. En la región enmarcada en amarillo, aparecen cristales más compactos e interconectados, lo que indica una tasa de crecimiento más lenta en comparación con la zona superior. Esto puede deberse a una tasa de enfriamiento más equilibrada, favoreciendo un crecimiento cristalino isotrópico mientras se mantiene la alineación con la gravedad. El área marcada en azul contiene estructuras alargadas en forma de hojas de palma orientadas hacia abajo, que probablemente se forman en un entorno de sobresaturación controlada que facilita un crecimiento homogéneo y simétrico, produciendo estructuras altamente ordenadas. Finalmente, el segmento enmarcado en verde, que representa el borde inferior del depósito, exhibe una cristalización caótica con contornos poco definidos. Este escenario se acompaña de una pronunciada acumulación de material, producto del flujo influenciado por la gravedad y la evaporación, lo que aumenta la concentración de solutos en esa zona.

El Panel II de la Figura 2.3 muestra el depósito formado por el secado de una gota que contiene proteínas y NaCl ( $\phi_p = 1$  wt % de BSA y  $\phi = 0.1$  wt % de NaCl) en una superficie vertical. La influencia gravitacional (flechas rojas) en el transporte de solutos es evidente, destacando una acumulación significativa de material en la parte inferior, lo que sugiere que las regiones superiores experimentan una evaporación más rápida y una menor deposición de material. El recuadro rojo, que corresponde a la región superior del depósito, revela un patrón de deposición uniforme sin presencia de agregados y caracterizado por grietas ortogonales. Estas grietas no presentan una acumulación evidente de material en los bordes ni en su interior, lo que sugiere que son resultado del estrés mecánico generado durante el secado de la película. El área marcada en amarillo, que representa una región intermedia superior, muestra predominantemente una deposición uniforme con dispersión esporádica de cristales más pequeños y simples. La ausencia de ramificaciones y el menor tamaño de los cristales sugieren cinéticas de cristalización más lentas, lo que sugiere una concentración de solución cercana al umbral de saturación, sin alcanzar una sobresaturación significativa que favorezca la formación de estructuras dendríticas o ramificadas. En una superficie vertical, la gravedad induce un flujo descendente del solvente, lo que podría reducir la concentración local de soluto en las partes superior e intermedia del depósito mientras se desplaza hacia abajo. En consecuencia, las regiones superiores podrían no experimentar la misma tasa de sobresaturación que las inferiores, lo que lleva a una nucleación menos frecuente y a un crecimiento cristalino restringido. En la región marcada por el color azul, que corresponde a la zona intermedia inferior del depósito vertical, se identifica un patrón cristalino intrincado, caracterizado por la presencia de cristales dendríticos que parecen entrelazarse. Los ejes principales de estas estructuras están orientados en la dirección de la fuerza gravitacional. La disposición de estos cristales sugiere que las dinámicas de evaporación y difusión presentes en este segmento favorecen activamente su formación y crecimiento. El entrelazado observado podría reflejar una competencia por recursos de soluto, lo que conduce a un desarrollo cristalino más heterogéneo. Esto es indicativo de

un proceso constante de nucleación, posiblemente alterado por variaciones locales en la sobresaturación del soluto debido a la evaporación diferencial a lo largo de la superficie vertical. Finalmente, el color verde indica la región inferior del depósito, donde se evidencia una morfología claramente distinta, con estructuras más compactas y menos extendidas. Este patrón es típico de un proceso de cristalización lento, donde la evaporación del solvente y la consecuente sobresaturación ocurren a una tasa mucho más reducida, posiblemente debido a la acumulación de soluto y una disminución en la movilidad molecular a medida que se alcanza la parte inferior del depósito.

## Dinámica de formación de cristales en gotas de proteína-NaCl en orientación vertical

Las dinámicas de secado de gotas que contienen una solución de proteína-NaCl fueron analizadas para comprender la interacción entre evaporación, transporte de solutos y cristalización en la formación de patrones (ver Figura 2.4). Panel I de la Figura 2.4 ilustra los patrones formados por una gota sobre un sustrato sésil con  $\phi_p = 1$  wt % de BSA y  $\phi = 1$  wt % de NaCl. En la etapa inicial ( $t = 3,158$  s), la gota mostró una distribución homogénea de solutos, evidenciada por su apariencia uniforme. A medida que avanzó el secado, se observó un leve incremento en la densidad del borde ( $t = 4,278$  s), lo que señala el inicio del efecto anillo de café. Esto se atribuye a la mayor tasa de evaporación en la línea de contacto debido a la mayor curvatura, lo que induce un flujo capilar compensatorio desde el centro hacia los bordes. Durante la etapa intermedia, la formación del anillo de café está prácticamente completada. Sin embargo, cerca de esta estructura, se produce un crecimiento radial de cristales ( $t = 4,408$  s), mientras que una deposición de NaCl emerge sobre este anillo, culminando en la formación de pequeñas estructuras alargadas y puntiagudas ( $t = 4,490$  s). Esto sugiere una mayor tasa de deposición de soluto, con el flujo hacia el exterior transportando más proteína y sal hacia la periferia. En la fase final de secado, surgió un patrón dendrítico pronunciado en la región central ( $t = 4,612$  s). Esta morfología sugiere el inicio de la cristalización de NaCl, donde un frente de sal interrumpió la distribución homogénea de proteínas, llevando a la formación de estructuras cristalinas cruciformes incrustadas en agregados amorfos de proteínas. Para  $t = 4,692$  s, el patrón final de la gota seca ya estaba completamente formado.

Las gotas con  $\phi_p = 1$  wt % y  $\phi = 0.1$  wt % exhibieron comportamientos iniciales similares a los observados en concentraciones más altas de NaCl. Como se muestra en  $t = 3,554$  s en el Panel II de la Figura 2.4, la gota presentó inicialmente una apariencia uniforme. Para  $t = 4,068$  s, se observó la formación de un anillo periférico, indicando la migración de partículas hacia el borde. Esta etapa corresponde a una fase crítica, donde el flujo inducido por la evaporación es lo suficientemente fuerte como para transportar el soluto a través de la superficie de la gota hacia la periferia. A medida que avanza el proceso de secado (de  $t = 4,600$  s a  $t = 4,694$  s), la densidad del anillo aumenta. Simultáneamente, emergen puntos de nucleación en la región central, lo que lleva a la formación de islas dendríticas. Estos patrones sugieren un mecanismo de separación de fases, posiblemente debido a la pérdida de agua y la consecuente agregación de proteína-sal. Dado que las ramas cristali-

nas presentan una morfología similar a un fractal ( $t = 4,624$  s), esto indica un proceso de agregación limitado por difusión. Las etapas finales del secado revelan un notable aumento en la complejidad del patrón dentro de la región central ( $t = 4,694$  s).

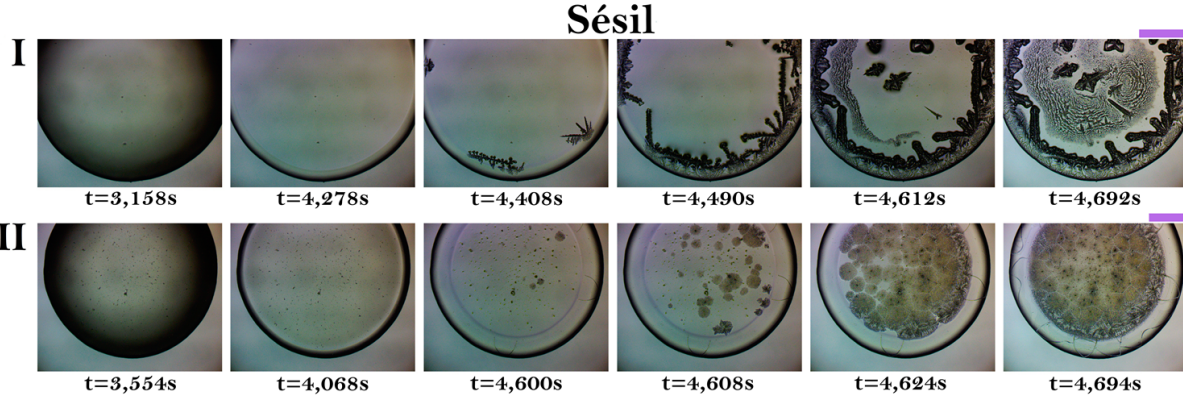


Figura 2.4: **Proceso de formación de patrones en depósitos de proteínas y NaCl en configuración sésil.** El panel I muestra la progresión del secado en una gota sésil que contiene 1 wt % de BSA y 1 wt % de NaCl. Inicialmente ( $t = 3,158$  s), la gota exhibe una distribución uniforme del soluto. A medida que avanza el secado, se observa un aumento gradual en la densidad en el borde, marcando el inicio del efecto de anillo de café ( $t = 4,278$  s). Posteriormente, el crecimiento radial de los cristales y la deposición de NaCl conducen a la formación de estructuras alargadas ( $t = 4,490$  s). Un patrón dendrítico pronunciado emerge en la etapa final ( $t = 4,612$  s), lo que indica la cristalización de NaCl en la región central. Se observan comportamientos similares en una gota con 1 wt % de BSA y 0.1 wt % de NaCl, donde la uniformidad inicial pasa al desarrollo de un anillo periférico y la formación de islas dendríticas durante el secado (Panel II). Las gotas eran de  $15 \mu\text{L}$ . Las líneas moradas indican 1 mm.

Se investigaron las dinámicas de secado y la formación de patrones de una gota vertical que contiene BSA y NaCl bajo la misma configuración experimental que las gotas sésiles, pero orientadas a 90 grados para estudiar el efecto de la gravedad (ver Figura 2.5). El Panel I de la Figura 2.5 muestra la formación de patrones resultante de una gota vertical con 1 wt % de BSA y 1 wt % de NaCl evaporándose. Inicialmente, la gota muestra un gradiente de concentración de soluto causado por la gravedad, mostrando una acumulación más densa en la parte inferior ( $t = 3,540$  s). A diferencia de las gotas sésiles, la ausencia de un efecto inmediato de anillo de café sugiere que las fuerzas gravitacionales superan al flujo capilar. Para  $t = 3,844$  s, se hacen evidentes estructuras estriadas alineadas con la gravedad, marcando un flujo direccional del soluto. A medida que continúa la evaporación, se desarrolla un contraste claro entre las regiones superior e inferior de la gota para  $t = 4,170$  s. Las estructuras estriadas llenan la región superior, mientras que la parte inferior permanece libre de agregados hasta  $t = 4,286$  s. Una depresión periférica en la región inferior retiene tanto solvente como solutos, ralentizando la evaporación y extendiendo la cristalización y la formación de agregados hasta  $t = 4,370$  s. El patrón completo se observa

en  $t = 4,634$  s.

En la dinámica de secado de una gota vertical que contiene 1 wt % de BSA y 0.1 wt % de NaCl (Panel II, Figura 2.5), se hace visible un gradiente en la concentración de soluto en  $t = 3,008$  s, con una región más densa en la sección inferior de la gota debido a la gravedad. La ausencia de un pronunciado anillo periférico en esta etapa sugiere un efecto de anillo de café reducido, influenciado por la orientación vertical de la gota y la atracción gravitatoria. A medida que avanza el secado, las partículas de soluto migran y se depositan hacia la parte inferior de la gota en  $t = 3,878$  s, donde se forma una estructura periférica inferior distinta debido a que la gravedad domina sobre el flujo capilar. La convección interna, que juega un papel significativo en el transporte de solutos y la formación de fases cristalinas asimétricas en gotas verticales, puede ser suprimida bajo condiciones confinadas, como se ha demostrado en experimentos de cristalización de proteínas [85]. La nucleación comienza en  $t = 4,078$  s, cuando la concentración de soluto alcanza la sobresaturación, iniciando la formación de estructuras verticales bajo la influencia de la gravedad. En  $t = 4,168$  s, estas estructuras comienzan a exhibir un patrón dendrítico. La evaporación continua del solvente intensifica la concentración de soluto, lo que promueve el crecimiento de estas formaciones cristalinas en  $t = 4,220$  s. Finalmente, las estructuras dendríticas se expanden para ocupar más espacio dentro de la gota en  $t = 4,280$  s, impulsadas por un suministro constante de soluto a los puntos de nucleación y mayores tasas de deposición de soluto.

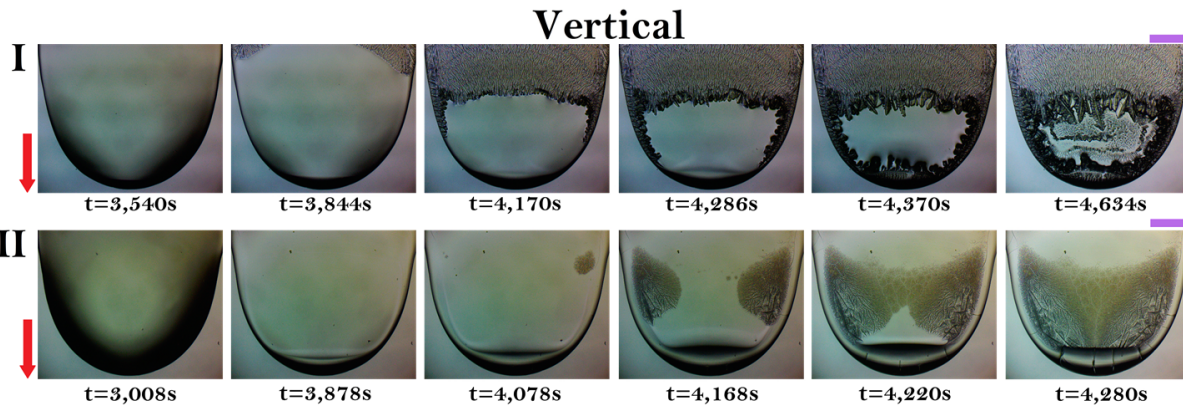


Figura 2.5: **Proceso de formación de patrones en depósitos de proteínas y NaCl en configuración vertical.** El panel I muestra que la gota exhibe un gradiente en la concentración de soluto debido a la gravedad, con pronunciadas estructuras alineadas con la fuerza gravitacional en la parte inferior ( $t = 3,540$  s). En esta configuración, no se detecta de inmediato un efecto de anillo de café. Con el progreso del secado, emergen estructuras estriadas ( $t = 4,170$  s) y se forman agregados concentrados en la región periférica inferior ( $t = 4,370$  s). El proceso de secado de una gota con 1 wt % de BSA y 0.1 wt % de NaCl sobre un sustrato vertical muestra comportamientos similares, con efectos gravitacionales que influyen en la migración de soluto y la formación de estructuras dendríticas (panel II). Las gotas eran de  $15 \mu\text{L}$ . Las líneas moradas indican 1 mm y las flechas rojas indican la orientación de la gravedad.

El proceso de secado de gotas de proteínas puede caracterizarse mediante la evolución del perfil de altura relativa ( $h/h_0$ ), donde  $h_0$  representa la altura inicial de la gota en función del radio relativo ( $r/r_0$ ), donde  $r_0$  es el radio inicial de la gota durante la evaporación. El Panel I de la Figura 2.6 muestra una secuencia de imágenes que ilustran diferentes etapas del secado de una gota sésil que contiene  $\phi_p = 1$  wt % y  $\phi = 1$  wt %, representadas en función del tiempo relativo de evaporación ( $t/t_e$ , donde  $t_e$  es el tiempo total de evaporación de la gota). El perfil de altura correspondiente se presenta en el gráfico del Panel II de la Figura 2.6.

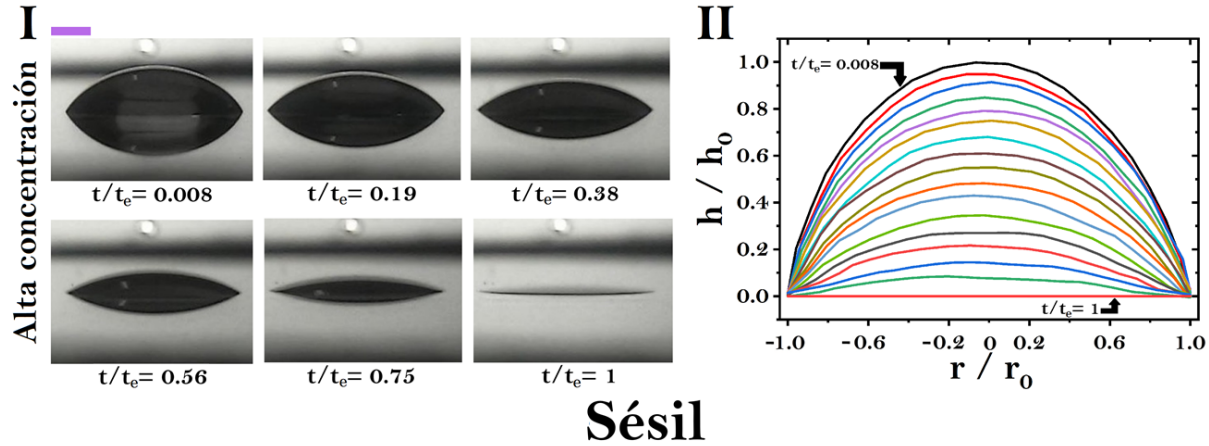


Figura 2.6: **Dinámica de secado de gotas sésiles con alta concentración de NaCl.** Panel I: Muestra la evolución del secado de una gota sésil con 1 wt % de BSA y 1 wt % de NaCl observada desde una perspectiva lateral. Inicialmente, la gota mantiene una forma elíptica estable, pero a medida que avanza el secado, se observa un aplanamiento progresivo. Panel II: Ilustra el perfil de altura de la gota durante el proceso de secado, evidenciando una fase inicial de estabilidad seguida por un aplanamiento. Las líneas moradas corresponden a 1 mm.

En las etapas iniciales, el perfil es notablemente estable, con una forma elíptica bien definida, un fenómeno atribuible a la tensión superficial que prevalece sobre los efectos gravitacionales. Durante este período, la gota experimenta una fase de tasa de evaporación constante, en la cual la dinámica está principalmente gobernada por la difusión de vapor de agua hacia la atmósfera circundante. La observación de un radio de gota consistentemente estable sugiere una fuerte adhesión molecular entre la solución proteica y el sustrato, lo que da como resultado un borde de contacto invariable a lo largo del secado. A medida que avanza el secado, se produce un cambio notable en la morfología: el perfil se aplanan progresivamente, lo que indica una reducción del volumen de la gota. Este aplanamiento, concurrente con la pérdida de altura, sugiere una transición de dinámicas de secado dominadas por la evaporación hacia aquellas influenciadas por efectos capilares y la difusión de la solución en las regiones más delgadas de la gota. Se observa un comportamiento análogosésil en las dinámicas de secado de gotas sésiles de proteínas con baja concentración de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %), como se muestra en la Figura 2.7. La consistencia de este comportamiento, a pesar de la variación en la concentración salina, su-

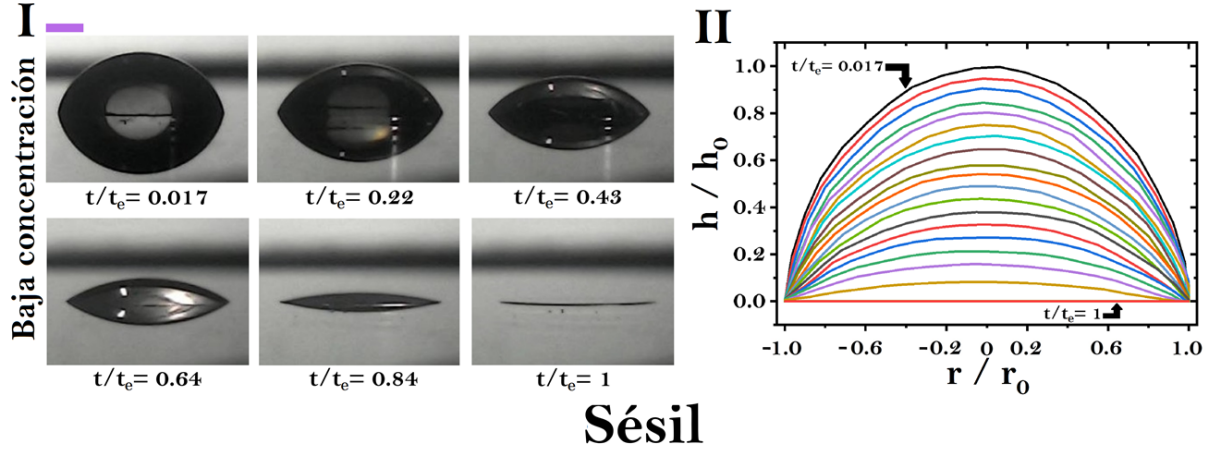


Figura 2.7: **Dinámica de secado de gotas sésiles con baja concentración de NaCl.** Panel I: Muestra la evolución del secado en una gota sésil con 1 wt % de BSA y 0.1 wt % de NaCl. Panel II: Ilustra el perfil de altura durante el proceso de secado. Las líneas moradas corresponden a 1 mm.

giere que los mismos procesos de difusión y evaporación predominan en las fases de secado.

La dinámica de secado de las gotas verticales difiere significativamente de la observada en gotas sésiles, principalmente debido a la intervención de la gravedad. El Panel I de la Figura 2.8 muestra el proceso de secado de una gota que contiene  $\phi_p = 1$  wt % de BSA y  $\phi = 1$  % de NaCl en solución, colocada sobre un sustrato en orientación vertical. La evolución temporal del perfil de altura de la gota se cuantifica en el Panel II de la Figura 2.8.

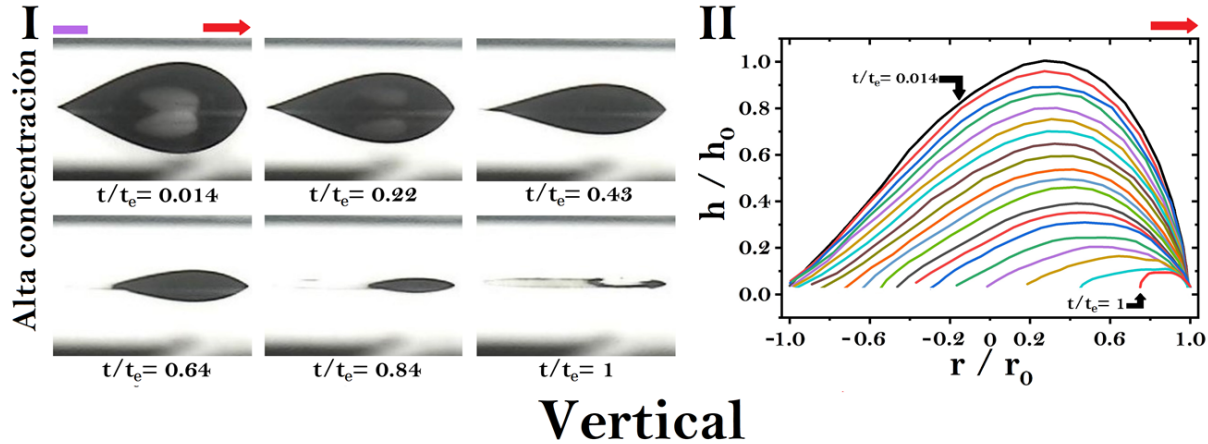


Figura 2.8: **Dinámica de secado de gotas verticales con alta concentración de NaCl.** Panel I: El proceso de secado de una gota vertical con 1 wt % de BSA y 1 wt % de NaCl exhibe cambios significativos en el perfil de altura debido a los efectos gravitacionales, lo que provoca una disminución más rápida en la altura que en el radio a medida que avanza el secado. Panel II: La cuantificación del perfil de altura de la gota vertical revela una cinética de secado compleja, con una evaporación no uniforme influenciada por la fuerza gravitacional, culminando en efectos de contracción radial y cambios morfológicos. Las líneas moradas corresponden a 1 mm y las flechas rojas indican la orientación de la gravedad.

La observación directa del secado de la gota, bajo la influencia de la gravedad actuando perpendicularmente al sustrato, revela cambios significativos en su perfil de altura. En el estado inicial, la forma elíptica con un eje mayor vertical se alinea con el recipiente depósito de la gota y su alto contenido de solvente. A medida que avanza el secado, se observa una disminución más rápida de la altura de la gota en comparación con su radio, resultando en un perfil más delgado.

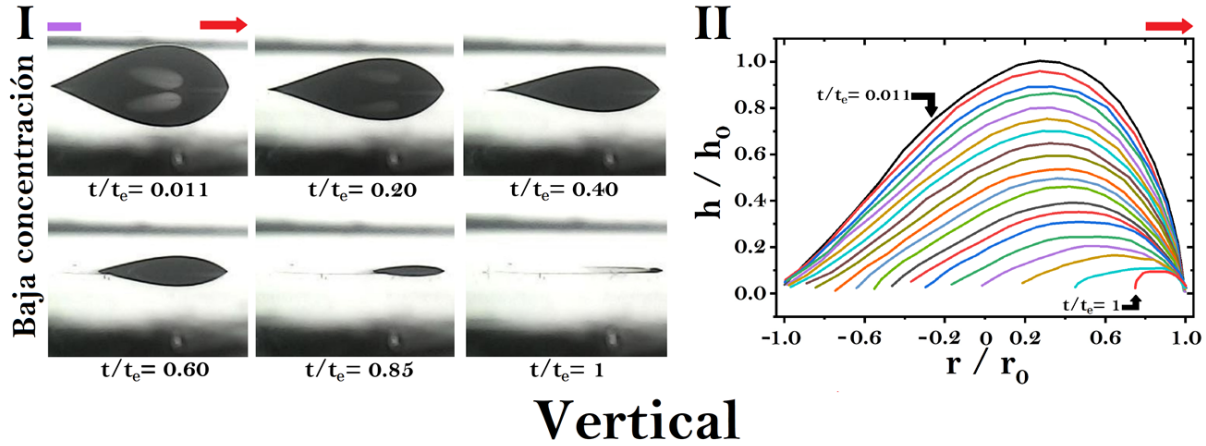


Figura 2.9: **Dinámica de secado de gotas verticales con baja concentración de NaCl.** Panel I: Proceso de secado de una gota vertical con 1 wt% de BSA y 0.1 wt% de NaCl. Panel II: Perfil de altura de una gota vertical a baja concentración de NaCl. Las líneas moradas corresponden a 1 mm y las flechas rojas indican la orientación de la gravedad.

Este comportamiento sugiere una cinética de secado compleja, donde la evaporación no es uniforme a lo largo de la gota, probablemente debido a un gradiente de concentración de soluto generado por la fuerza gravitacional. Hacia el final del proceso, se observa una rápida reducción del radio de la gota. Este cambio puede interpretarse como una transición en la dinámica de secado. Durante esta fase, las interacciones adhesivas entre las proteínas y el sustrato se ven influenciadas por la gravedad. Eventualmente, estas interacciones son dominadas por la acción gravitacional. Los efectos de contracción radial se intensifican a medida que disminuye la masa de la gota y aumenta la viscosidad del residuo proteico.

El aumento de la viscosidad durante la evaporación también tiene implicaciones significativas para el proceso de cristalización dentro de las gotas. A medida que el solvente se evapora y aumenta la concentración de solutos, la viscosidad de la solución incrementa, reduciendo la movilidad de las moléculas dentro de la gota. Este aumento en la viscosidad puede llevar a una disminución en la tasa de nucleación, ya que las moléculas encuentran más dificultad para reorganizarse en posiciones cristalinas. Además, el crecimiento de los cristales se ralentiza debido a la difusión limitada de moléculas hacia los frentes de crecimiento cristalino, lo que puede resultar en cristales más pequeños y menos definidos, especialmente en regiones donde la evaporación es más lenta. En áreas donde la viscosidad es extremadamente alta, la cristalización puede ser completamente inhibida, conduciendo a la formación de estructuras amorfas. Estos cambios en la dinámica de cristalización se reflejan en la morfología final de los depósitos, que muestran una mayor heterogeneidad en la distribución y el tamaño de los cristales, con estructuras más compactas en regiones de mayor viscosidad, típicamente hacia el final del proceso de evaporación. Se observa un comportamiento cualitativamente similar en la formación de patrones durante las dinámicas de secado de gotas verticales de proteína con bajas concentraciones de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt%), como se ilustra en la Figura 2.9.

## Propiedades de secado

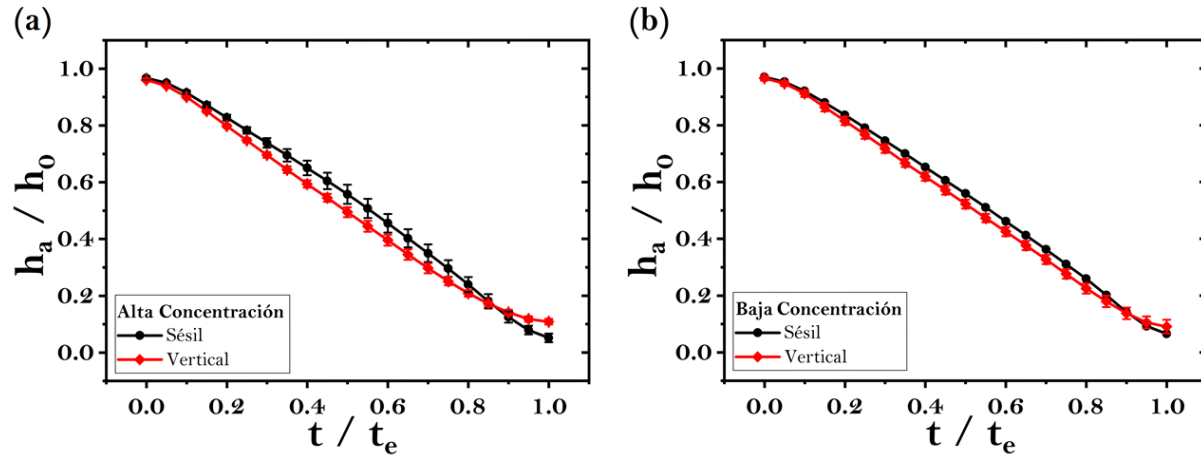


Figura 2.10: **Evolución de la altura durante el secado de gotas.** Evolución temporal de la altura normalizada ( $h_a/h_0$ , donde  $h_a$  es la altura del vértice y  $h_0$  es la altura inicial de la gota) para gotas sésiles (a) y verticales (b). En las gotas sésiles, la altura disminuye linealmente, lo que indica un proceso de evaporación controlado por difusión con una tasa constante de pérdida de masa. Las gotas verticales muestran un comportamiento similar hasta  $t/t_e = 0.9$ , momento en el que la tasa de reducción de altura disminuye debido a la acumulación de líquido en la base. Los símbolos en negro corresponden a la orientación sésil, mientras que los símbolos rojos representan la orientación vertical. Las barras de error indican la desviación estándar para  $n = 4$ .

Se investigaron las cinéticas de secado de gotas líquidas depositadas en superficies, tanto en orientaciones horizontales como verticales. La Figura 2.10 muestra la altura de las gotas en función del tiempo relativo de evaporación  $t/t_e$ . En las gotas sésiles, se observa una disminución lineal en la altura relativa del vértice ( $h_a/h_0$ , donde  $h_a$  es la altura del vértice y  $h_0$  es la altura inicial de la gota) a lo largo del tiempo (ver las líneas negras en la Figura 2.10), lo que indica un proceso de evaporación dominado por una tasa constante de pérdida de masa. Este comportamiento concuerda con lo esperado en un régimen controlado por difusión, donde la tasa de evaporación es proporcional al área expuesta de la gota. Aunque la altura de las gotas verticales también disminuye linealmente (ver líneas rojas en la Figura 2.10), la tasa de reducción se desacelera en la etapa final del proceso de secado (a partir de  $t/t_e = 0.9$ ). Esta desaceleración se debe a la acumulación de líquido que forma la estructura inferior de la gota.

Por otro lado, el radio relativo  $r/r_0$  de las gotas sésiles permanece casi invariable a lo largo del tiempo (ver líneas negras en la Figura 2.11). En contraste, el radio de las gotas verticales disminuye de manera no lineal. Inicialmente, las gotas verticales siguen un patrón similar al de las gotas sésiles, pero después de un punto de inflexión (a partir de  $t/t_e = 0.35$ ), la tasa de reducción del radio se vuelve más pronunciada (ver líneas rojas en la Figura 2.11). Estas diferencias en el proceso de secado resultan de un cambio

en el mecanismo de evaporación, posiblemente debido a la formación de un gradiente de concentración más pronunciado a lo largo de la interfaz líquido-aire, inducido por la gravedad.

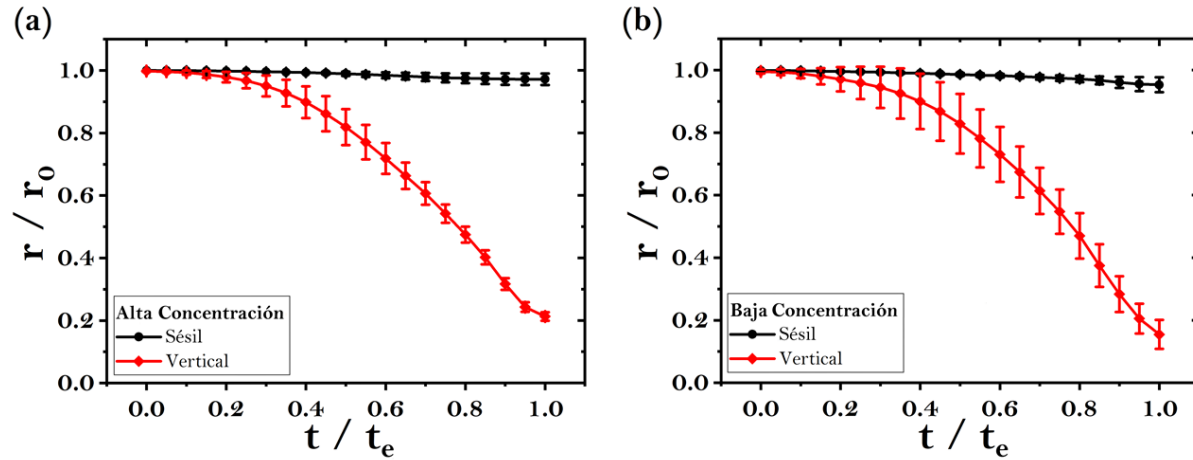


Figura 2.11: **Evolución del radio durante el secado de gotas.** Evolución temporal del radio normalizado ( $r/r_0$ ) para dos orientaciones: sésil (a) y vertical (b). El radio de las gotas sésiles permanece prácticamente constante a lo largo del tiempo. En contraste, las gotas verticales siguen inicialmente el mismo patrón, pero presentan un cambio significativo en la tasa de reducción del radio a partir de  $t/t_e = 0.35$ , atribuido a gradientes de concentración inducidos por la gravedad que afectan el mecanismo de evaporación. Los símbolos en negro corresponden a la orientación sésil, mientras que los símbolos rojos representan la orientación vertical. Las barras de error indican la desviación estándar para  $n = 4$ .

La Figura 2.12 muestra datos sobre el tiempo total de formación de patrones ( $t_{max}(s)$ ) para gotas sésiles y verticales en diferentes volúmenes (3, 6, 9, 12 y 15  $\mu\text{L}$ ) en dos categorías: alta concentración de NaCl (HS y HV con símbolos en negro (configuración sésil) y rojo (configuración vertical), respectivamente) y baja concentración de NaCl (LS y LV con símbolos en gris (configuración sésil) y naranja (configuración vertical), respectivamente). El  $t_{max}(s)$  se alcanza cuando el sistema presenta su último cambio morfológico y tiende a aumentar con el volumen tanto en gotas sésiles como en verticales. Sin embargo, existe un solapamiento considerable en las barras de error. Esto implica que, aunque los tiempos promedio de secado parecen ser diferentes entre las gotas sésiles y verticales, la variabilidad en los tiempos es tal que no se pueden establecer diferencias estadísticas definitivas entre estas dos condiciones en todos los volúmenes evaluados.

La Figura 2.13a muestra el ángulo de contacto inicial de gotas sésiles y verticales con alta concentración de NaCl ( $\phi = 1 \text{ wt } \%$ ), en función del volumen inicial de la gota. Para las gotas sésiles (símbolos negros), la variabilidad del ángulo de contacto con el volumen es mínima. Es importante destacar que este ángulo de contacto es representativo de toda la interfaz líquido-superficie debido a su simetría.

En contraste, las gotas verticales están sujetas a fuerzas gravitacionales asimétricas, por lo que es necesario estimar el ángulo de contacto tanto en la parte superior como en la inferior. El ángulo de contacto superior (símbolos azules) disminuye significativa-

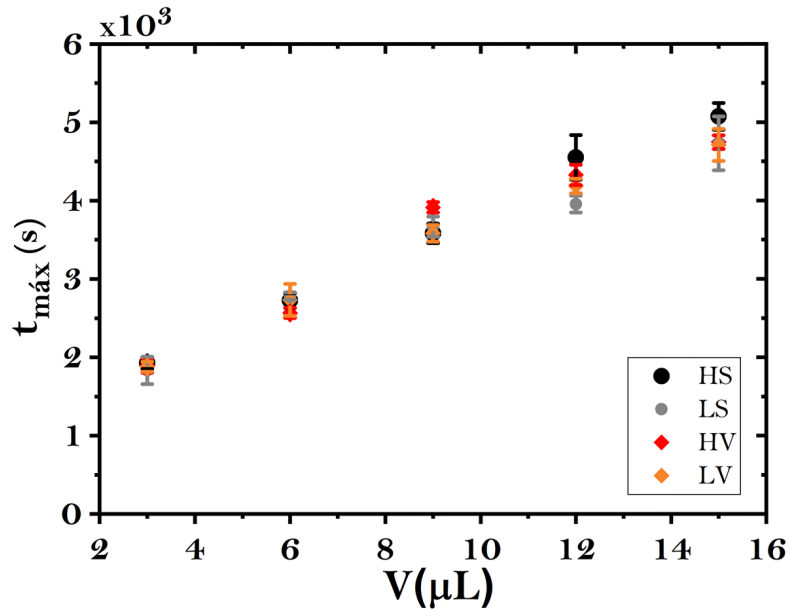


Figura 2.12: **Tiempo total de secado ( $t_{max}(s)$ ) en gotas con diferente volumen, concentración y configuración.** El gráfico muestra  $t_{max}(s)$  para gotas sésiles (HS en negro para alta concentración de NaCl y LS en gris para baja concentración de NaCl) y verticales (HV en rojo para alta concentración y LV en naranja para baja concentración), a través de volúmenes de 3, 6, 9, 12 y 15  $\mu\text{L}$ .

mente con el aumento del volumen, hasta aproximadamente 8  $\mu\text{L}$ , antes de estabilizarse. Por otro lado, el ángulo de contacto inferior (símbolos rojos) muestra un comportamiento peculiar: permanece constante independientemente del aumento en el volumen. Este comportamiento contradice la suposición intuitiva de que el ángulo de contacto inferior debería variar debido a la acumulación de líquido en la base de la gota (un efecto inducido por la gravedad).

La explicación de esta invariabilidad podría estar relacionada con una elongación vertical de la gota, orientada hacia la fuerza gravitacional. A medida que aumenta el volumen de la gota, esta elongación podría equilibrar la distribución del peso, resultando en una compensación que estabiliza el ángulo de contacto inferior. En otras palabras, el incremento en la longitud de la gota actuaría como un mecanismo compensatorio, redistribuyendo la tensión superficial de manera que contrarresta las fuerzas gravitacionales y mantiene constante el ángulo de contacto en la base.

En la figura 2.13b confirma que, incluso con baja concentración de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %), las gotas verticales de proteína muestran un comportamiento similar del ángulo de contacto, lo que indica que la presencia de sal a esta concentración no ejerce una influencia significativa en las dinámicas de humectación y secado.

El comportamiento del ángulo de contacto inicial, tanto en la parte superior como inferior de las gotas verticales, es crucial para las diferencias en las dinámicas de evaporación y en la formación de patrones resultantes. En particular, las variaciones del ángulo de

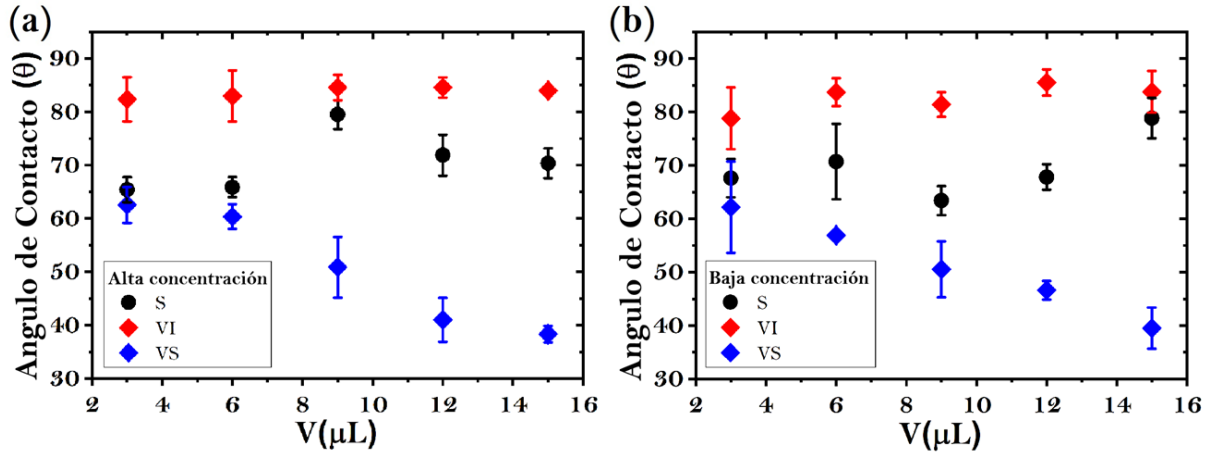


Figura 2.13: **Ángulo de contacto inicial en gotas sésiles y verticales.** (a) Ángulo de contacto inicial en gotas con alta concentración de NaCl ( $\phi = 1 \text{ wt } \%$ ). (b) Ángulo de contacto inicial en gotas con baja concentración de NaCl ( $\phi = 0.1 \text{ wt } \%$ ). S, VI y VS representan los ángulos de contacto de gotas sésiles (negro), y el ángulo de contacto superior (azul) e inferior (rojo) de gotas verticales, respectivamente.

contacto entre la parte superior e inferior de la gota, inducidas por la gravedad, afectan directamente el flujo de solutos y las tasas de evaporación en diferentes regiones de la gota. Como se muestra en las Figuras 2.5, 2.8 y 2.9, un ángulo de contacto más pronunciado en la parte superior de la gota favorece una evaporación más rápida en esa región, lo que conduce a una nucleación anisotrópica y un crecimiento acelerado de cristales. En contraste, un ángulo de contacto más consistente en la base de la gota permite una acumulación gradual de solutos, lo que resulta en una evaporación más lenta y la formación de estructuras cristalinas más compactas y homogéneas en el fondo del depósito.

La Figura 2.13 demuestra que el ángulo de contacto inicial tiene un impacto decisivo en la distribución de solutos y en los patrones de cristalización formados, especialmente en configuraciones verticales donde la gravedad altera la simetría de la gota.

Finalmente, exploramos cómo las variaciones en la concentración de NaCl y la BSA en estado desnaturado modulan la formación de patrones de deposición en gotas verticales.

## Patrones en gotas verticales secas de proteína desnaturada

En condiciones de alta concentración de NaCl (Figura 2.14, Panel I), el depósito se caracteriza por regiones de alta opacidad, donde predominan los agregados amorfos de proteínas desnaturadas. Estas regiones carecen de la organización cristalina observada en el estado nativo, lo que sugiere una nucleación desordenada y un crecimiento limitado debido a la pérdida de interacciones específicas entre las proteínas y los iones. Las estructuras que logran formarse presentan bordes difusos y una distribución irregular, reflejando una disminución en la movilidad molecular y una mayor viscosidad en las últimas etapas del secado. En el caso de baja concentración de NaCl (Figura 2.14, Panel II), los

patrones son aún menos definidos, con una morfología dominada por depósitos amorfos y ausencia casi total de estructuras cristalinas. Esto indica que la combinación de proteínas desnaturalizadas y bajas concentraciones de iones resulta en una dinámica de evaporación y deposición dominada por interacciones débiles y gradientes de concentración menos pronunciados.

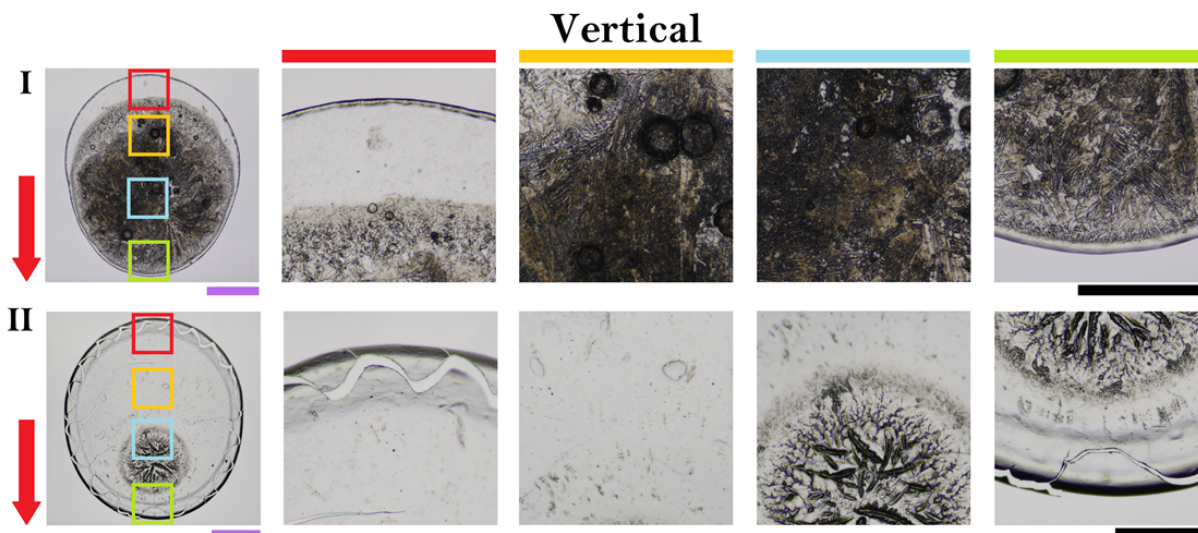


Figura 2.14: **Patrones en depósitos de gotas verticales con proteína desnaturalizada.** El Panel I muestra un depósito a alta concentración de NaCl ( $\phi = 1$  wt %), caracterizado por regiones opacas con agregados amorfos y estructuras de bordes difusos. El Panel II ilustra un depósito a baja concentración de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %), con morfologías amorfas y ausencia de estructuras cristalinas. Las gotas tenían un volumen de  $6 \mu\text{L}$ . Las barras de color rojo, amarillo, azul y verde indican regiones marcadas por los recuadros de colores respectivos. Las líneas moradas representan una escala de 1 mm, mientras que las líneas negras denotan 0.5 mm. Las flechas rojas indican la orientación de la gravedad.

## Dinámica de formación de cristales en gotas verticales con proteína desnaturalizada

La Figura 2.15 muestra dos secuencias de fotografías que documentan el proceso de evaporación de gotas de proteínas en estado desnaturalizado, diferenciadas por alta y baja concentración de NaCl, y organizadas cronológicamente según el tiempo de secado. En el panel I, correspondiente a alta concentración de NaCl ( $\phi = 1$  wt %), la gota presenta al inicio ( $t = 0$  s) una forma regular con bordes bien definidos. Conforme avanza el proceso de evaporación ( $t = 1950$  s a  $t = 2130$  s), se observa una contracción progresiva del volumen de la gota, manteniéndose una distribución aparentemente uniforme en las primeras etapas. Sin embargo, hacia los últimos tiempos de secado ( $t = 2610$  s a  $t = 2820$  s), emergen patrones caracterizados por estructuras cristalinas anisotrópicas, con dendritas claramente visibles que se orientan hacia la dirección de la aceleración gravitacional. En esta etapa, los bordes del depósito exhiben grietas radiales que sugieren tensiones internas, probablemente

generadas por un gradiente de concentración de soluto y una dinámica de evaporación diferencial entre el centro y la periferia.

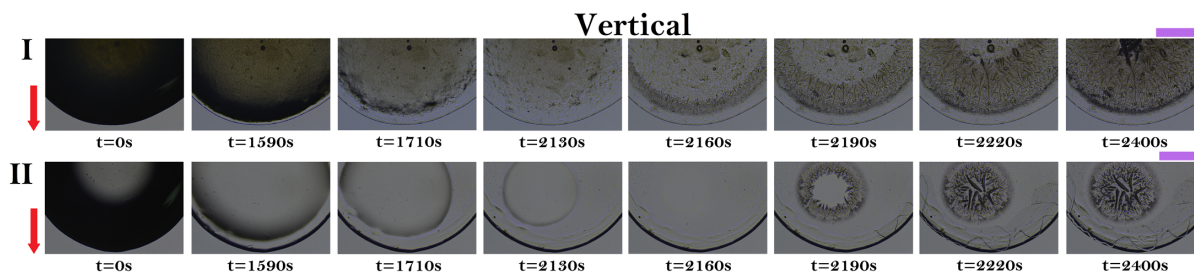


Figura 2.15: **Proceso de formación de patrones en gotas verticales de proteína desnaturizada.** Panel I: Dinámica de secado de una gota vertical con proteína en estado desnaturizado y 1 wt % de NaCl. Panel II: Dinámica de secado de una gota vertical con proteína desnaturizada y 0.1 wt % de NaCl. El volumen de las gotas fue de  $6 \mu\text{L}$ . Las líneas moradas indican 1 mm y las flechas rojas indican la orientación de la gravedad.

En el panel II de la Figura 2.15, correspondiente a baja concentración de NaCl, el comportamiento de la gota desnaturizada difiere significativamente. Desde los primeros instantes ( $t = 0 \text{ s}$ ), la gota muestra una menor opacidad y una apariencia más uniforme en comparación con la de alta concentración. A medida que avanza el proceso de evaporación ( $t = 1590 \text{ s}$  a  $t = 2130 \text{ s}$ ), se perciben cambios sutiles en la distribución del material, siendo menos evidentes las estructuras cristalinas. En los tiempos finales ( $t = 2190 \text{ s}$  a  $t = 2400 \text{ s}$ ), los patrones que emergen están dominados por agregados amorfos, con una organización menos definida y homogénea en toda la superficie del depósito. En esta condición, la falta de dendritas y la aparición de estructuras difusas reflejan un proceso de nucleación desordenado, resultado de una baja supersaturación y de interacciones más débiles entre las proteínas y los iones.

## 2.5. Discusión

Este estudio detalla las dinámicas de secado y la formación de patrones en gotas de soluciones de proteínas y NaCl, destacando la influencia de la concentración de solutos, la gravedad y la orientación del sustrato, factores que desempeñan roles cruciales en la dinámica de formación de patrones en sistemas de evaporación controlada [86, 56].

El estudio revela que la cristalización impulsada por la gravedad en gotas orientadas verticalmente afecta significativamente tanto el efecto de anillo de café como la cinética de cristalización. Las soluciones con alta concentración de NaCl tienden a mostrar depósitos más pronunciados en los lados y en la base de las gotas verticales, un fenómeno atribuible al drenaje gravitacional y la redistribución de solutos. En concentraciones más bajas de NaCl, la redistribución inducida por la gravedad se vuelve más evidente, lo que sugiere un impacto adicional de los gradientes de concentración en la dinámica de cristalización.

De manera consistente con nuestros resultados, otros estudios sobre gotas coloidales inclinadas han demostrado que la inclinación induce patrones de deposición asimétricos debido a la sedimentación gravitacional y al flujo capilar, con depósitos que se concentran en las regiones inferiores de las gotas [56, 87, 86].

La orientación y la influencia de la gravedad en la evaporación de gotas sirven como herramientas efectivas para controlar tanto la distribución de solutos como la morfología cristalina resultante. Esta capacidad para manipular la morfología de los depósitos en superficies verticales puede aprovecharse para diseñar recubrimientos con propiedades específicas, como una mayor resistencia a la corrosión, lo que resulta particularmente valioso en la ingeniería de recubrimientos. Además, la modulación de los patrones formados a partir de la evaporación de soluciones de proteínas podría desempeñar un papel crítico en técnicas como la espectroscopía Raman por deposición de gotas (DCDR), donde la pre-concentración de analitos es esencial, especialmente cuando el analito o la proteína están presentes en concentraciones muy bajas y volúmenes reducidos.

Asimismo, la formación de patrones en gotas verticales exhibe variaciones en la cinética de cristalización a lo largo del eje vertical debido a las diferencias en la tasa de evaporación. Esto da lugar a cristales más definidos y complejos en la parte superior, donde la evaporación es más rápida y la concentración de solutos es menor. En contraste, las regiones inferiores, con mayor acumulación de solutos debido a la gravedad, muestran estructuras cristalinas menos definidas y más compactas. Este fenómeno ilustra cómo la gravedad no solo afecta la acumulación de solutos, sino que también modula las dinámicas de cristalización, lo que lleva a una heterogeneidad en la morfología cristalina. Este control sobre los patrones de cristalización puede explotarse para aplicaciones específicas, incluyendo la biofabricación y la ingeniería de materiales funcionales.

La formación de patrones en depósitos de gotas verticales de BSA y NaCl ofrece utilidad práctica en el diseño de biosensores al permitir una concentración localizada de proteínas en una superficie. Este control preciso sobre la distribución de proteínas puede mejorar significativamente la sensibilidad en la detección de sus estados conformacionales. Además, estos resultados son esenciales para optimizar la agregación de proteínas en la fabricación de películas, permitiendo un control más preciso de su funcionalidad. La manipulación de la estructura de estos depósitos también abre la posibilidad de adaptar propiedades materiales, como la adhesión celular dirigida.

Futuras investigaciones podrían explorar cómo las variaciones en la temperatura ambiental, la humedad relativa y el tipo de sustrato impactan la formación de patrones en estas configuraciones verticales, considerando que estos factores pueden influir sustancialmente en la tasa de evaporación y, por ende, en la dinámica de formación de cristales. Por último, sería relevante estudiar la interacción entre diferentes tipos de proteínas y sales en configuraciones verticales, para observar cómo las interacciones moleculares específicas afectan la formación de patrones. Esto podría llevar a la personalización de recubrimientos y a la optimización de procesos en las industrias biotecnológica y alimentaria, donde el control preciso de la morfología a nivel microscópico es crucial.

## 2.6. Conclusiones

En este estudio, exploramos cómo la orientación vertical afecta la formación de patrones y la distribución de solutos durante la evaporación de gotas que contienen albúmina de suero bovino (BSA) y cloruro de sodio (NaCl), con un enfoque particular en cómo estas características varían en un amplio rango de volúmenes iniciales de gotas. Los resultados revelan que la orientación vertical induce un gradiente marcado en la distribución de solutos a lo largo de la gota, lo que resulta en una morfología cristalina distinta entre las partes superior e inferior del depósito. En la parte superior del depósito, la formación acelerada de estructuras dendríticas se observa de manera consistente en todos los volúmenes probados, atribuida a altas tasas de evaporación que promueven una rápida sobresaturación local, facilitando así la nucleación rápida y el crecimiento predominantemente anisotrópico de cristales. Este fenómeno permanece constante independientemente del volumen inicial de la gota, lo que subraya la solidez del efecto de la orientación vertical en la dinámica de evaporación y cristalización. Por el contrario, las regiones inferiores del depósito muestran un crecimiento de cristales más homogéneo y controlado, con cristales más compactos y uniformes, indicativo de una tasa de evaporación más lenta y una acumulación gradual de solutos. Sorprendentemente, los patrones que se alinean con la dirección de la gravedad se manifiestan de manera consistente en distintos volúmenes de gotas y concentraciones de NaCl, lo que resalta la capacidad predecible de esta fuerza para modular las condiciones de crecimiento cristalino en una amplia variedad de condiciones experimentales. El estudio también muestra que la cristalización impulsada por la gravedad en gotas orientadas verticalmente afecta significativamente tanto el efecto de anillo de café como la cinética de cristalización, y que las concentraciones más altas de NaCl reducen el espesor del anillo de café debido al drenaje gravitacional.

En general, nuestros resultados resaltan el potencial de manipular las condiciones experimentales para influir en la cinética de la formación de patrones en los biofluidos, allanando el camino para futuras investigaciones que exploren aplicaciones específicas de estos fenómenos.

# Capítulo 3

## Patrones de Gotas Secas como Indicadores de Estados Conformationales de Proteínas de BSA

### 3.1. Resumen

La investigación de la formación de patrones en depósitos de gotas secas de proteínas es clave para el desarrollo de superficies funcionales y mejoradas propiedades de humectabilidad. Estudiamos la formación de patrones en depósitos de gotas secas de soluciones proteicas con diferentes concentraciones de NaCl (1 wt % y 0.1 wt %). Las soluciones fueron sometidas previamente a tratamientos térmicos intermitentes de diversas duraciones (1, 2, 4, 6 y 12 minutos) y ciclos de calentamiento (12, 6, 3, 2, y 1). Los cambios conformationales en las proteínas se estimaron con espectroscopia de UV-VIS. Se emplearon técnicas de microfotografía para analizar la morfología de los depósitos y se midió la entropía configuracional para evaluar la complejidad estructural resultante. Los resultados mostraron que las proteínas en estado nativo producen patrones típicos de “anillo de café” con cristales distribuidos en todo el depósito. Sin embargo, los tratamientos térmicos alteraron el estado configuracional de la BSA, generando patrones completamente distintos para cada solución, lo que se generó cambios en la Entropía. Las curvas ROC y el área bajo la curva (AUC) demostraron que el análisis de patrones en gotas secas puede distinguir eficazmente entre diferentes estados conformationales de proteínas, con alta sensibilidad y especificidad. La microscopía óptica y el perfil de altura normalizado de la gota revelan que, durante la evaporación, especialmente en gotas de soluciones sometidas a tratamientos térmicos, se produce una contracción radial de la línea de contacto. Esta contracción concentra los solutos en el centro, facilitando así la nucleación y formación de agregados que dan origen al patrón de ojo. Los resultados proporcionan una base sólida para el diseño de superficies funcionales y la optimización de propiedades de humectabilidad, con implicaciones relevantes en biotecnología y ciencia de materiales.

## 3.2. Introducción

La agregación de proteínas en interfaces puede alterar de manera significativa las propiedades estructurales y dinámicas de los biopolímeros, modificando su estabilidad, flexibilidad y capacidad de interacción [88, 89]. Estas alteraciones, a su vez, impactan en las funciones biológicas de los biopolímeros, afectando procesos clave como la señalización celular, la catálisis enzimática y la formación de materiales biológicos. Las interacciones en interfaces, tales como sólido-líquido (SLI), aire-agua (AWI) y líquido-líquido (LLI), desempeñan un papel crítico en la nucleación y la cinética de la agregación proteica, induciendo configuraciones estructurales específicas que no se presentan en soluciones homogéneas [88, 90]. Estos entornos interfaciales restringen la movilidad y promueven contactos anisotrópicos, influyendo en el ensamblaje supramolecular de las proteínas, lo que altera su conformación nativa y, por ende, su funcionalidad biológica. En estas interfaces, las proteínas pueden experimentar transiciones de fase que favorecen la formación de películas estructuradas, caracterizados por la disposición ordenada en láminas beta, un fenómeno comúnmente observado en interfaces aire-agua (AWI) [91, 92]. Las configuraciones supramoleculares resultantes son altamente dependientes de las propiedades interfaciales, que dirigen el ensamblaje proteico hacia estados agregados con características mecánicas y funcionales distintivas [93, 94]. Estas nano-películas, formados a través de mecanismos de agregación similares a los amiloides, presentan un gran potencial en aplicaciones biomédicas debido a su capacidad para adherirse de manera estable a diversas superficies y resistir condiciones extremas de pH y solventes orgánicos [95].

El recocido térmico, un proceso fundamental en la ciencia de los materiales, consiste en el calentamiento controlado de un material a una temperatura específica, seguido de un enfriamiento gradual, permitiendo a los átomos o moléculas superar barreras energéticas y reconfigurarse en estados más estables y menos defectuosos. Este proceso induce cambios estructurales significativos que modulan las propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas del material, tales como la reducción de dislocaciones, eliminación de defectos cristalinos y la promoción de recristalización en granos más grandes y uniformes, optimizando así la resistencia y minimizando la propagación de grietas, lo cual es esencial en aplicaciones que requieren alta robustez y estabilidad estructural [96]. La reorganización estructural de proteínas y macromoléculas durante el tratamiento térmico comparte principios fundamentales con el recocido térmico de materiales [97, 98]. Las proteínas, al someterse a un tratamiento térmico, pueden experimentar desnaturalización y renaturalización, donde sus cadenas polipeptídicas exploran configuraciones energéticamente favorables [39, 99]. Este proceso implica la superación de barreras conformacionales y la posibilidad de replegarse en estructuras secundarias y terciarias más estables, o en casos extremos, la agregación en estados amorfos o fibrilares, como en la formación de agregados tipo amiloide [100, 101].

Numerosos estudios han investigado la formación de patrones en gotas secas de soluciones proteicas, mostrando que factores como la concentración y composición proteica, así como las interacciones entre proteínas, solutos y solventes son factores determinantes en la producción de estructuras, tales como anillos de café, redes fractales y agregados fibrilares [8, 11, 25, 21, 102]. La evaporación de gotas con soluciones proteicas generalmente crea

revestimientos uniformes con patrones variables según la concentración y el tamaño de gota [103, 104]. Mezclar proteínas puede generar patrones fractales en depósitos uniformes [80]. Sett et al. [105] destaca que la interacción de proteínas con micro y nanopartículas produce una acumulación de material en los bordes que induce cambios morfológicos en el anillo de café.

De manera similar, la interacción de proteínas con cristales líquidos da lugar a patrones de grietas más complejas en los bordes de las gotas [106, 107]. Las sales en una solución proteica determinan la diversidad estructural en el interior de los depósitos [25, 108, 109]. La formación de un patrón “ojo de café” resulta de la transformación conformacional irreversible de proteínas en sustratos calentados por arriba de su transición de fase [24]. El estrés térmico tiene un impacto significativo en la formación de patrones de grietas en gotas secas de proteínas, intensificando la formación de anillos concéntricos, redes fractales y grietas irregulares [110, 9]. Los patrones de grietas observados en gotas secas de soluciones proteicas proporcionan información valiosa sobre las dinámicas de secado y las propiedades mecánicas de las proteínas [12]. Se ha observado también una transición morfológica con cambios en las concentraciones proteicas, destacándose la aparición de patrones únicos como el “hoyuelo”, que es altamente dependiente de la concentración inicial de la solución [103]. Altas concentraciones proteicas forman patrones denominados “daisy”, mientras que a bajas concentraciones se desarrollan patrones de “anillo ondulado” en las gotas secas [111].

Las técnicas de procesamiento de imágenes han demostrado ser herramientas valiosas para analizar los cambios en la agregación de extracto de “*Viscum album*” en recubrimientos generados por la evaporación de gotas [112, 113]. Las herramientas de análisis de imagen no solo permiten visualizar la evolución de los patrones, sino que también permiten explorar indirectamente en los componentes de una solución, proporcionando información crucial sobre la estabilidad estructural y la funcionalidad de las proteínas [8]. En un estudio con lisozima, se utilizó un algoritmo de reconocimiento de patrones que identificó variaciones en la concentración de la solución, sugiriendo que estos patrones podrían actuar como una “huella dactilar” [114]. El análisis de la matriz de coocurrencia de niveles de gris (GLCM, por sus siglas en inglés) ha permitido analizar cambios en la agregación de partículas de proteínas a diferentes concentraciones salinas [115, 10] y detectar altos niveles de colesterol en sangre [27]. La GLCM evalúa la textura de un objeto mediante el análisis de la distribución espacial de las intensidades de los píxeles dentro de una región de interés. Los parámetros de la GLCM sirven principalmente como índices que cuantifican la frecuencia de combinaciones específicas de niveles de gris en una imagen [116].

La morfología final de los patrones en depósitos secos resulta de la interacción compleja entre los procesos de transporte de masa y agregación. Durante el secado de gotas, se desarrollan dos flujos principales en su interior [15, 62]. Los flujos capilares, inducidos por gradientes de presión derivados de la curvatura de la interfaz líquido-aire, dirigen el movimiento del solvente hacia los bordes de la gota. En soluciones coloidales, este flujo radial favorece la acumulación de partículas en la periferia, lo que da lugar al característico “anillo de café”, un fenómeno ampliamente reconocido que se observa durante la evaporación de las gotas [63, 64, 65]. Sin embargo, la formación de este patrón puede verse alterada por los flujos de Marangoni, que se generan a partir de gradientes de tensión superficial debido a variaciones en la temperatura o la composición a lo largo de la superficie de la gota. Estos

flujos de Marangoni producen un movimiento en sentido contrario al flujo capilar, lo que puede inhibir o modificar significativamente la formación del anillo de café [66, 67, 68]. Comprender la interacción entre estos flujos es esencial para predecir y controlar la morfología de los patrones en depósitos secos, especialmente en sistemas coloidales, donde estos patrones pueden tener aplicaciones cruciales en la detección y control de calidad.

A pesar de los avances significativos en el estudio de la formación de patrones en gotas secas de soluciones proteicas, aún se entiende poco cómo los recocidos térmicos aplicados a las proteínas afectan la configuración final de estos patrones. El control sobre los patrones influenciados por el recocido térmico de proteínas podría abrir nuevas oportunidades para el diseño de materiales biomédicos y aplicaciones en la ciencia de materiales, su estabilidad, flexibilidad y capacidad de interacción de los agregados proteicos son cruciales.

En este capítulo, exploramos cómo los tratamientos térmicos intermitentes afectan la conformación y el ensamblaje supramolecular de la BSA, analizando la formación de patrones en gotas secas de soluciones proteicas con diferentes concentraciones de NaCl. A través del uso de técnicas de microfotografía y la evaluación de la entropía configuracional, investigamos cómo las variaciones en los ciclos y la duración de los recocidos térmicos modifican las morfologías resultantes y la distribución de solutos dentro de los depósitos. Nuestro enfoque permite evaluar la sensibilidad y especificidad de los patrones como indicadores de estados conformacionales de proteínas, proporcionando nuevas perspectivas sobre la manipulación térmica de proteínas para aplicaciones avanzadas en biotecnología y ciencia de materiales. Los resultados presentados en este trabajo no solo contribuyen a una comprensión más profunda de la relación entre el tratamiento térmico y la formación de patrones, sino que también abren la puerta a estrategias innovadoras para el diseño de superficies funcionales basadas en la manipulación de las propiedades conformacionales de proteínas.

## 3.3. Metodología específica

### 3.3.1. Tratamiento térmico

Se realizaron cinco tratamientos térmicos con diferentes duraciones (1, 2, 4, 6 y 12 minutos) y ciclos de calentamiento (12, 6, 3, 2 y 1) para evaluar el efecto del estrés térmico en las soluciones. Las muestras se colocaron en un Mini Dry Bath Incubator (TC0401005) a una temperatura constante de 90°C. Después de cada exposición térmica, las muestras se dejaron equilibrar térmicamente a temperatura ambiente durante 20 minutos (ver Figura 3.1).

La Solución 1 (1x12 min) se calentó una única vez durante 12 minutos, seguida de un período de termalización de 20 minutos. La Solución 2 (2x6 min) se sometió a dos períodos de calentamiento de 6 minutos cada uno. La Solución 3 (3x4 min) fue expuesta a tres intervalos, cada uno de 4 minutos. Para la Solución 4 (6x2 min), se aplicaron seis sesiones de calentamiento de 2 minutos, mientras que la Solución 5 (12x1 min) fue sometida a doce ciclos de calentamiento de 1 minuto. Este procedimiento se llevó a cabo tanto para soluciones con alta como baja concentraciones de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt % y 1 wt %, respectivamente). Cabe destacar que el tiempo total de exposición térmica fue de 12 minutos para todas las muestras. Posteriormente, las muestras desnaturalizadas fueron depositadas.

### 3.3.2. Evaporación de gotas

Se depositó una gota de 6  $\mu$ L de BSA con una micropipeta sobre un portaobjetos de acrílico, previamente montado en nuestro arreglo experimental (ver Figura 1.1). Para evaluar la reproducibilidad de los patrones, se depositó una segunda gota en el mismo portaobjetos. El proceso de evaporación se llevó a cabo bajo condiciones controladas de temperatura (entre 21°C y 25°C) y humedad relativa (30-35%), ambas monitorizadas con un sensor Xiaomi NUN4126GL.

### 3.3.3. Análisis de imágenes

#### Matriz de Coocurrencia de Niveles de Gris (GLCM)

La Matriz de Co-ocurrencia de Nivel de Gris (GLCM, por sus siglas en inglés) es una matriz de dimensiones  $N_g \times N_g$ , donde  $N_g$  representa el número de niveles de gris en una imagen. Este análisis permite cuantificar las relaciones espaciales entre los niveles de gris de los píxeles, considerando una distancia  $d$  y un ángulo  $\phi$  específicos.

La probabilidad de co-ocurrencia entre dos niveles de gris,  $i$  y  $j$ , se define matemáticamente como:

$$p(i, j) = \frac{C(i, j)}{\sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} C(i, j)}, \quad (3.1)$$

donde  $C(i, j)$  es la frecuencia con la que el par  $(i, j)$  aparece en una ventana definida por los parámetros  $(d, \phi)$ . El denominador corresponde al total de pares posibles de niveles de gris  $(i, j)$  dentro de la ventana, con un límite superior de  $N_g \times N_g$ .

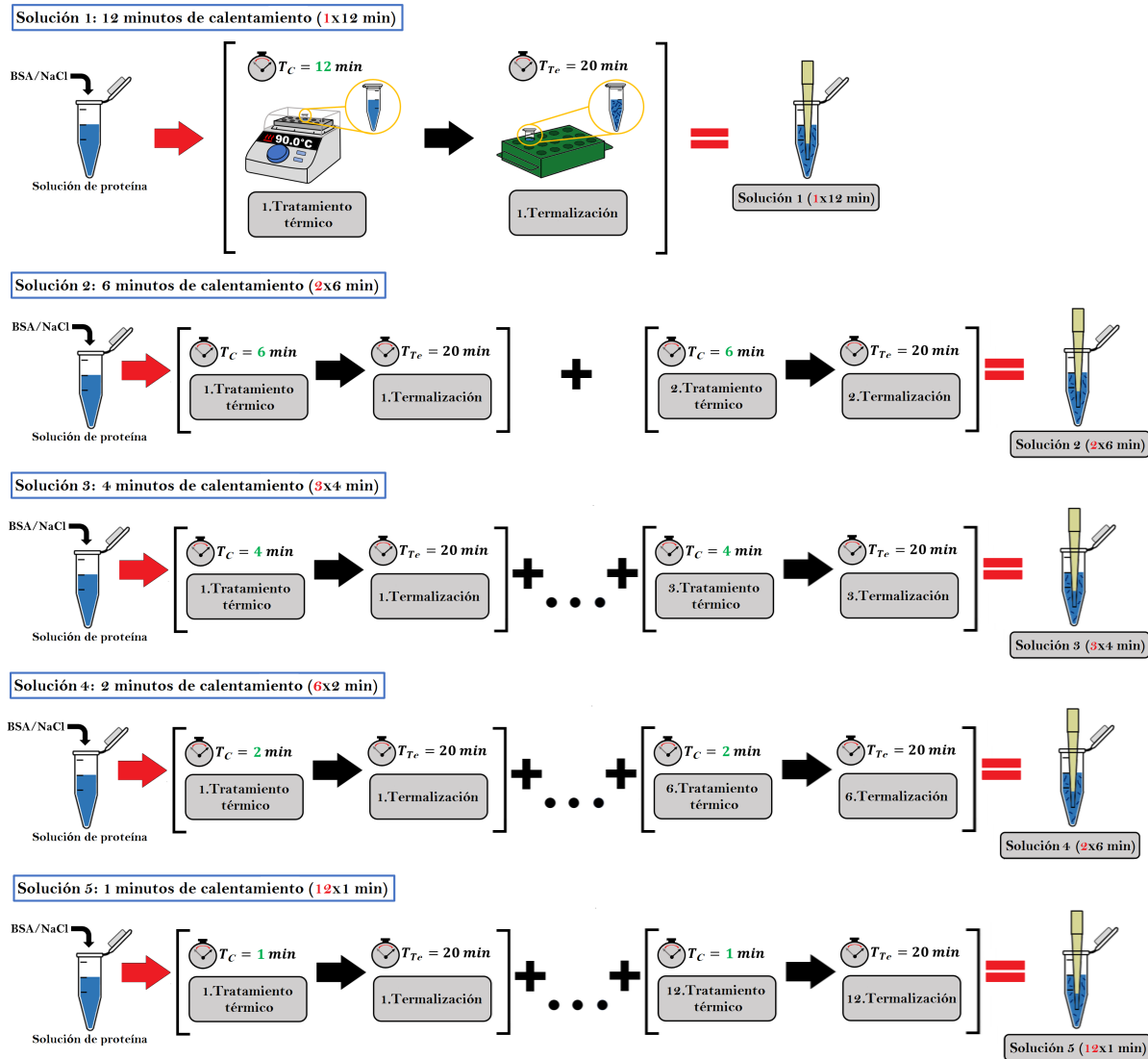


Figura 3.1: Representación esquemática del proceso de recocido térmico. Las muestras se sometieron a diferentes duraciones (1, 2, 4, 6 y 12 minutos) y ciclos (12, 6, 3, 2 y 1) a 90°C. Este procedimiento se realizó tanto para soluciones con alta y baja concentración de NaCl. El tiempo total de exposición térmica fue de 12 minutos para todas las soluciones.

A partir de  $p(i, j)$ , se pueden calcular métricas estadísticas fundamentales como la media ( $u$ ) y la desviación estándar ( $\sigma$ ) para las columnas y filas de la matriz:

$$u_x = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} i \cdot p(i, j), \quad u_y = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} j \cdot p(i, j), \quad (3.2)$$

$$\sigma_x = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} (i - u_x)^2 \cdot p(i, j), \quad \sigma_y = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} (j - u_y)^2 \cdot p(i, j), \quad (3.3)$$

Una métrica clave derivada de la GLCM es la Entropía configuracional, que cuantifica la complejidad de la textura en función de la distribución de las probabilidades:

$$H = - \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} p(i, j) \log(p(i, j)). \quad (3.4)$$

Valores altos de entropía están asociados con regiones de textura heterogénea, mientras que valores bajos indican áreas homogéneas. Estas propiedades hacen de la GLCM una herramienta estadística poderosa que ha demostrado su efectividad en la caracterización de patrones complejos, como películas de proteínas con grietas [106, 117], cristales de sal [10], y aplicaciones prácticas como el diagnóstico médico [27].

### Curva ROC (Característica Operativa del Receptor)

El área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de la Característica Operativa del Receptor es una de las métricas más relevantes para evaluar el desempeño de un modelo de clasificación. Esta medida permite analizar la eficacia de un algoritmo para diferenciar entre dos clases.

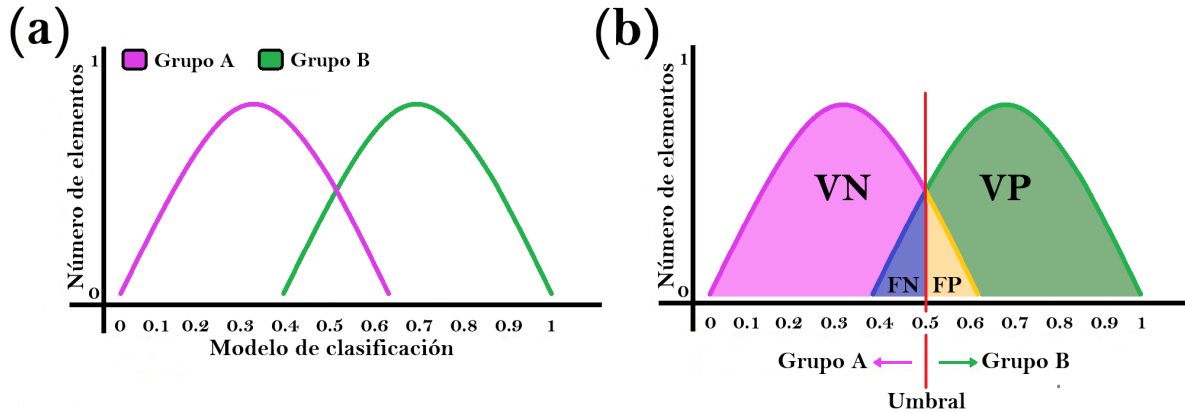


Figura 3.2: **Distribución de clases.** (a) Distribución poblacional en función de una métrica predictiva. (b) Clasificación de resultados mediante un umbral: región violeta corresponde a verdaderos negativos ( $VN$ ), región verde a verdaderos positivos ( $VP$ ), región azul a falsos negativos ( $FN$ ) y región amarilla a falsos positivos ( $FP$ ).

Por ejemplo, en la Figura 3.2a se muestran dos distribuciones correspondientes a cate-

gorías distintas en función de una métrica continua que varía entre 0 y 1. Para clasificar los elementos, es necesario definir un umbral que permita dividir las categorías, asignando los valores por encima del umbral a la clase positiva y los valores por debajo a la clase negativa, como se ilustra en la Figura 3.2b. Los valores clasificados correctamente en la categoría positiva se denominan verdaderos positivos ( $VP$ ), mientras que aquellos clasificados incorrectamente se identifican como falsos positivos ( $FP$ ). De manera análoga, los elementos clasificados correctamente en la categoría negativa corresponden a verdaderos negativos ( $VN$ ) y los incorrectamente clasificados como falsos negativos ( $FN$ ).

La sensibilidad y la especificidad son métricas clave para evaluar el rendimiento del modelo. La sensibilidad mide la proporción de elementos correctamente identificados como positivos respecto al total de elementos positivos:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}. \quad (3.5)$$

Por otro lado, la especificidad evalúa la proporción de elementos correctamente identificados como negativos respecto al total de elementos negativos:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}. \quad (3.6)$$

La curva ROC se construye graficando la sensibilidad frente a "1-especificidad", como se observa en la Figura 3.3b. La relación entre estas métricas se define como:

$$1 - \text{Especificidad} = \frac{FP}{VN + FP}. \quad (3.7)$$

Por lo tanto, mientras la especificidad mide la tasa de verdaderos negativos, "1-especificidad" mide la tasa de falsos positivos. La curva ROC describe cómo varía la sensibilidad en función de la tasa de falsos positivos (ver Figura 3.3).

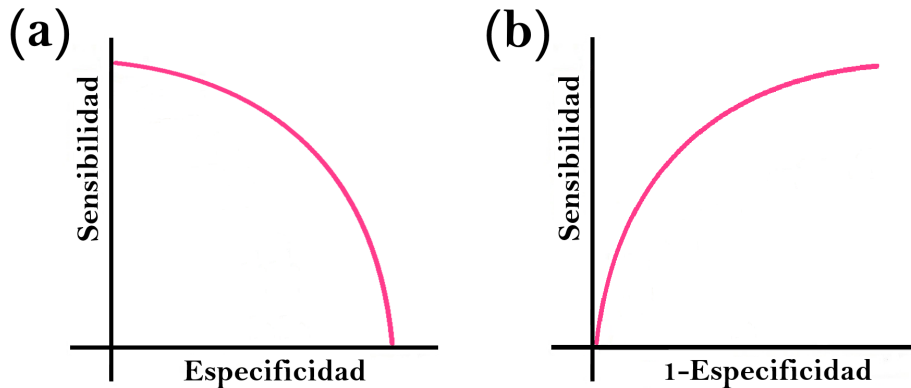


Figura 3.3: **Relación entre sensibilidad y especificidad.** (a) Sensibilidad en función de la especificidad. (b) Sensibilidad en función de "1-especificidad".

Un AUC de 1 representa una clasificación ideal, mientras que un AUC de 0.5 indica un rendimiento equivalente a una selección aleatoria. La Figura 3.4 ilustra ejemplos de curvas ROC correspondientes a los valores de AUC.

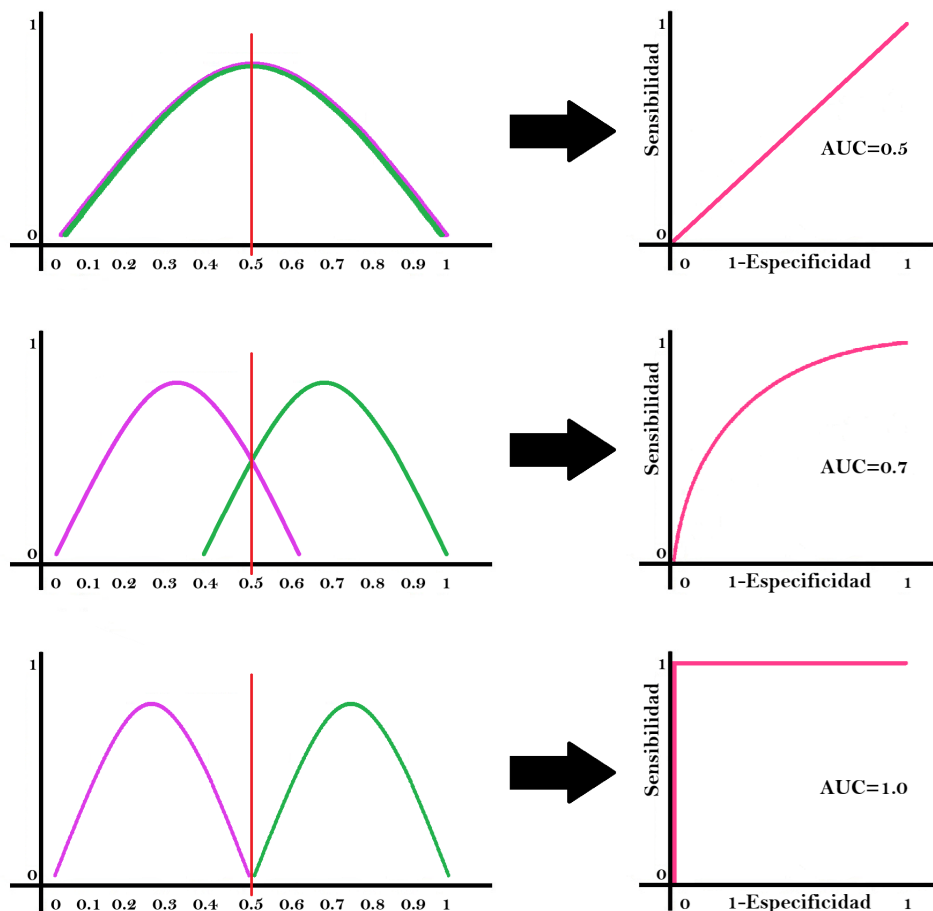


Figura 3.4: **Curvas ROC.** Desempeño mediante la sensibilidad y especificidad.

### 3.3.4. Análisis de cambios conformacionales mediante espectroscopia UV-Vis

Para la corrección de la línea base en los espectros UV-Vis, primero se importaron los datos desde un archivo Excel que contenía las intensidades de absorción registradas para diferentes longitudes de onda en soluciones de BSA y NaCl en estado Nativo y sometidas a tratamientos térmicos de 1x12, 6x2, 3x4, 2x6 y 1x12 minutos.

Se realizó una visualización inicial de los espectros para identificar posibles desplazamientos en la línea base, los cuales podrían interferir en la comparación precisa entre los tratamientos. Esta inspección reveló la necesidad de ajustar la línea base a cero, eliminando así las posibles contribuciones de artefactos experimentales o ruido instrumental. La corrección de la línea base se llevó a cabo identificando, para cada espectro, el valor mínimo de intensidad de absorción. Este mínimo se restó de todos los puntos de datos correspondientes a ese espectro, asegurando que todas las curvas compartieran una línea base común en las regiones donde no se espera absorción significativa. Este procedimiento permitió resaltar exclusivamente los cambios intrínsecos en la absorción, atribuidos a las modificaciones conformacionales de la BSA bajo las distintas condiciones térmicas.

### 3.4. Resultados

#### Patrones en gotas secas de proteína bajo tratamientos térmicos

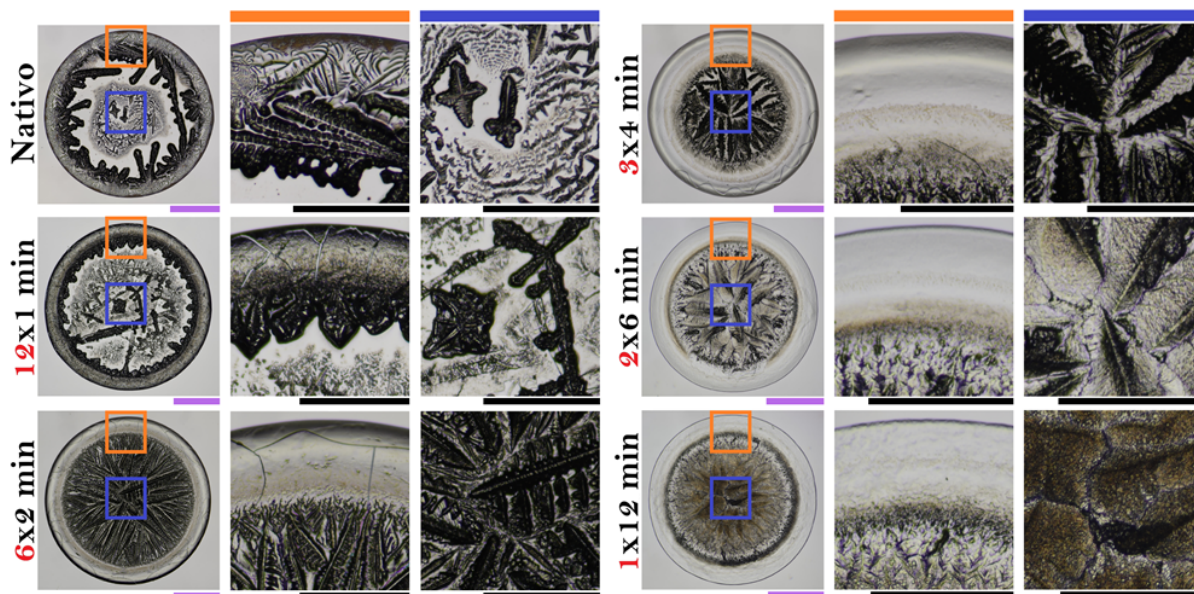


Figura 3.5: **Patrones en gotas secas de soluciones de proteína-NaCl ( $\phi = 1$  wt %) bajo ciclos térmicos.** Columnas a la izquierda: La fila “Nativo” muestra la cristalización de una gota sin tratamiento térmico, destacando la complejidad y simetría radial del depósito. Filas 12×1 min y 6×2 min, presentan patrones más complejos en los bordes de los depósitos, tras someterse a tratamientos térmicos de baja frecuencia pero mayor duración. Los números en rojo indican la cantidad de ciclos térmicos, mientras que los números en negro corresponden a la duración del calentamiento. Columnas de la derecha: 3×4 min, 2×6 min y 1×12 min muestran tratamientos con menor frecuencia pero mayor duración por ciclo. Aquí, los patrones cristalinos muestran un crecimiento más controlado y orientado. Las barras codificadas por colores (naranja y azul) indican las regiones marcadas con colores correspondientes dentro de las gotas. Las barras moradas y negras representan escalas de 1 mm y 0.5 mm, respectivamente.

La Figura 3.5 muestra una serie de microfotografías de los patrones formados en gotas secas de una solución proteica con NaCl = 1 wt %, cada una generada con diferentes tratamientos térmicos. Depósitos con proteínas nativas sin calentamiento (Nativo), muestran una estructura bien definida de “anillo de café” con cristales en forma de aguja distribuidos radialmente desde el borde hacia el centro. El recuadro naranja indica que en el anillo de café emergen pequeñas estructuras arbolescentes cristalinas. En el cuadro azul, se indica la presencia de crucetas con helechos y estructuras festoneadas entrelazadas (scalloped) en la región central. Las gotas secas de proteínas con calentamientos intermitentes de 1 minuto muestran que la estructura del anillo de café se mantiene, pero en los bordes surgen estacas de cristal en forma de prisma. El recuadro naranja muestra que el anillo de café tiene un aspecto rugoso y presenta pequeñas grietas ensanchadas. En el cuadro azul se aprecian

agujas internas y agregados amorfos que surgen en la región central. Con 2 minutos de tratamiento térmico intermitente, las gotas producen depósitos con un aumento considerable en la densidad de los cristales en la región central, dando el aspecto al característico patrón de ojo con un gran agregado central. El recuadro naranja muestra que el anillo de café contiene pequeñas grietas sin la presencia de pequeños agregados y con un aspecto liso. El recuadro azul indica que el gran agregado en la región central del depósitos está conformado por una alta densidad de cristales en forma de aguja con pequeñas sub-venaciones ortonormales.

Las soluciones con tratamientos térmicos intermitentes de 4 minutos producen gotas secas con el típico patrón de ojo compuesto por cristales que están rodeados de pequeños agregados y una región de aspecto rugoso. El recuadro naranja muestra un anillo de café con aspecto liso y sin agregados, que rodea a una pequeña región de deposición uniforme con pequeños agregados que circundan al agregado de la región central. El recuadro azul muestra una baja densidad de cristales en forma de aguja sin sub-venaciones en la región central. Tratamientos térmicos intermitentes de 6 minutos generan un patrón de ojo sin la aparición del anillo de café. En el recuadro naranja se observa una marcada región de deposición uniforme sin estructuras o grietas. Además, la región rugosa en el centro del depósito es mucho más marcada. En el recuadro azul, observamos una baja densidad de agregados amorfos semejantes a los cristales en forma de aguja. Finalmente, las gotas de proteínas con calentamiento de 12 minutos generan patrones en forma de ojo sin la aparición de cristales ni agregados. La periferia muestra un aspecto altamente rugoso que rodea la estructura fibrosa que forma la región central característica del patrón de ojo (recuadro naranja). Esta región, contiene grietas que emergen desde el centro hacia la periferia, ver recuadro azul.

En la Figura 3.6 se muestran los patrones observados en las gotas secas de una solución proteica con NaCl al 0.1 wt %, generadas bajo diferentes tratamientos térmicos. Los depósitos sin tratamiento térmico exhiben una estructura definida de “anillo de café”, con una periferia clara y una región central homogénea. En el recuadro naranja, se aprecia que el anillo de café tiene un aspecto liso, presenta grietas onduladas y está rodeado por una red densa de cristales prominentes. El recuadro azul revela estructuras dendríticas con pequeñas elevaciones oscuras dispersas, lo que indica una mayor concentración de material. En los depósitos generados con tratamientos térmicos intermitentes de 1 minuto, la estructura del anillo de café persiste, pero sus bordes son difusos, mostrando grietas más gruesas y áreas de textura irregular (ver recuadro naranja). En la región central (recuadro azul), se observan pequeños cristales dispersos en forma de aguja con sub-venaciones.

Con tratamientos térmicos intermitentes de 2 minutos, las gotas producen depósitos con una región central asimétrica y rugosa, rodeada por una zona de deposición uniforme con pequeñas áreas sombreadas. En estos depósitos la línea de contacto no muestra simetría radial. El recuadro naranja muestra grietas prominentes en la periferia y un anillo de café muy difuso. La región rugosa contiene agregados amorfos en forma de dendritas con bordes altamente difusos (recuadro azul). Los depósitos generados con soluciones sometidas a tratamientos térmicos intermitentes de 4 minutos presentan similitudes con los de 2 minutos, pero con un anillo de café que exhibe grietas ensanchadas y pequeñas áreas sombreadas, como se muestra en el recuadro naranja. La región rugosa está compuesta por estructuras dendríticas bien definidas, observables en el recuadro azul. Los tratamientos

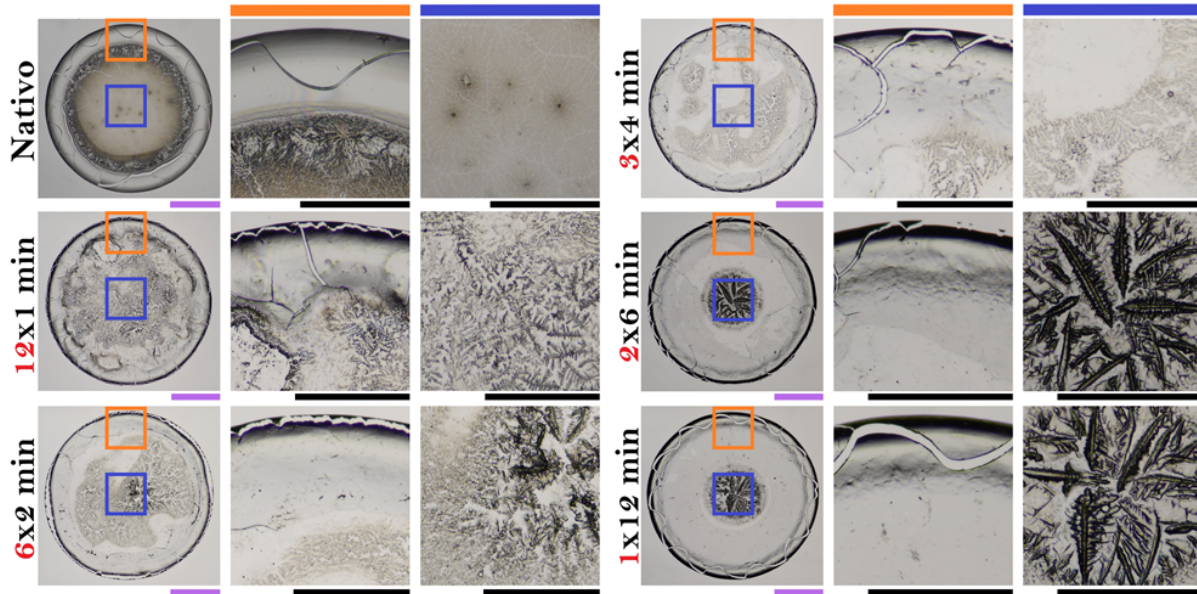


Figura 3.6: **Patrones en gotas secas de soluciones de proteína-NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %) bajo ciclos térmicos.** Columna a la izquierda: La fila “Nativo” ilustra un pronunciado efecto de anillo de café en una gota de solución proteica ( $\phi_p = 1$  wt % para BSA and  $\phi = 0.1$  wt % de NaCl) sin tratamiento térmico. Los patrones de gotas de  $12 \times 1$  min,  $6 \times 2$  min y  $4 \times 3$  min presentan áreas de textura irregular, mientras que los depósitos de  $2 \times 6$  min y  $1 \times 12$  min generan un característico patrón de ojo. Los números en rojo indican la cantidad de ciclos térmicos, mientras que los números en negro corresponden a la duración del calentamiento y las barras codificadas por colores (naranja y azul) indican las regiones marcadas con colores correspondientes dentro de las gotas. Las barras moradas y negras representan escalas de 1 mm y 0.5 mm, respectivamente.

intermitentes de 6 minutos generan un patrón de ojo, caracterizado por una clara diferenciación entre la región central y la periferia. La periferia muestra una deposición uniforme sin estructuras significativa (ver recuadro naranja), mientras que el agregado central está dominado por cristales en forma de aguja que están embebidos en una región de aspecto fibroso (recuadro azul). Finalmente, las gotas de soluciones sometidas a calentamiento de 12 minutos muestran una alta similitud con los depósitos generados con tratamientos intermitentes de 6 minutos. La periferia presenta un aspecto liso con grietas altamente ensanchadas (recuadro naranja), mientras que la región central indica una estructura fibrosa con cristales en forma de aguja y sub-venaciones, observable en el recuadro azul. Las Figuras 3.7 y 3.8 muestran que, sin importar la concentración de NaCl y el tratamiento térmico, se observa una alta reproducibilidad en la formación de patrones.

La Figura 3.9 presenta la cuantificación del impacto del recocido térmico en la complejidad de los patrones formados por gotas secas. La Figura 3.9a muestra la entropía configuracional (u.a.) de gotas secas de una solución proteica con NaCl al 1 wt %, sometidas a diferentes tiempos de recocido térmico. Los resultados indican que las gotas sin tratamiento térmico (Nativo) presentan una entropía de aproximadamente 8 u.a., lo que



Figura 3.7: Reproducibilidad de patrones en depósitos de gotas secas de proteína y NaCl ( $\phi = 1$  wt %) bajo diferentes tratamientos térmicos. Los números en rojo indican la cantidad de ciclos térmicos y los números en negro, la duración del calentamiento (minutos). Las barras moradas representan 1 mm.

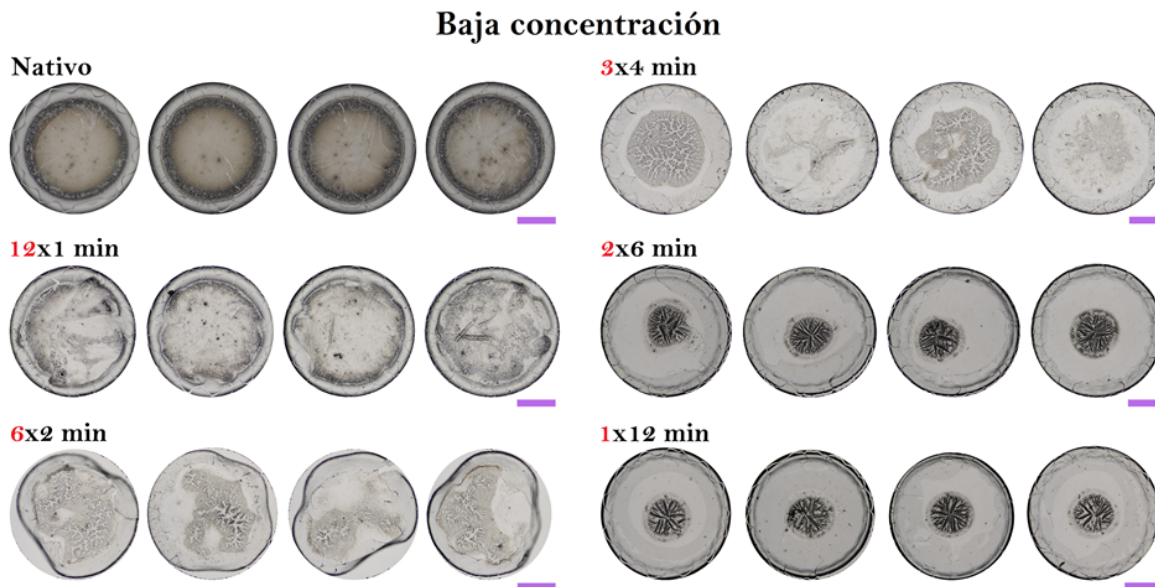


Figura 3.8: Reproducibilidad de patrones en depósitos de gotas secas de proteína y NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %) bajo diferentes tratamientos térmicos. Los números en rojo indican la cantidad de ciclos térmicos y los números en negro, la duración del calentamiento (minutos). Las barras moradas representan 1 mm.

refleja un nivel moderado de complejidad en los patrones iniciales. En depósitos generados con tratamientos térmicos intermitentes de 1 y 2 minutos, la entropía aumenta ligeramente por arriba de 8.5 u.a., sugiriendo un incremento en la complejidad debido al incremento en la densidad de agregados en toda la superficie. A partir de tratamientos térmicos intermitentes de 4 minutos, se observa una disminución por debajo de 8.1 u.a., derivado de la disminución de la aparición de estructuras en la periferia.

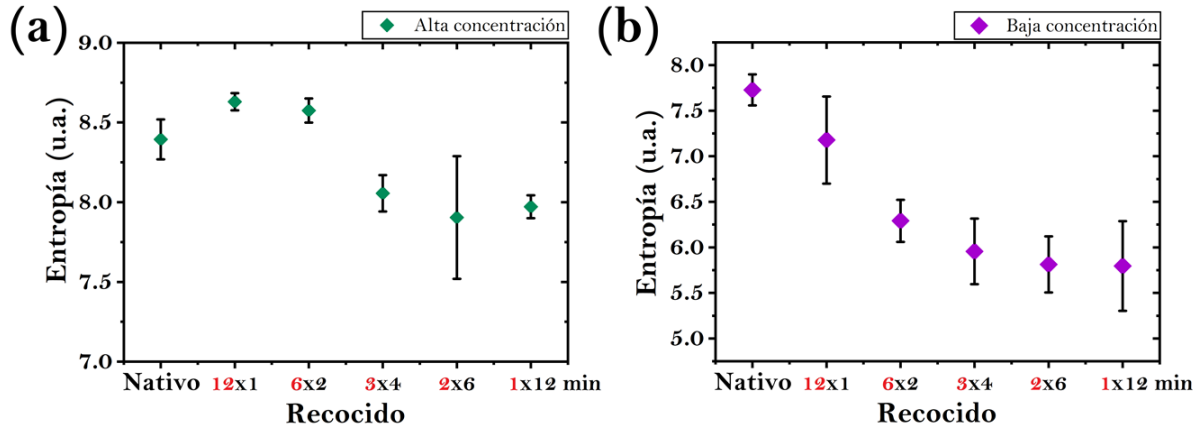


Figura 3.9: **Análisis de textura de gotas secas de proteína y NaCl bajo diferentes tratamientos térmicos.** La Entropía en función de los ciclos térmicos. (a) Depósitos con alta concentración de NaCl ( $\phi = 1$  wt %) y (b) depósitos con baja concentración de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %).

En la Figura 3.9b se muestra que la entropía configuracional de gotas secas de una solución proteica con NaCl al 0.1 wt % decrece con la duración del ciclo de calentamiento intermitente. Las gotas sin tratamiento térmico (Nativo) presentan una entropía de aproximadamente 7.7 u.a., lo que sugiere una complejidad inicial moderada en los patrones. Con un tratamiento térmico de ciclos de 1 y 2 minutos, la entropía disminuye drásticamente cerca de 7.2 y 6.2 u.a., respectivamente. Esto es debido a la desaparición de estructuras cristalinas que cubre todo el depósito. Para tratamientos a partir de 4 minutos por ciclo, la entropía disminuye ligeramente alcanzando valores alrededor de 5.8 u.a. Esto se debe a una mayor simplificación de los patrones por la aparición de grandes zonas de deposición uniforme en la periferia de los depósitos, especialmente característicos del patrón de ojo que surgen en depósitos generados con ciclos de 6 y 12 minutos.

Estimar curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para la muestra control y las muestras sometidas a diferentes tratamientos térmicos podría ser una herramienta útil para evaluar la capacidad del método de reconocimiento de gotas secas, basado en la entropía configuracional, para diferenciar proteínas con distintos estados conformacionales. La Figura 3.10a muestra que la curva ROC correspondiente a la muestra con ciclos de 1 minuto presenta un alto nivel de sensibilidad y especificidad en la detección de cambios estructurales en las gotas secas con NaCl al 1 wt %. Un comportamiento similar se observa al comparar las muestras con NaCl al 0.1 wt % sometidas a diversas condiciones de

recocido con los depósitos de proteínas en estado nativo (ver Figura 2.10b), evidenciando consistentemente altos niveles de sensibilidad y especificidad en la detección de cambios estructurales bajo diferentes tratamientos térmicos.

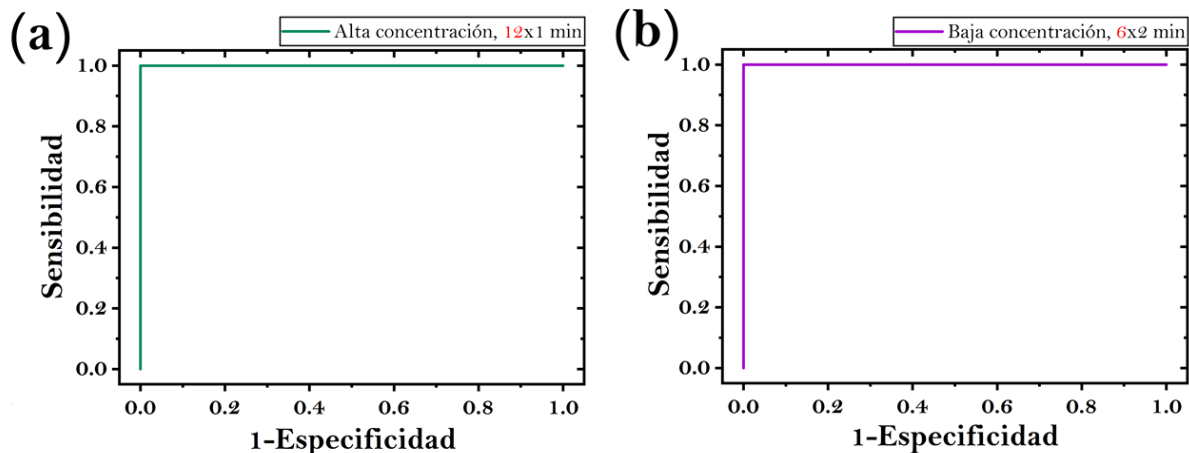


Figura 3.10: **Característica Operativa del Receptor (ROC)**. Curvas ROC estimadas a partir del análisis de Entropía en patrones de gotas secas de proteína-NaCl. (a) Relación de sensibilidad y 1–especificidad de depósitos con alta concentración de NaCl ( $\phi = 1$  wt %) bajo tratamientos térmicos de 1 min. (b) Relación de sensibilidad y 1–especificidad de depósitos con baja concentración de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %) bajo tratamientos térmicos de 2 min.

La Figura 3.11a presenta el área bajo la curva ROC (AUC) para las muestras con alta concentración de NaCl (1 wt %) sometidas a diferentes duraciones de recocido. A pesar de las ligeras variaciones en los valores del AUC, todos los tratamientos térmicos presentan una capacidad de discriminación elevada, con valores superiores a 0.9.

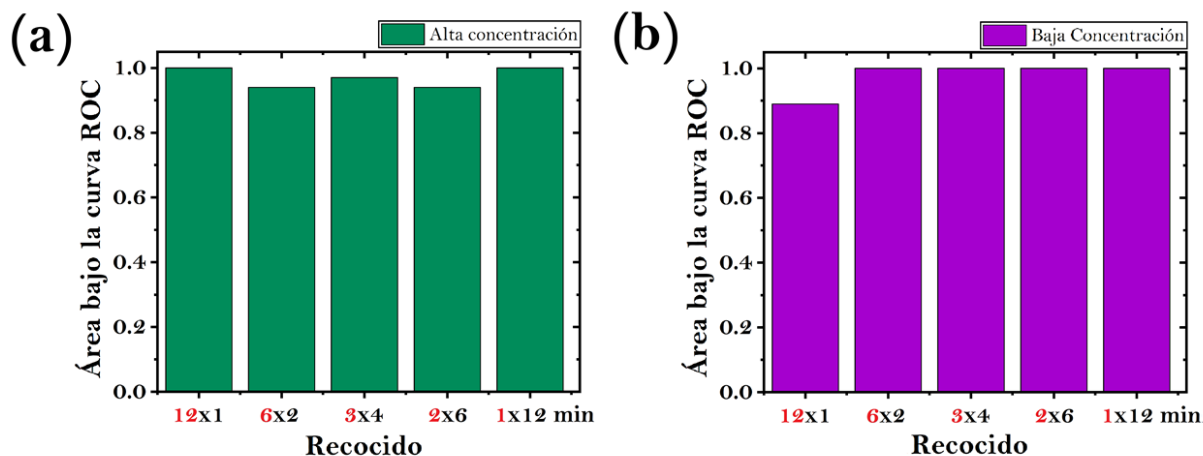


Figura 3.11: **Efectividad para identificar depósitos de gotas secas de proteína y NaCl bajo diferentes tratamientos térmicos**. (a) Depósitos con alta concentración de NaCl ( $\phi = 1$  wt %). (b) Depósitos con baja concentración de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %).

Esto confirma la robustez y eficacia del método de reconocimiento de gotas secas basado en la entropía configuracional, incluso a bajas concentraciones de NaCl (Figura 3.11b). En particular, a esta concentración, los datos revelan que el método mantiene un AUC cercano a 1.0 de manera consistente, independientemente del tiempo de recocido (1, 2, 4, 6 y 12 minutos), lo que demuestra una excelente capacidad de discriminación entre las diferentes conformaciones proteicas.

### Dinámica de formación de cristales en gotas de proteína-NaCl bajo tratamientos térmicos

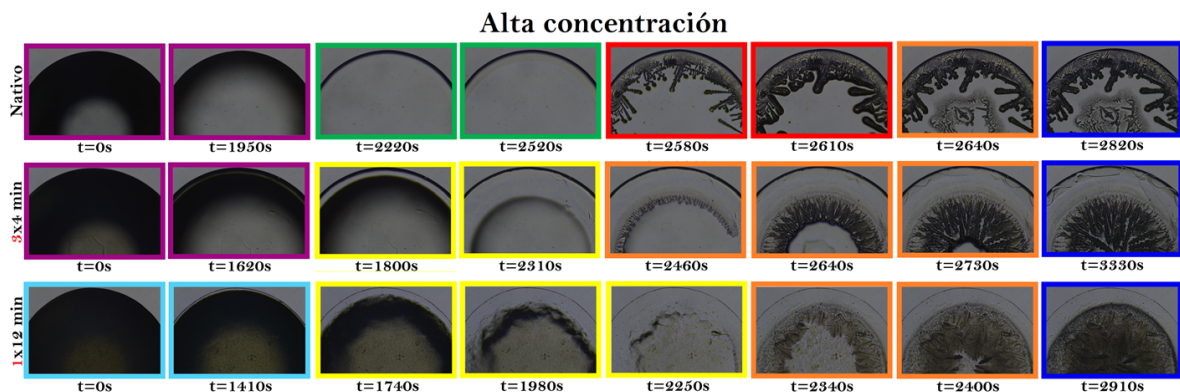


Figura 3.12: **Proceso de formación de patrones de depósitos de solución proteína-NaCl ( $\phi = 1$  wt %) con diferente ciclo térmico.** Las fotografías muestra la progresión del secado en gotitas proteicas bajo tratamientos térmicos de 2x4 min, 1x12 min y estado nativo. Los recuadros de colores indican los mecanismos de transporte de masa y agregación: Violeta= distribución homogénea, Verde= flujos capilares, Rojo= nucleación desde la periferia, Naranja= nucleación en el centro, Amarillo= flujos de Marangoni, Celeste= distribución heterogénea y Azul= morfología final. Las barras moradas indican 1 mm.

El análisis de la evaporación de gotas de soluciones proteicas con diferentes tratamientos térmicos permite identificar mecanismos de transporte de masa y procesos de agregación que esculpen la morfología final de los patrones. La Figura 3.12 muestra la formación de patrones en depósitos de una solución proteica con 1 wt % de NaCl bajo diferentes tratamientos térmicos (Nativo, 3x4 min y 1x12 min). En las gotas de proteínas en estado nativo (Nativo), el proceso de evaporación inicial ocurre mayormente en la línea de contacto ( $t = 0$  s a  $t = 1,950$  s), manteniendo una superficie lisa. Esto último, es indicativo de una distribución homogénea de solutos debido a la alta movilidad molecular y la ausencia de gradientes de concentración (recuadro violeta). A medida que la evaporación progresa ( $t = 2,220$  s), comienza a formarse un borde en la periferia de la gota debido a la acumulación de solutos, derivado del efecto de anillo de café. Este crecimiento del anillo se produce cuando las proteínas son arrastradas hacia el borde de la gota por flujos capilares que compensan la evaporación más rápida en los bordes (recuadro verde). A los  $t = 2,580$  s, la alta concentración local de solutos en el borde resulta en una nucleación rápida, donde emergen

las primeras estructuras cristalinas en forma de aguja debido a la sobresaturación localizada (recuadro rojo). Posteriormente ( $t = 2,640$  s), la región central de la gota muestra signos de nucleación de estructuras festoneadas, resultado de la competencia entre la evaporación y la redistribución capilar de los solutos (recuadro naranja). Finalmente, a los  $t = 2,820$  s, la morfología final del depósito se revela (recuadro azul).

En el caso de gotas de soluciones sometidas a ciclos de 4 minutos de tratamiento térmico, la superficie de la gota permanece lisa durante la etapa inicial, lo que sugiere un equilibrio dinámico entre la evaporación y la difusión de solutos dentro de la gota (recuadro violeta). Conforme el tiempo avanza ( $t = 1,800$  s), la formación del anillo de café se hace evidente, indicando que los flujos capilares han comenzado a arrastrar las proteínas hacia el borde, similar al proceso observado en el estado nativo (recuadro verde). Sin embargo, debido al tratamiento térmico, la dinámica de evaporación cambia. Surge una contracción radial de la gota sobre el depósito, concentrando aún más los solutos en el centro de la gota y facilitando la nucleación (recuadro amarillo). A partir de los  $t = 2,460$  s, se observa un crecimiento abrupto de estructuras cristalinas en forma de aguja que se extienden por toda la región central, reflejando una nucleación homogénea debido a la sobresaturación sostenida (recuadro naranja). Finalmente, a los  $t = 3,330$  s, se forma un patrón de ojo distintivo (recuadro azul). Para las gotas con 12 minutos de tratamiento térmico, la agregación de proteínas desplegadas favorece una distribución no homogénea de solutos durante un período prolongado ( $t = 0$  s a  $t = 1,410$  s), creando un aspecto no uniforme sobre la superficie de la gota (recuadro celeste). A medida que el tiempo avanza ( $t = 1,740$  s), la contracción radial de la gota sobre el depósito se vuelve evidente. Este comportamiento se debe a que la tensión superficial de la gota se ajusta para equilibrar las fuerzas de cohesión y adhesión, permitiendo que el borde de la gota se retraiga hacia el centro a medida que el volumen de líquido disminuye por la evaporación (recuadro amarillo). A los  $t = 2,340$  s, la concentración de solutos en el centro alcanza niveles de saturación, iniciando el proceso de formación de estructuras fibrosas debido al crecimiento desordenado en condiciones de evaporación rápida (recuadro naranja). Finalmente, a los  $t = 2,910$  s, la morfología final del depósito muestra un patrón de ojo bien definido (recuadro azul).

En la Figura 3.13 se muestra la formación de patrones en depósitos de una solución proteica con baja concentración de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %) bajo diferentes tratamientos térmicos (Nativo, 3x4 min y 1x12 min). Para las gotas en estado nativo (Nativo), inicialmente ( $t = 0$  s), la gota presenta una superficie lisa, indicando un equilibrio entre la evaporación y la movilidad de los solutos (recuadro violeta). Durante la evaporación ( $t = 1,740$  s), la gota mantiene su morfología uniforme, pero al llegar a  $t = 1,920$  s, se empieza a observar una ligera acumulación de solutos en la periferia. Este fenómeno se acentúa a  $t = 2,160$  s, donde el borde de la gota se vuelve más pronunciado (recuadro verde). A medida que la evaporación continúa ( $t = 2,490$  s), se forman estructuras cristalinas en la periferia debido a la sobresaturación local (recuadro naranja). Este patrón de cristalización se vuelve más evidente a  $t = 2,550$  s y se consolida en  $t = 2,700$  s, donde la gota muestra un depósito con una periferia cristalina y un centro más homogéneo (recuadro azul). En el caso de las gotas sometidas a 4 minutos de tratamiento térmico, al inicio ( $t = 0$  s), la superficie permanece homogénea y la distribución de solutos es uniforme (recuadro violeta). En  $t = 1,500$  s, la formación del borde se vuelve más notoria, debido al efecto del anillo de café (recuadro

verde). A  $t = 2,070$  s, se observa una contracción radial de la gota, indicando una mayor concentración de solutos en el centro (recuadro amarillo). Este proceso continua hasta que produce la aparición de estructuras (recuadro naranja). La evolución continua hasta  $t = 2,250$  s, donde la cristalización se extiende y se finaliza en  $t = 2,580$  s, mostrando un patrón más distribuido de estructuras cristalinas (recuadro azul). Para las gotas con 12 minutos de tratamiento térmico, al inicio de la evaporación ( $t = 0$  s), la gota muestra una superficie relativamente lisa, con una distribución homogénea de solutos (recuadro violeta). A  $t = 1,830$  s, se observa una mayor contracción radial, lo que genera un aumento en la concentración de solutos en el centro (recuadro amarillo). En  $t = 2,130$  s, esta tendencia se intensifica y a  $t = 2,340$  s, la formación del anillo de café es evidente. En  $t = 2,580$  s, inicia el proceso de formación de cristales en forma de aguja y sub-venaciones (recuadro naranja) hasta formar una estructura fibrosa y el característico patrón de ojo (recuadro azul).

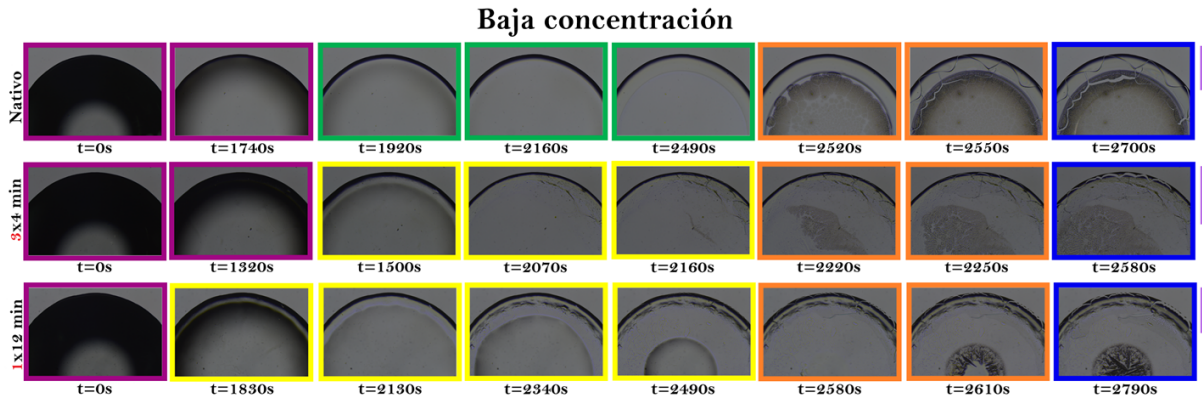


Figura 3.13: **Proceso de formación de patrones de depósitos de solución proteína-NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %) con diferente ciclo térmico.** Las fotografías muestra la progresión del secado en gotitas proteicas bajo tratamientos térmicos de 2x4 min, 1x12 min y estado nativo. Los recuadros de colores indican los mecanismos de transporte de masa y agregación: Violeta= distribución homogénea, Verde= flujos capilares, Naranja= nucleación en el centro, Amarillo= flujos de Marangoni y Azul= morfología final. Las barras moradas indican 1 mm.

Los tratamiento térmicos de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min, aplicados a soluciones con alta y baja concentración de NaCl, exhibieron comportamientos similares respectivamente para cada grupo durante el proceso de secado de los depósitos (ver Capítulo 5, Figuras 5.1 y 5.2).

La Figura 3.14 muestra la dinámica de secado lateral de gotas de soluciones de proteínas nativas con altas y bajas concentraciones de NaCl (1 y 0.1 wt %, respectivamente) expuestas a diferente tratamiento térmico (Nativo, 3x4 min y 1x12 min). Para las gotas de proteína nativa (Nativo) con alta concentración de NaCl (1 wt %), se observa inicialmente una morfología cóncava elevada, que se aplanan progresivamente durante la evaporación hasta que todo el solvente se pierde, dejando un depósito de proteínas. En la etapa inicial

de evaporación, la mayor pérdida de moléculas de agua se localiza en la línea de contacto debido a la elevada tensión superficial y al efecto de evaporación de borde, donde la evaporación es más eficiente. Este comportamiento evoluciona a medida que la gota se aplana, lo que reduce la curvatura interfacial y facilita la transición al modo de evaporación en el volumen. Este modo se caracteriza por una evaporación isotrópica en toda la superficie de la gota, promoviendo una distribución uniforme del flujo de vapor. Los perfiles de altura normalizados demuestran una reducción isotrópica y simétrica de la altura de la gota, manteniendo la simetría radial durante todo el proceso de evaporación. Además, estos perfiles indican que la línea de contacto de la gota permanece pinneada, mostrando un anclaje constante durante toda la fase de evaporación, lo que sugiere una adherencia estable del borde de la gota al sustrato.

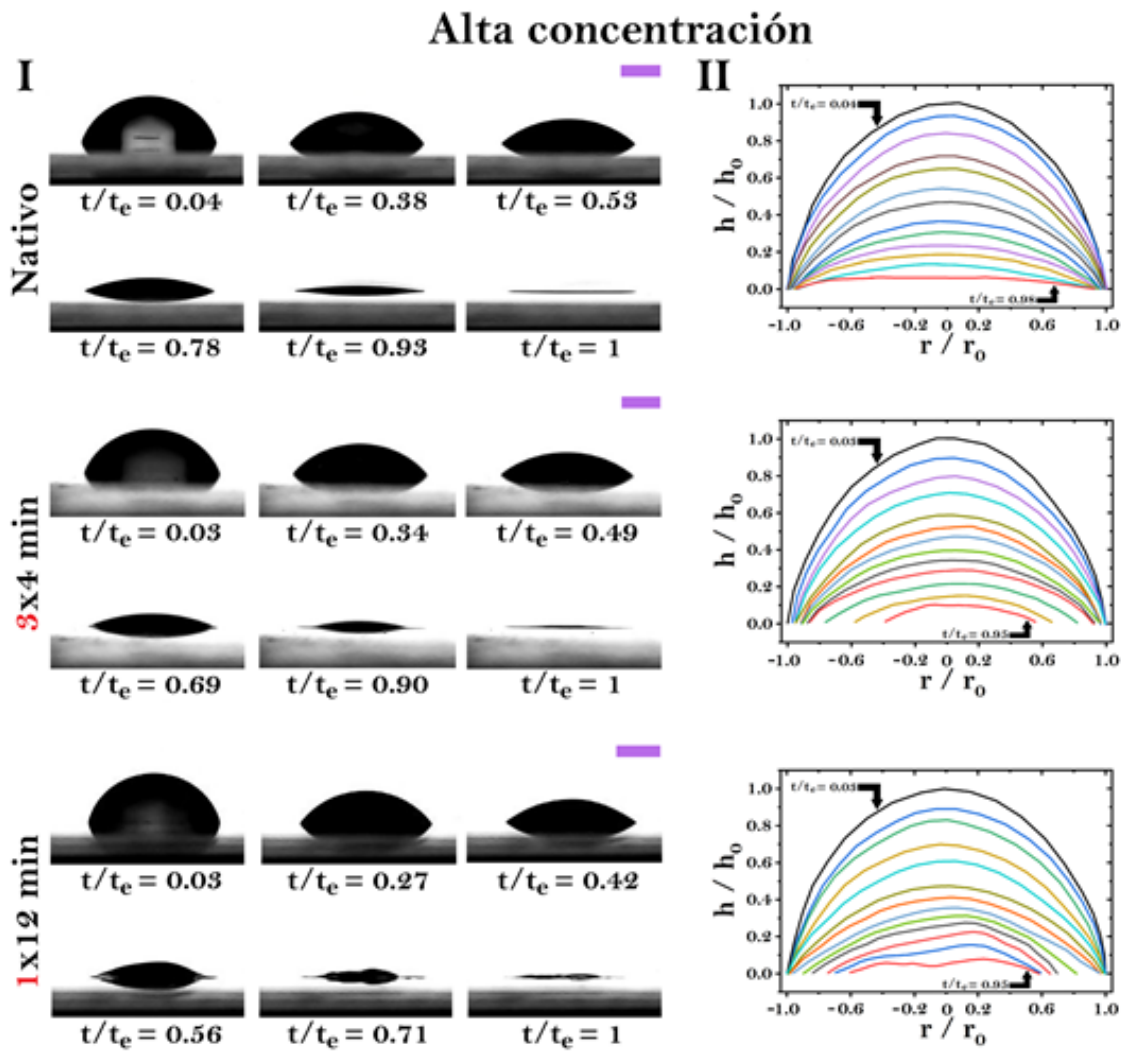


Figura 3.14: Dinámica de secado de gotas con alta concentración de NaCl. Panel I: Fotografías laterales de la progresión del secado en gotas nativas y bajo tratamientos térmicos de 3x4 min y 1x12 min. Panel II: Gráficas del perfil de altura correspondiente al proceso de evaporación de los depósitos. Las barras moradas indican 1 mm.

Para las gotas de proteína con tratamientos térmicos de ciclos de 4 minutos, se observa una morfología cóncava similar a la de gotas con proteínas nativas. Durante la evaporación, la gota comienza a mostrar una reducción en su altura central, pero mantiene su forma cóncava por un período similar al de proteínas nativas. La evaporación sigue dominada por la línea de contacto en las primeras etapas, debido a la elevada tensión superficial y al efecto de evaporación en el borde, donde la pérdida de masa es más eficiente. A medida que el proceso avanza, la gota experimenta una disminución en la curvatura interfacial, lo que facilita una transición gradual al modo de evaporación en el volumen. Los perfiles de altura normalizados demuestran que, en la etapa final de evaporación, el retraimiento de la línea de contacto hacia el centro de la gota es evidente. Esta dinámica se da sobre el depósito de proteínas y no sobre el sustrato, lo que indica que la película de proteínas actúa como una nueva interfaz de evaporación, influenciando la distribución de solutos y la morfología final de los agregados en el depósito. Las gotas de proteína expuestas a un tratamiento térmico de 12 minutos con alta concentración de NaCl (1 wt %), muestran inicialmente una morfología cóncava elevada que se mantiene durante un período prolongado antes de aplanarse gradualmente. Durante esta etapa, la evaporación continúa siendo dominada por la región de la línea de contacto. Conforme avanza el tiempo, la gota experimenta una notable disminución en su altura central, manteniendo inicialmente una distribución simétrica del flujo de vapor. En la etapa final de evaporación, los perfiles de altura normalizados indican un retraimiento de la línea de contacto hacia el centro de la gota. Además, se observa una asimetría en los perfiles de altura, sugiriendo que la distribución de la evaporación y la morfología del depósito no son completamente uniformes. Esta asimetría podría deberse a variaciones locales en la concentración de solutos que podrían generar diferencias en la dinámica de evaporación a lo largo de la superficie de la gota. Este fenómeno influye significativamente en la distribución de los solutos y en la morfología final del depósito, promoviendo una estructura que puede ser más heterogénea y menos controlada en comparación con etapas anteriores.

La Figura 3.15 ilustra la dinámica de secado de gotas de soluciones de proteínas nativas con baja concentración de NaCl (0.1 wt %) sometidas a diferentes tratamientos térmicos (Nativo, 3x4 min y 1x12 min). Al inicio del proceso de evaporación, se observa que las gotas presentan una forma cóncava pronunciada, que se va aplanando a medida que el solvente se evapora, dejando un residuo proteico. En la fase inicial, la evaporación es más intensa en la línea de contacto debido a la alta tensión superficial y al efecto de borde, donde la evaporación es más eficiente. Este fenómeno se refleja en una reducción uniforme y simétrica del perfil de altura de la gota, manteniendo una simetría radial constante a lo largo del proceso. Para las gotas sometidas a un tratamiento térmico de 4 minutos, la morfología inicial cóncava persiste, aunque se empieza a notar una disminución en la altura central durante la evaporación. Esta reducción gradual facilita la transición de la evaporación predominante en la línea de contacto a una evaporación más homogénea en el volumen de la gota. Los perfiles de altura normalizados muestran una reducción simétrica de la gota, manteniendo su simetría radial durante todo el proceso. En las etapas finales, se observa que la línea de contacto se retrae hacia el centro de la gota, indicativo de una nueva interfaz de evaporación creada por el depósito de proteínas. Las gotas expuestas a un tratamiento térmico de 12 minutos también exhiben una morfología cóncava inicial

prolongada antes de aplanarse gradualmente. Durante este tiempo, la evaporación sigue dominada por la línea de contacto, similar a los otros tratamientos. Sin embargo, en la etapa final, los perfiles de altura muestran un notable retraimiento de la línea de contacto hacia el centro, lo que sugiere una evaporación no completamente uniforme y posibles variaciones locales en la concentración de solutos.

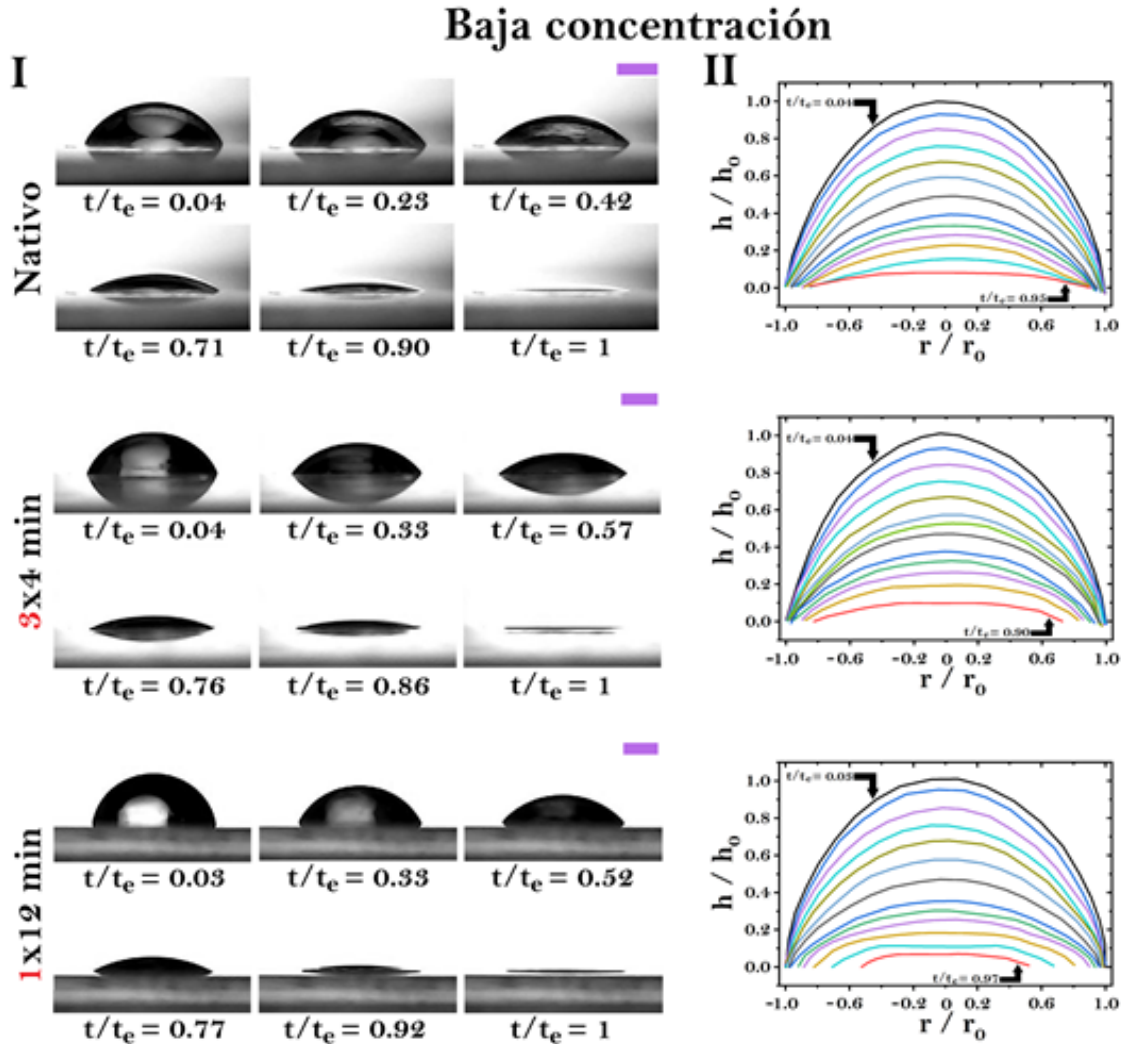


Figura 3.15: **Dinámica de secado de gotas con baja concentración de NaCl.** Panel I: Fotografías laterales de la progresión del secado en gotas nativas y bajo tratamientos térmicos de 3x4 min y 1x12 min. Panel II: Gráficas del perfil de altura correspondiente al proceso de evaporación de los depósitos. Las barras moradas indican 1 mm.

La dinámica de secado lateral observada para los ciclos térmicos de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min, tanto en soluciones con alta como con baja concentración de NaCl, mostró un comportamiento de aplanamiento y reducción consistente con las gotas previamente descritas (ver Capítulo 5, Figuras 5.3 y 5.4).

## Propiedades de secado

La Figura 3.16 muestra la evolución de la altura normalizada ( $h_a/h_0$ ) como función del tiempo normalizado ( $t/t_e$ ) para gotas de alta y baja concentración sometidas a tres tratamientos térmicos diferentes: Nativo, 3x4 min y 1x12 min. En las soluciones de alta concentración de NaCl (ver Figura 3.16a), se observa que la altura disminuye progresivamente de manera aproximadamente lineal a lo largo del tiempo de evaporación para los tres tratamientos. Sin embargo, las gotas nativas presentan una altura mayor durante todo el proceso, lo que sugiere una estabilidad estructural superior en comparación con los tratamientos térmicos. Por otro lado, las gotas tratadas durante 3x4 min exhiben una reducción más acelerada de la altura en las etapas iniciales de la evaporación, reflejando un posible efecto de desnaturalización que favorece la pérdida de agua. En contraste, para las gotas de baja concentración de NaCl (ver Figura 3.16b), las diferencias entre los tratamientos son menos pronunciadas, aunque se mantiene la tendencia de mayor estabilidad en las gotas nativas. Las gotas tratadas con 1x12 min muestran nuevamente una disminución más rápida de la altura, indicando que los cambios inducidos por este tratamiento térmico afectan la dinámica de evaporación incluso a bajas concentraciones.

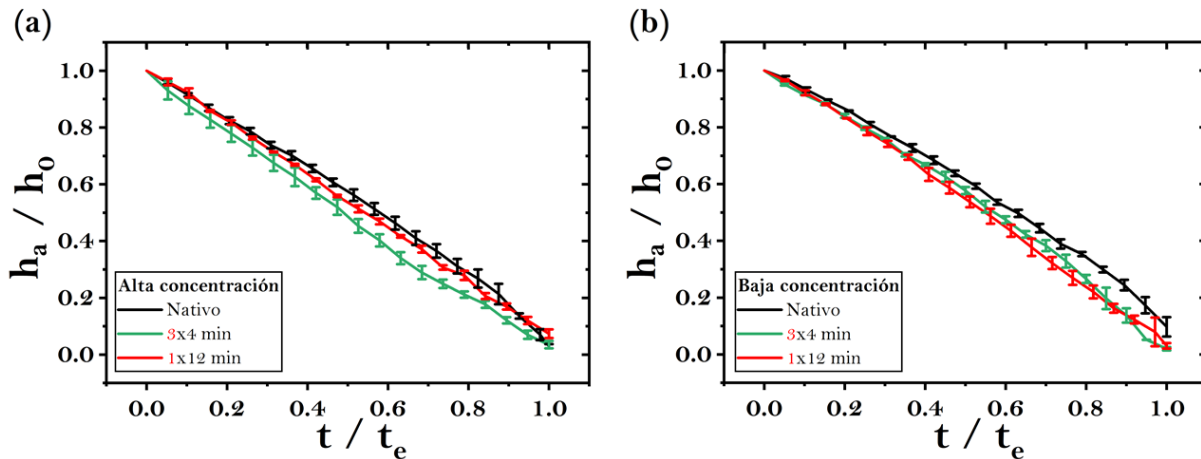


Figura 3.16: **Evolución de la altura durante el secado de gotas sometidas a tratamientos térmicos.** Evolución temporal de la altura normalizada ( $h_a/h_0$ , donde  $h_a$  es la altura del vértice y  $h_0$  es la altura inicial de la gota) para gotas con alta (a) y baja (b) concentración de NaCl sometidas a ciclos térmicos. Los símbolos en negro indican depósitos con proteína nativa y, los símbolos en verde y rojo representan los tratamientos térmicos de 3x4 min y 1x12 min, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar para  $n = 4$ .

La Figura 3.17 presenta la evolución del radio normalizado ( $r/r_0$ ) como función del tiempo normalizado para los mismos tratamientos térmicos y concentraciones. En soluciones de alta concentración (ver Figura 3.17a), las gotas nativas mantienen un radio constante durante casi todo el proceso de evaporación, lo que indica una fijación estable de la línea de contacto. En cambio, las gotas sometidas a los tratamientos térmicos 3x4 min y 1x12 min muestran una disminución progresiva del radio hacia el final del proceso, refle-

jando una contracción de la línea de contacto. Este comportamiento es aún más evidente en el tratamiento de 3x4 min, donde la pérdida de estabilidad de la línea de contacto es más pronunciada. En las soluciones de baja concentración (ver Figura 3.17b), se observa un patrón similar, donde las gotas nativas mantienen un radio constante a lo largo del tiempo, mientras que las gotas tratadas térmicamente experimentan una contracción más significativa del radio. En particular, el tratamiento 1x12 min muestra una mayor reducción del radio al final del proceso de evaporación, lo que refuerza la hipótesis de que este tratamiento altera significativamente las propiedades de fijación de la línea de contacto.

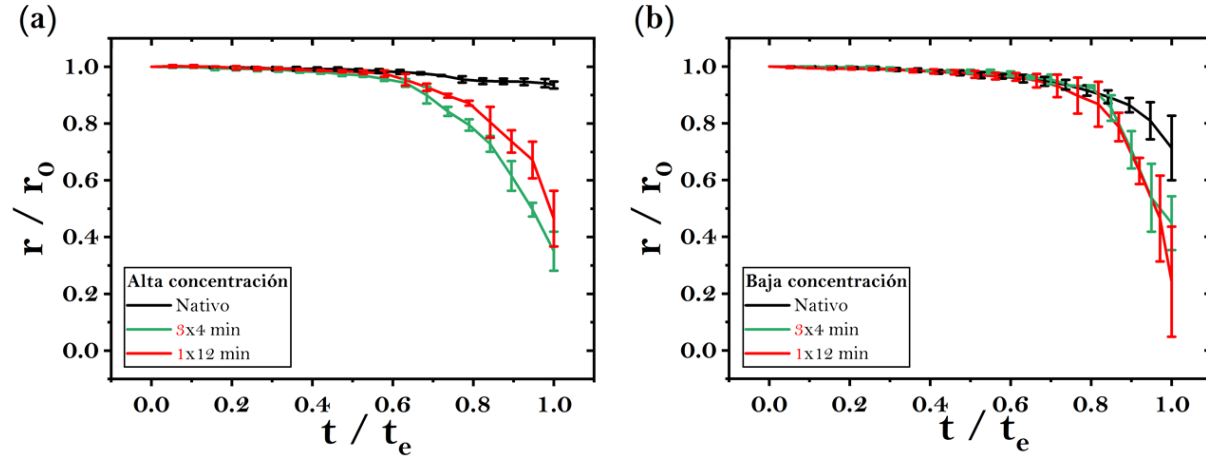


Figura 3.17: **Evolución del radio durante el secado de gotas sometidas a tratamientos térmicos.** Evolución temporal del radio normalizado ( $r/r_0$ ) para gotas con alta (a) y baja (b) concentración de NaCl sometidas a ciclos térmicos. Los símbolos en negro indican depósitos con proteína nativa y, los símbolos en verde y rojo representan los tratamientos térmicos de 3x4 min y 1x12 min, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar para  $n = 4$ .

Los perfiles de altura y radio correspondientes a las gotas tratadas con ciclos térmicos de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min, en soluciones con alta y baja concentración de NaCl se muestran en el Capítulo 5, Figura 5.5 y Figura 5.6.

El análisis del ángulo de contacto inicial ( $\theta$ ) proporciona información sobre la interacción entre las proteínas y la superficie, y revela las propiedades de mojabilidad resultantes de dicha interacción. La Figura 3.18 muestra el ángulo de contacto inicial ( $\theta$ ) para proteínas sometidas a diferente tiempo del ciclo de recocido. Figura 3.18a, que corresponde a una alta concentración de NaCl, se observa que el ángulo de contacto inicial de proteínas nativas es de aproximadamente 72 grados. A medida que la duración del ciclo de calentamiento incrementa desde 1 hasta 12 minutos, se aprecia una tendencia ascendente en el ángulo de contacto de las gotas, alcanzando un valor máximo cercano a los 82 grados.

Figura 3.18b, que representa una baja concentración de NaCl, muestra un ángulo de contacto inicial similar de aproximadamente 72 grados. Sin embargo, a diferencia del caso de alta concentración, la variación del ángulo de contacto es menor. Las gotas con ciclos de 4 minutos de calentamiento, el ángulo de contacto alcanza un valor máximo cercano

a los 78 grados. Para gotas con ciclos de calentamiento de mayor duración se mantiene relativamente constante este valor e incluso muestra una ligera disminución en gotas generadas con 12 minutos. Este comportamiento indica que, para altas concentraciones de NaCl, el recocido tiene un impacto mayor en la interacción de la proteína con la superficie, lo que impulsa la resistencia a la humectación y, por tanto, disminuye las propiedades de mojabilidad de la solución proteica.

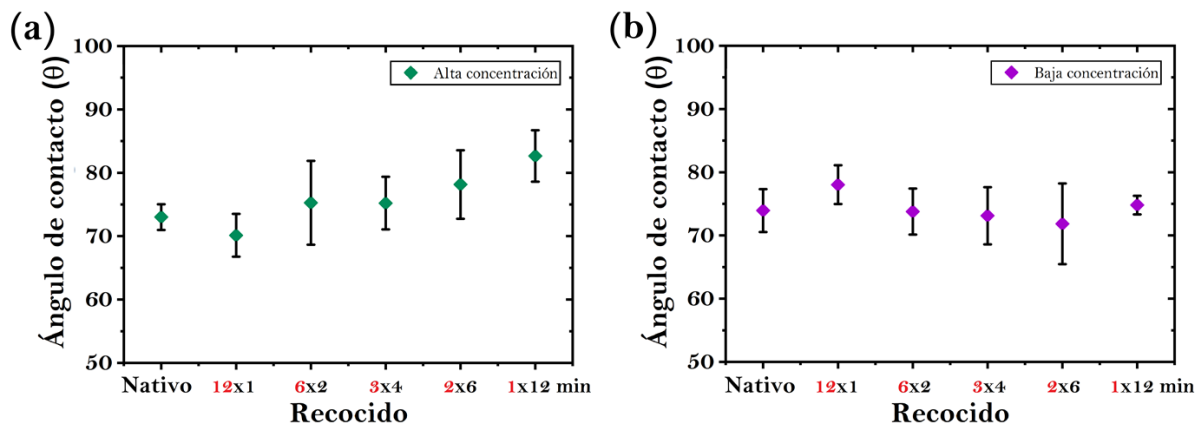


Figura 3.18: **Ángulo de contacto inicial en gotitas de proteína-NaCl con diferentes ciclos térmicos.** (a) Ángulo de contacto inicial en gotitas a alta concentración de NaCl ( $\phi = 1$  wt %). (b) Ángulo de contacto inicial en gotitas a baja concentración de NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %).

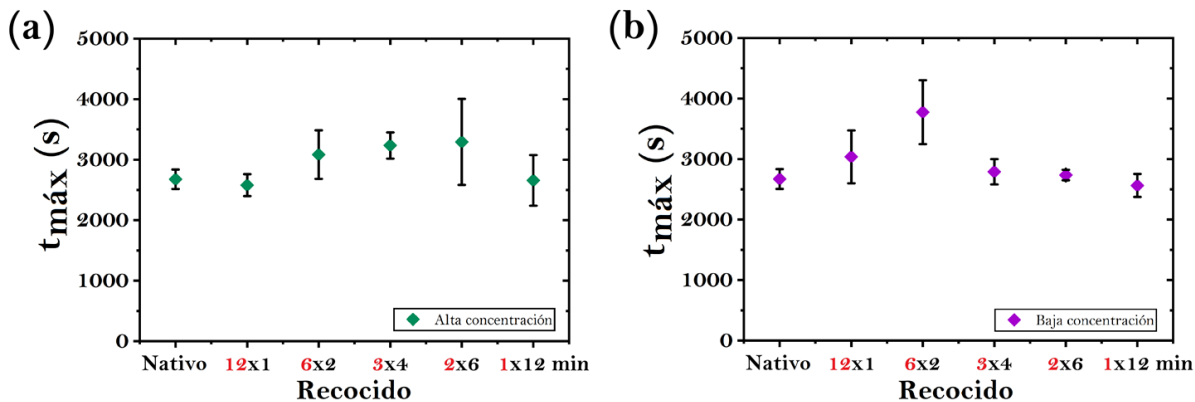


Figura 3.19: **Tiempo total de secado de gotas bajo diferentes ciclos térmicos.** (a) Tiempo de secado en función del ciclo térmico en gotitas de proteína con alta concentración de NaCl. (b) Tiempo de secado en función del ciclo térmico en gotitas de proteína con baja concentración de NaCl.

La evaluación de la evaporación de gotas de soluciones proteicas sometidas a diferentes tratamientos térmicos es clave para diseñar procesos de manufactura. En la Figura 3.19 se muestra que, independientemente de la concentración de NaCl, no existen diferencias

significativas en el tiempo de evaporación ( $t_{max}$ ) de las gotas de soluciones sometidas a diversos tratamientos térmicos. Para las soluciones de alta y baja concentración, el tiempo de evaporación de las gotas presenta una ligera variabilidad alrededor de los 3000 segundos. Esto puede tener implicaciones importantes para el diseño de procesos y productos que requieren estabilidad.

## Espectroscopia UV-Vis

La variabilidad en los estados conformacionales de la proteína, a pesar de estar sometida a un tiempo total de 12 minutos en contacto térmico a una fuente a  $T = 90^\circ\text{C}$ , puede explicarse a través de la teoría vítrea y el concepto de tiempo crítico  $t_c$ . Este parámetro representa el tiempo requerido para que la solución proteica alcance la temperatura crítica  $t_c$  asociada a la transición de fase irreversible de la BSA ( $60^\circ\text{C}$ ) [118]. En el contexto de proteínas sometidas a tratamientos térmicos intermitentes, este tiempo desempeña un papel crucial en la reorganización de las configuraciones estructurales en respuesta al calor. Cuando la duración de los ciclos térmicos de calentamiento a  $90^\circ\text{C}$  es menor que  $t_c$ , la proteína no logra alcanzar a  $T_c$  antes de que comience el periodo de termalización a  $20^\circ\text{C}$ . Esto produce que la BSA alcance configuraciones reversibles fuera de equilibrio, incluidas aquellas parcialmente desplegadas.

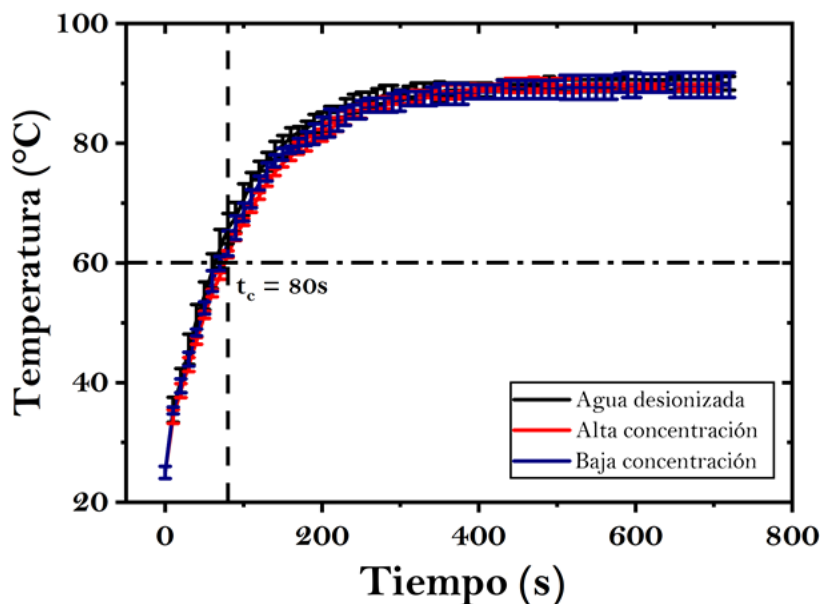


Figura 3.20: **Curvas de temperatura en soluciones de proteínas a  $90^\circ\text{C}$ .** La transición irreversible de BSA ocurre en el tiempo crítico  $t_c = 80\text{ s}$ . La curva en negro corresponde al agua desionizada en su estado puro, mientras que la curva en rojo y azul corresponden a soluciones de BSA y NaCl al 1 wt % y al 0.1 wt %, respectivamente.

La Figura 3.20 muestra el incremento de la temperatura de las soluciones de proteínas en contacto térmico con la fuente a  $90^\circ\text{C}$ . Determinamos que el tiempo crítico de las

muestras es aproximadamente  $t_c = 80$  s. Por lo tanto, en tratamientos con ciclos cortos y frecuentes, como 12 ciclos de 1 minuto o 6 ciclos de 2 minutos, la proteína experimenta múltiples perturbaciones térmicas que no permiten un tiempo suficiente para la relajación completa hacia configuraciones más estables. Cada ciclo aporta una cantidad de energía que, si bien es suficiente para alterar las conformaciones de la BSA, no es lo suficientemente prolongada para superar las barreras energéticas profundas y alcanzar un estado de equilibrio verdadero en una configuración irreversible. Esto resulta en que la proteína oscile entre diferentes conformaciones metaestables, aumentando la complejidad estructural y la variabilidad en los patrones observados en los depósitos secos.

En contraste, los tratamientos con ciclos más largos y menos frecuentes, como 2 ciclos de 6 minutos o un solo ciclo de 12 minutos, proporcionan tiempo suficiente para que la proteína sobre pase la  $T_c$  durante cada ciclo de calentamiento. Esto permite una reorganización más profunda de las estructuras secundarias y terciarias hacia configuraciones más estables, favoreciendo la formación de agregados ordenados, como se observa en la nucleación de estructuras fibrosas o agregados amorfos más uniformes. El contacto térmico prolongado facilita que la proteína supere las barreras energéticas y transite hacia estados conformacionales de menor energía libre, reduciendo así la complejidad y la variabilidad de los patrones en los depósitos secos.

Los espectros UV-Vis de soluciones de BSA con diferentes concentraciones de NaCl ( $\phi = 1$  wt % y  $\phi = 0.1$  wt %) sometidas a diversos tratamientos térmicos revelan cambios significativos en la estructura conformacional de la proteína en función de los ciclos de calentamiento. En soluciones con alta concentración de NaCl (Fig. 3.21a), la muestra nativa exhibe un máximo de absorción característico cerca de 291 nm, atribuido a los residuos aromáticos (triptófano y tirosina) en su entorno nativo. A medida que aumenta el número de ciclos de calentamiento, se observa una disminución gradual en la intensidad de esta banda. Este comportamiento sugiere la desnaturalización térmica de la BSA, lo que provoca cambios en el microentorno de los residuos aromáticos y, posiblemente, un aumento en su exposición al solvente, indicando una pérdida de estructura terciaria. Además, se evidencia un corrimiento hacia el rojo bajo ciertas condiciones térmicas: el máximo de absorción se desplaza a 300 nm, 297 nm y 296 nm para los ciclos de  $1 \times 12$  min,  $2 \times 6$  min y  $3 \times 4$  min, respectivamente.

En soluciones con baja concentración de NaCl (Fig. 3.21b), el máximo de absorción se mantiene en 291 nm independientemente del tratamiento térmico, lo que indica la ausencia de desplazamientos espectrales significativos. Sin embargo, se observa un aumento progresivo en la intensidad de absorbancia para ciclos de calentamiento prolongados, lo que sugiere que la exposición térmica extendida altera la estructura de la proteína, aunque sin provocar desplazamientos importantes en el máximo de absorción. Estos resultados destacan la influencia de la concentración de NaCl en la estabilidad térmica de la BSA, donde una mayor fuerza iónica favorece modificaciones estructurales e induce desplazamientos espectrales. En contraste, a bajas concentraciones de NaCl, la proteína experimenta menos alteraciones conformacionales, lo que conduce a propiedades espectrales más estables.

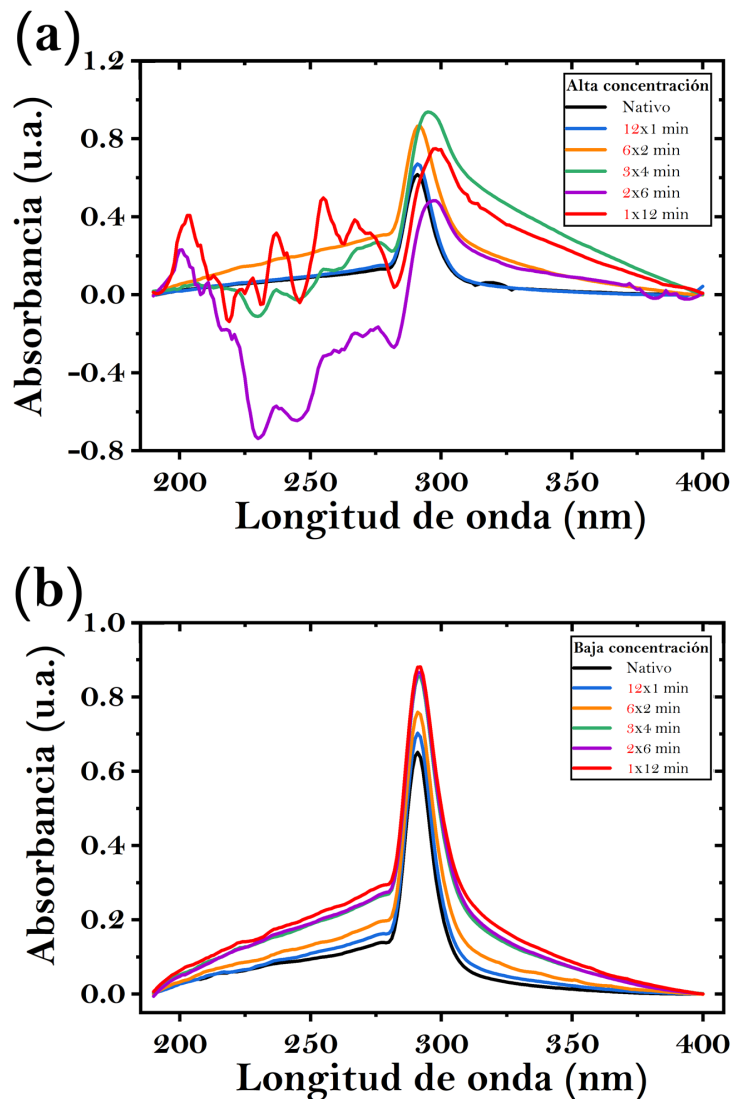


Figura 3.21: Espectros UV-Vis de soluciones de BSA a diferentes concentraciones de NaCl bajo tratamientos térmicos. (a) Alta concentración de NaCl. Los espectros revelan cambios conformacionales significativos en BSA con el aumento del tiempo de tratamiento, evidenciado por una disminución en la intensidad del pico de absorción a 280 nm y el ensanchamiento de la región espectral más allá de 300 nm, indicativo de agregación de proteínas y disrupción estructural. (b) Baja concentración de NaCl. Los espectros muestran una magnitud menor de cambios en comparación con la condición de alta concentración. La preservación del pico de 280 nm sugiere una mayor estabilidad estructural de BSA bajo estas condiciones, con efectos de agregación menos pronunciados. Todos los espectros fueron corregidos en función de la línea base para mejorar la comparabilidad y resaltar los cambios de absorción intrínsecos resultantes de los tratamientos térmicos.

## 3.5. Discusión

En este estudio, se analizaron los patrones de evaporación y deposición de gotas de soluciones proteicas con dos concentraciones distintas de NaCl, previamente sometidas a diferentes tratamientos térmicos. Los resultados obtenidos revelan que el tipo de tratamiento térmico influyen significativamente en la morfología final de los depósitos y en la complejidad estructural de los patrones formados.

Desde la perspectiva de la teoría vítrea, las proteínas en solución pueden considerarse como sistemas fuera de equilibrio que se “enfrian” mediante la aplicación de calor intermitente. Los tratamientos térmicos intermitentes actúan como “impulsos térmicos” que alteran el “paisaje energético” de la proteína, y dependiendo de la relación entre el tiempo de relajación y la duración de la exposición térmica, el sistema puede quedar atrapado en múltiples mínimos energéticos correspondientes a conformaciones no nativas o lograr transitar hacia un estado globalmente más estable [119, 120]. Así, los ciclos largos permiten a la proteína “relajarse” y acercarse al mínimo global de energía, lo que optimiza la estabilidad estructural y simplifica los patrones formados en los depósitos. De esta manera, la diferencia en los estados conformacionales de la proteína bajo tratamientos térmicos de igual tiempo total se debe a la capacidad del sistema para alcanzar o no el equilibrio térmico, moldeando la complejidad de las estructuras resultantes según el régimen de calentamiento aplicado.

Los depósitos sin tratamiento térmico mostraron estructuras definidas de “anillo de café” con cristales en forma de aguja distribuidos radialmente desde el borde hacia el centro, lo que coincide con estudios previos sobre la evaporación de gotas de soluciones complejas [121, 122]. Por otra parte, se observó a simple vista que, independientemente de la concentración de NaCl, los tratamientos térmicos de 2 minutos o más generan cambios morfológicos notables en los depósitos. Más aún, el análisis de textura revela diferencias significativas en el valor medio de la entropía de los depósitos. En soluciones con alta concentración de NaCl, los tratamientos térmicos de 1 y 2 minutos provocan un aumento de la entropía, mientras que en las de baja concentración se observa una disminución. El comportamiento de las gotas con tratamientos térmicos más prolongados (3x4, 2x6 y 1x12 min) mostró una disminución en la entropía configuracional, sin importar la concentración de NaCl, lo que sugiere una simplificación estructural en los depósitos. Este fenómeno puede estar relacionado con la contracción radial de la gota y la concentración de solutos en el centro. Mediante curvas ROC y el AUC se mostró que el método de reconocimiento de gotas secas, basado en la Entropía, tiene una alta efectividad para distinguir entre diferentes estados conformacionales de proteína BSA.

La formación de patrones en depósitos de gotas de BSA bajo tratamientos térmicos es fuertemente influenciada por mecanismos de transporte de masa y agregación que dependen del estado conformacional de las proteínas. Sin tratamiento, predomina el efecto de “anillo de café”, el cual concentra los solutos en el borde de la gota debido a flujos capilares. Sin embargo, en tratamientos térmicos a partir de 6 minutos, se observa la aparición de flujos, los cuales generan un movimiento del líquido hacia el centro de la gota. Esta dinámica contrarresta los flujos capilares, induciendo una contracción radial y la nucleación central de agregados, lo que resulta en la formación de patrones de “ojo” característicos en los depósitos (Figura 3.12 y 3.13). Este comportamiento está alineado con estudios previos

donde el patrón de ojo surge como resultado de la competencia entre flujos capilares y de Marangoni, que dirigen los solutos hacia la región central bajo condiciones de sobresaturación local, facilitando la nucleación de estructuras fibrosas o cristalinas en el centro de la gota [123].

Una de las principales limitaciones de este estudio es la falta de análisis a nivel molecular de las interacciones proteína-proteína y proteína-superficie durante el proceso de evaporación. Además, el estudio se centró en un rango limitado de concentraciones de NaCl y en un solo tipo de proteína, lo que podría no abarcar completamente la diversidad de comportamientos posibles en otras condiciones. Futuras investigaciones podrían explorar el impacto de diferentes tipos de sales y proteínas replegadas para determinar cómo estos factores afectan la formación de patrones y la complejidad estructural. Asimismo, sería interesante investigar cómo la influencia de otros parámetros, como la humedad relativa y la temperatura de sustrato, facilitan la detección de cambios conformacionales en proteínas.

## 3.6. Conclusiones

En conclusión, se investigó el efecto de los tratamientos térmicos intermitentes sobre la formación de patrones en gotas secas de soluciones de proteínas de BSA con diferentes concentraciones de NaCl, utilizando microfotografía y análisis de entropía configuracional para evaluar los cambios estructurales en los depósitos. Encontramos que los tratamientos térmicos intermitentes tienen un impacto claro y predecible sobre la formación de patrones en gotas secas de soluciones proteicas de BSA con NaCl. Las gotas sin tratamiento térmico muestran el clásico “anillo de café”, mientras que las sometidas a tratamientos más largos presentan patrones de “ojo”, asociados a una redistribución radial del soluto y a la nucleación central. El análisis de la entropía configuracional y las curvas ROC confirma la alta capacidad de estos patrones para distinguir entre diferentes estados conformacionales de proteínas, lo que sugiere que estos patrones podrían servir como indicadores de conformación proteica. Interesantemente, la complejidad estructural de los depósitos aumenta con tratamientos térmicos cortos, mientras que los tratamientos más largos promueven patrones más simples y ordenados.

En general, el análisis de gotas secas mostro alta efectividad para distinguir entre diferentes estados conformacionales de proteínas, independientemente de la concentración de NaCl.

# Capítulo 4

## Conclusiones Generales

Nuestra investigación muestra que la formación de patrones en depósitos de gotas secas de soluciones de albúmina sérica bovina (BSA) y cloruro de sodio (NaCl) puede ser modulada significativamente mediante el control de la orientación de las gotas durante la evaporación y la aplicación de tratamientos térmicos intermitentes. Estos métodos experimentales no solo modifican la morfología de los depósitos, sino que también revelan información clave sobre los estados conformacionales de las proteínas.

En el capítulo 2, se observó que la orientación vertical induce gradientes de solutos, resultando en diferencias morfológicas notables entre las regiones superior e inferior del depósito. Este fenómeno, controlado por la tasa de evaporación y el impacto de la gravedad, demuestra la capacidad de manipular las condiciones de cristalización para aplicaciones específicas en biofabricación y diseño de materiales funcionales.

El capítulo 3 amplía el análisis al evaluar los efectos de tratamientos térmicos intermitentes, mostrando que estos modifican la conformación de las proteínas y producen patrones distintivos como el “anillo de café” y el “ojo”. Además, el análisis de entropía configuracional y el uso de curvas ROC confirman que los patrones generados son altamente efectivos para distinguir entre diferentes estados conformacionales de proteínas, independientemente de la concentración de NaCl.

Sobre todo, los resultados de este trabajo no solo proporcionan una comprensión profunda de los mecanismos de transporte de masa y agregación involucrados en la formación de patrones en gotas secas de proteína, sino que también, mediante una metodología rápida, eficiente y de bajo costo, abren nuevas perspectivas para la caracterización de proteínas y en el diseño de superficies funcionales.

# Capítulo 5

## Apéndice

En este capítulo se muestran las figuras correspondientes a la formación de patrones en gotas de proteína y NaCl sometidas a ciclos de recocido de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min. Estos procesos presentan altas similitudes con los observados en los recocidos de 3x4 min, 1x12 min y en estado nativo, descritos en el capítulo 3, tanto para alta como para baja concentración de NaCl.

## Dinámica de formación de cristales en gotas de proteína-NaCl bajo tratamientos térmicos

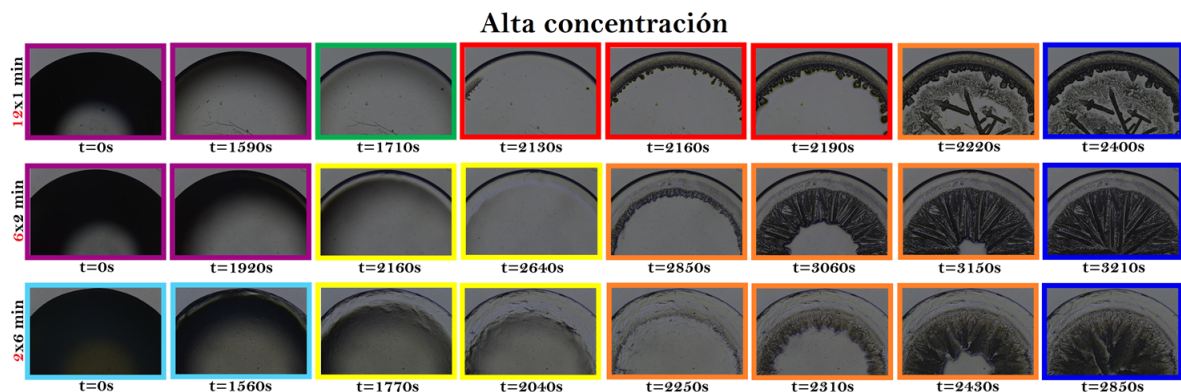


Figura 5.1: **Proceso de formación de patrones de depósitos de solución proteína-NaCl ( $\phi = 1$  wt %) con diferente ciclo térmico.** Las fotografías muestra la progresión del secado en gotas proteicas con alta concentración de NaCl bajo tratamientos térmicos de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min. Los recuadros de colores indican los mecanismos de transporte de masa y agregación: Violeta= distribución homogénea, Verde= flujos capilares, Rojo= nucleación desde la periferia, Naranja= nucleación en el centro, Amarillo= flujos de Marangoni, Celeste= distribución heterogénea y Azul= morfología final. Las barras moradas representan 1 mm.

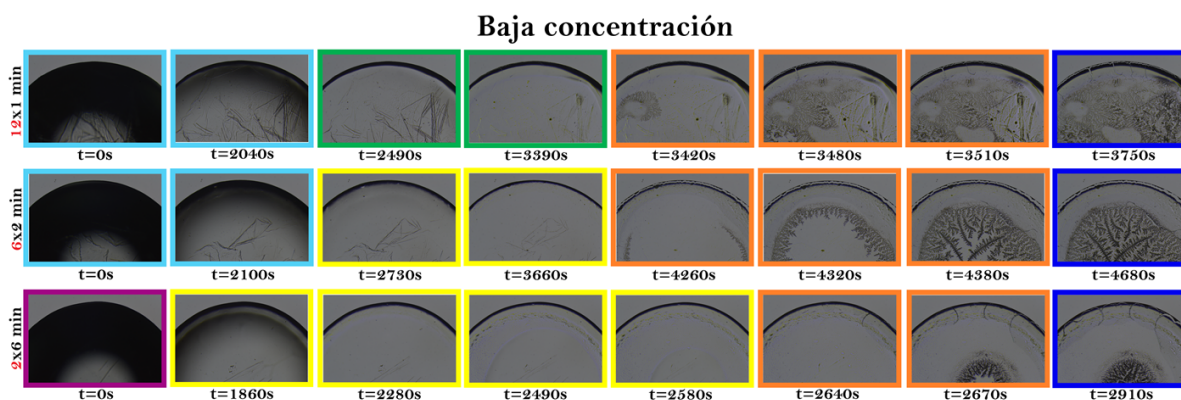


Figura 5.2: **Proceso de formación de patrones de depósitos de solución proteína-NaCl ( $\phi = 0.1$  wt %) con diferente ciclo térmico.** Las fotografías muestra la progresión del secado en gotas proteicas con baja concentración de NaCl bajo tratamientos térmicos de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min. Los recuadros de colores indican los mecanismos de transporte de masa y agregación: Violeta= distribución homogénea, Verde= flujos capilares, Rojo= nucleación desde la periferia, Naranja= nucleación en el centro, Amarillo= flujos de Marangoni, Celeste= distribución heterogénea y Azul= morfología final. Las barras moradas representan 1 mm.

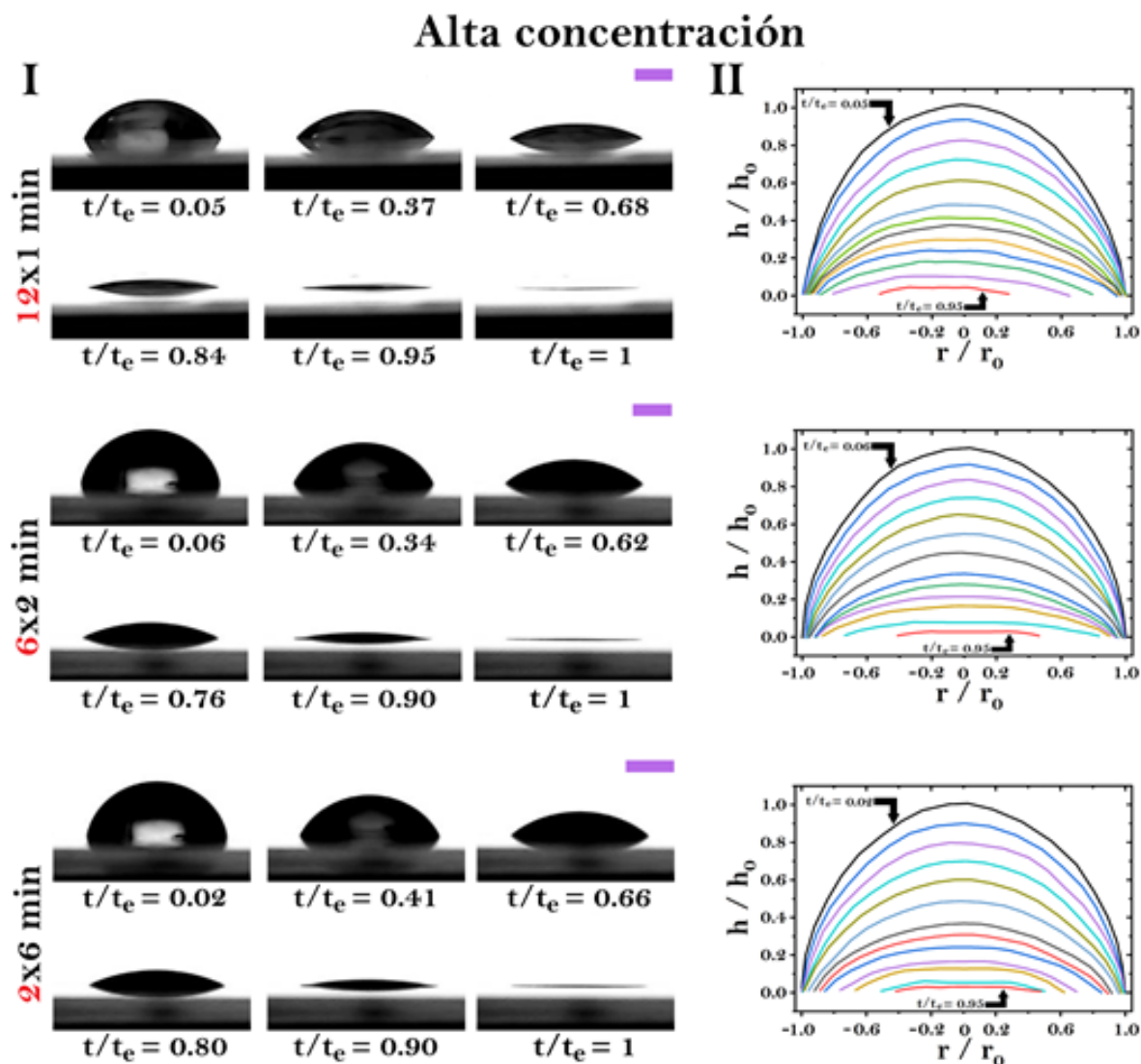


Figura 5.3: **Dinámica de secado de gotas con alta concentración de NaCl.** Panel I: Fotografías laterales de la progresión del secado en gotas de proteína bajo tratamientos térmicos de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min. Panel II: Gráficas del perfil de altura correspondiente al proceso de evaporación de los depósitos de proteína-NaCl. Los números en rojo indican la cantidad de ciclos térmicos y los números en negro, la duración del calentamiento (minutos). Las barras moradas representan 1 mm.

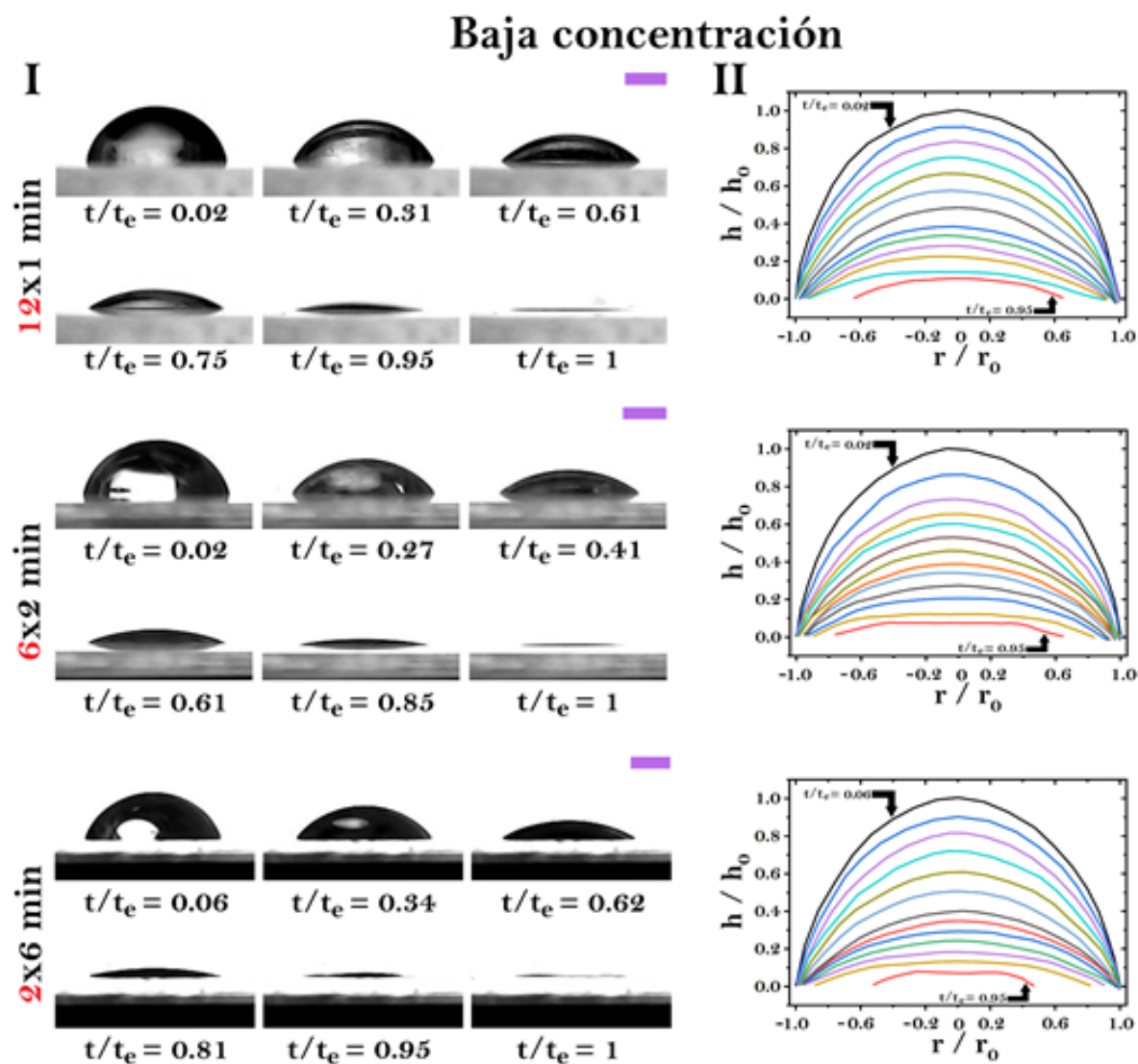


Figura 5.4: **Dinámica de secado de gotas con baja concentración de NaCl.** Panel I: Fotografías laterales de la progresión del secado en gotas de proteína bajo tratamientos térmicos de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min. Panel II: Gráficas del perfil de altura correspondiente al proceso de evaporación de los depósitos de proteína-NaCl. Los números en rojo indican la cantidad de ciclos térmicos y los números en negro, la duración del calentamiento (minutos). Las barras moradas representan 1 mm.

## Propiedades de secado

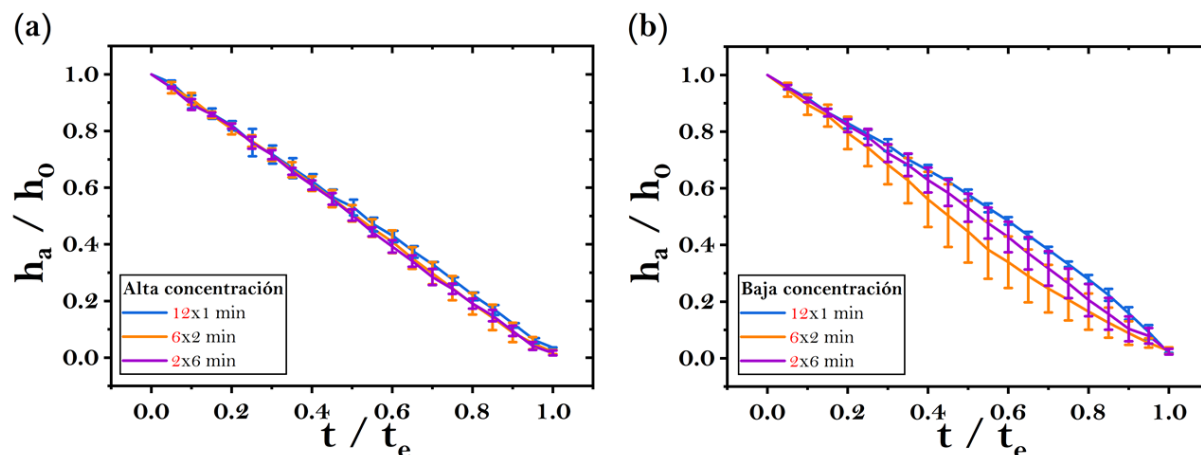


Figura 5.5: **Evolución de la altura durante el secado de gotas sometidas a tratamientos térmicos.** Evolución temporal de la altura normalizada ( $h_a/h_0$ ) para gotas con alta (a) y baja (b) concentración de NaCl sometidas a ciclos térmicos. Los símbolos en azul, naranja y morado indican depósitos con tratamiento térmico de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar para  $n = 4$ .

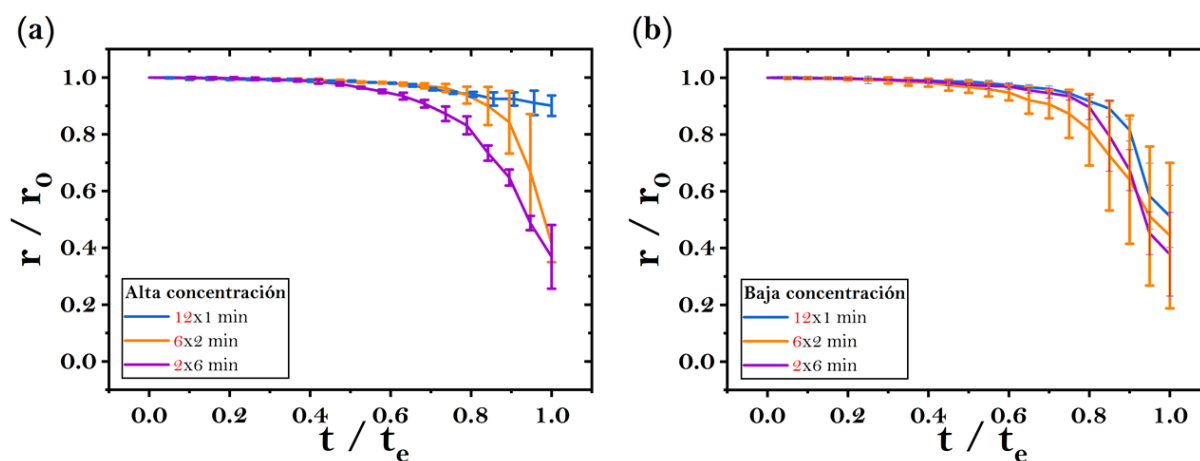


Figura 5.6: **Evolución del radio durante el secado de gotas sometidas a tratamientos térmicos.** Evolución temporal del radio normalizado ( $r/r_0$ ) para gotas con alta (a) y baja (b) concentración de NaCl sometidas a ciclos térmicos. Los símbolos en azul, naranja y morado indican depósitos con tratamiento térmico de 12x1 min, 6x2 min y 2x6 min, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar para  $n = 4$ .

# Capítulo 6

## Productos científicos

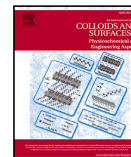
Durante el desarrollo de este trabajo se elaboraron dos manuscritos, uno de los cuales ya ha sido publicado en la revista *“Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects”* con el título *“Gravity-driven crystallization in protein and NaCl droplets”*, mientras que el otro está en proceso de ser sometido a consideración para su publicación.

Además, se participó en dos eventos científicos. El primero de ellos, el *XIV Congreso Nacional y IV Internacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud*, donde se presentó el trabajo titulado *“Cambios estructurales en gotas secas de proteína sometidas a tratamientos térmicos”*, el cual recibió una mención honorífica. El segundo evento fue en el *Simposio de Química Aplicada a Materiales 2024*, con el trabajo titulado *“Impacto del Recocido Térmico en Depósitos de Gotas Secas de Proteína: Implicaciones para la Detección de Cambios Conformacionales y Aplicaciones Diagnósticas”*.



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)  
**Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/colsurfa](https://www.elsevier.com/locate/colsurfa)



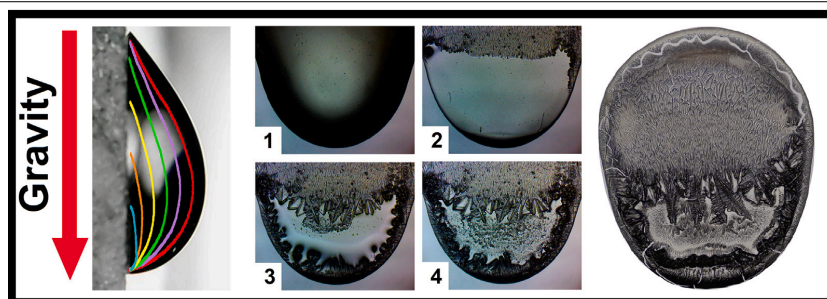
## Gravity-driven crystallization in protein and NaCl droplets

Monserrat Ancheyta-Palacios<sup>a</sup>, Kisel Sánchez-Santiago<sup>a</sup>, Gerardo J. Escalera Santos<sup>a</sup> ,  
 Yojana J.P. Carreón<sup>a,b</sup>, Jorge González-Gutiérrez<sup>a</sup> .\*

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias en Física y Matemáticas, Universidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

<sup>b</sup> CONAHCYT, Mexico City 03940, Mexico

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Gravity-driven crystallization  
 Droplet evaporation  
 Coffee ring  
 Proteins

### ABSTRACT

The manipulation of droplet orientation during evaporation emerges as a potentially revolutionary method for controlling pattern formation in protein and salt solutions, crucial for applications in coating technologies and microfabrication. We present an experimental study investigating the impact of vertical orientation on the evaporation dynamics and crystallization patterns in droplets containing bovine serum albumin (BSA) and sodium chloride (NaCl) solutions. We found that the vertical configuration creates a notable gradient in solute distribution and crystalline morphologies along the deposit. At the top of the deposit, dendritic structures form rapidly due to a high rate of evaporation which promotes local supersaturation, resulting in anisotropic nucleation and crystal growth. In contrast, the bottom features a more homogeneous and compact crystal growth, highlighting a slower evaporation rate and a gradual accumulation of solutes. The vertical orientation significantly impacts both the coffee ring effect and crystallization kinetics, with higher NaCl concentrations decreasing coffee ring thickness due to gravitational drainage. This consistent behavior across various droplet volumes and NaCl concentrations demonstrates the significant impact of gravity on orientation and crystal growth rate. The relevance of this phenomenon is fundamental for pattern formation, with important implications in the design of biofabrication processes and the engineering of functional materials.

### 1. Introduction

The study of proteins is essential in biology and medicine, playing key roles from catalyzing biochemical reactions to regulating cellular

processes that influence the development of diseases such as cancers and neurodegenerative disorders [1,2]. Advances in techniques like nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and atomic force

\* Corresponding author.

E-mail address: [jorge.ggutierrez@unach.mx](mailto:jorge.ggutierrez@unach.mx) (J. González-Gutiérrez).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2024.135821>

Received 1 July 2024; Received in revised form 19 November 2024; Accepted 21 November 2024

Available online 5 December 2024

0927-7757/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

# Morphological Patterns of BSA: Effect of Thermal Annealing on Protein Conformation

Monserrat Ancheyta-Palacios,<sup>†</sup> Nayeli Itzell Carreón-Herrera,<sup>‡</sup> Victor M. Luna-Pineda,<sup>¶</sup> Yojana J. P. Carreón,<sup>†,§</sup> and Jorge González-Gutiérrez<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>*Facultad de Ciencias en Física y Matemáticas, Universidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México*

<sup>‡</sup>*Colegio de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México*

<sup>¶</sup>*Laboratorio de Investigación en Patógenos Respiratorios y Producción de Biológicos, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, México*

<sup>§</sup>*CONAHCYT, México City 03940, México*

E-mail: \*jorge.ggutierrez@unach.mx

Total number of words: 5940, and figures: 13.

## Abstract

The investigation of pattern formation in deposits of dried protein droplets is key to the development of functional surfaces and improved wettability properties. We studied the formation of patterns in deposits of dried droplets from protein solutions with different concentrations of NaCl (1 and 0.1 wt%). The solutions were previously subjected to intermittent thermal treatments of varying durations (1, 2, 4, 6, and 12 minutes) and heating cycles (12, 6, 3, 2, and 1). Microphotography techniques were employed to analyze the morphology of deposits, and configurational entropy was measured to assess the resulting structural complexity. The results showed that proteins



**IBERO**  
PUEBLA

**T**  
*ca.*

**CONAHCYT**  
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**INROB**

**ICAT**  
INSTITUTO DE CIENCIAS APPLICADAS Y TECNOLOGÍA

**BUAP**

**UPAEP**

**UASLP**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

El Comité Organizador del XIV Congreso Nacional y  
IV Internacional de Tecnología Aplicada a Ciencias  
de la Salud otorga la presente

**CONSTANCIA**

a:

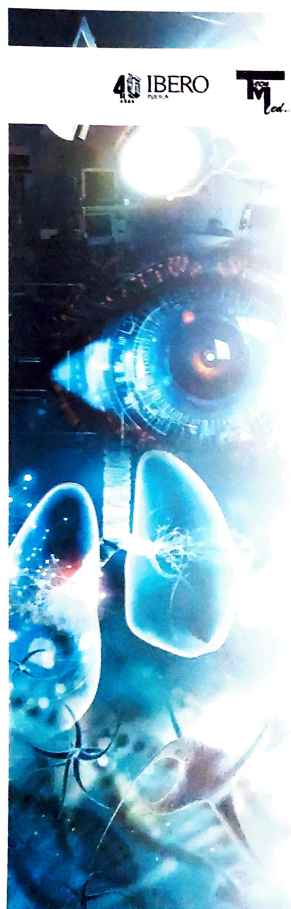
**Monserrat Ancheyta Palacios, Alondra Elizabeth  
Pérez Sánchez, Jorge González Gutiérrez,  
Yojana Jautzi Carreón Herrera**

por su valiosa participación con la presentación del cartel intitulado

**“CAMBIOS ESTRUCTURALES EN GOTAS SECAS DE PROTEÍNA  
SOMETIDAS A TRATAMIENTOS TÉRMICOS”**

Mtra. Ana Moreno Hernández  
Presidente del Comité Organizador Local,  
IBERO - PUEBLA

Dr. Eduardo Tepichín Rodríguez  
Presidente del Comité Organizador Nacional,  
INAOE



El Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica,  
la Universidad Iberoamericana Puebla,  
la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del  
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología y la Facultad de Medicina,  
la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,  
la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla  
y la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

otorgan el presente

## RECONOCIMIENTO

al cartel:

**CAMBIOS ESTRUCTURALES EN GOTAS SECAS DE PROTEÍNA  
SOMETIDAS A TRATAMIENTOS TÉRMICOS**

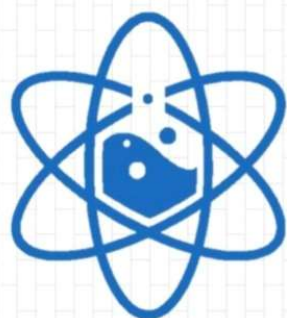
presentado por:

**Montserrat Ancheyta Palacios, Alondra Elizabeth Pérez Sánchez,  
Jorge González Gutiérrez, Yojana Jautzi Carreón Herrera**

por haber obtenido MENCIÓN HONORÍFICA en la categoría de Cartel a  
nivel POSGRADO, en el XIV Congreso Nacional y IV Internacional de  
Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud.  
Puebla, 6, 7 y 8 de junio de 2024

Mtra. Ana Moreno Hernández  
Presidente del Comité Organizador Local,  
IBERO - PUEBLA

Dr. Eduardo Tepichín Rodríguez  
Presidente del Comité Organizador Nacional,  
INAOE



# SQAM/2024

SIMPOSIO DE QUÍMICA  
APLICADA A MATERIALES

**El Comité del Simposio de Química Aplicada a  
Materiales 2024**

**Agradece su participación a:**

***Monserrat Ancheyta Palacios, Alondra Elizabeth Pérez  
Sánchez, Yojana Jautzi Carreon Herrera y Jorge Gonzalez  
Gutierrez***

Por el trabajo titulado:

**“Impacto del Recocido Térmico en Depósitos de Gotas Secas  
de Proteína: Implicaciones para la Detección de Cambios  
Conformacionales y Aplicaciones Diagnósticas”**

en modalidad *póster virtual* el día 19 de septiembre de 2024

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Mayeli Estrada Villegas**  
Coordinación General SQAM

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ariad Espinosa Roa**  
Coordinación General SQAM

<https://www.sqam.org.mx>



# Bibliografía

- [1] Ángel San Miguel Hernández, Rafael San Miguel, and Francisco Javier Martín-Gil. Importancia de las aplicaciones clínicas de la proteómica. *Revista del Laboratorio Clínico*, 3(1):40–48, 2010.
- [2] M Victoria Luque Guillén. Estructura y propiedades de las proteínas. *Obtenido de [http://www.uv.es/http://www.uv.es/tunon/pdf\\_doc/proteinas\\_09.pdf](http://www.uv.es/http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf)*. 34p, 2009.
- [3] Masoud Jelokhani-Niaraki. Membrane proteins: structure, function and motion, 2022.
- [4] Tuomas PJ Knowles, Michele Vendruscolo, and Christopher M Dobson. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(6):384–396, 2014.
- [5] Adriano Aguzzi and Tracy O’connor. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nature reviews Drug discovery*, 9(3):237–248, 2010.
- [6] Massimo Stefani and Christopher M Dobson. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of molecular medicine*, 81:678–699, 2003.
- [7] Patrick Sweeney, Hyunsun Park, Marc Baumann, John Dunlop, Judith Frydman, Ron Kopito, Alexander McCampbell, Gabrielle Leblanc, Anjali Venkateswaran, Antti Nurmi, et al. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Translational neurodegeneration*, 6:1–13, 2017.
- [8] Yojana JP Carreón, Mary Luz Gómez-López, Orlando Díaz-Hernández, Pamela Vazquez-Vergara, Rosario E Moctezuma, José M Saniger, and Jorge González-Gutiérrez. Patterns in dried droplets to detect unfolded bsa. *Sensors*, 22(3):1156, 2022.
- [9] Raquel C de Oliveira, Clayton A Benevides, George CP Rodrigues, and Rômulo P Tenório. Thermal denaturation and  $\gamma$ -irradiation effects on the crack patterns of bovine serum albumin (bsa) dry droplets. *Colloid and Interface Science Communications*, 28:15–19, 2019.

- 
- [10] Yojana JP Carreón, Maricarmen Ríos-Ramírez, RE Moctezuma, and Jorge González-Gutiérrez. Texture analysis of protein deposits produced by droplet evaporation. *Scientific reports*, 8(1):9580, 2018.
- [11] Anusuya Pal, Amallesh Gope, and Anupam Sengupta. Drying of bio-colloidal sessile droplets: Advances, applications, and perspectives. *Advances in Colloid and Interface Science*, 314:102870, 2023.
- [12] CC Annarelli, Jean Fornazero, Jacques Bert, and Jean Colombani. Crack patterns in drying protein solution drops. *The European Physical Journal E*, 5:599–603, 2001.
- [13] Christopher P Gulka, Joshua D Swartz, Joshua R Trantum, Keersten M Davis, Corey M Peak, Alexander J Denton, Frederick R Haselton, and David W Wright. Coffee rings as low-resource diagnostics: detection of the malaria biomarker plasmodium falciparum histidine-rich protein-ii using a surface-coupled ring of ni (ii) nta gold-plated polystyrene particles. *ACS applied materials & interfaces*, 6(9):6257–6263, 2014.
- [14] Duyang Zang, Sujata Tarafdar, Yuri Yu Tarasevich, Moutushi Dutta Choudhury, and Tapati Dutta. Evaporation of a droplet: From physics to applications. *Physics Reports*, 804:1–56, 2019.
- [15] Robert D Deegan, Olgica Bakajin, Todd F Dupont, Greg Huber, Sidney R Nagel, and Thomas A Witten. Publisher correction: Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 592(7855):E12–E12, 2021.
- [16] Annie Steinchen and Khellil Sefiane. Self-organised marangoni motion at evaporating drops or in capillary menisci—thermohydrodynamical model. 2005.
- [17] Yongjoon Choi, Jeongin Han, and Chongyoun Kim. Pattern formation in drying of particle-laden sessile drops of polymer solutions on solid substrates. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28:2130–2136, 2011.
- [18] Franck Bonnier, Matthew J Baker, and Hugh J Byrne. Vibrational spectroscopic analysis of body fluids: avoiding molecular contamination using centrifugal filtration. *Analytical methods*, 6(14):5155–5160, 2014.
- [19] Charles Tanford. Protein denaturation: Part c. theoretical models for the mechanism of denaturation. *Advances in protein chemistry*, 24:1–95, 1970.
- [20] ML Anson. Protein denaturation and the properties of protein groups. In *Advances in protein chemistry*, volume 2, pages 361–386. Elsevier, 1945.
- [21] Guofang Chen and Gideon J. Mohamed. Complex protein patterns formation via salt-induced self-assembly and droplet evaporation. *The European Physical Journal E*, 33:19–26, 2010.
- [22] Yalin Ye, Xingli Huo, and Zongning Yin. Protein-protein interactions at high concentrations: Effects of arghcl and nacl on the stability, viscosity and aggregation mechanisms of protein solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 601:120535, 2021.

- 
- [23] L Pauchard, F Parisse, and C Allain. Influence of salt content on crack patterns formed through colloidal suspension desiccation. *Physical Review E*, 59(3):3737, 1999.
- [24] Yojana JP Carreón, Maricarmen Ríos-Ramírez, Pamela Vázquez-Vergara, Samuel Salinas-Almaguer, I Cipriano-Urbano, Alfredo Briones-Aranda, O Díaz-Hernández, Gerardo J Escalera Santos, and Jorge González-Gutiérrez. Effects of substrate temperature on patterns produced by dried droplets of proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 203:111763, 2021.
- [25] Heather Meloy Gorr, Joshua M Zueger, Daniel R McAdams, and John A Barnard. Salt-induced pattern formation in evaporating droplets of lysozyme solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103:59–66, 2013.
- [26] W Bou Zeid and David Brutin. Influence of relative humidity on spreading, pattern formation and adhesion of a drying drop of whole blood. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 430:1–7, 2013.
- [27] Monserrat Ancheyta-Palacios, Iris G Velasco-Terán, Yojana JP Carreón, and Jorge González-Gutiérrez. Dried droplets of diluted blood to detect a high concentration of lipids. *Processes*, 11(7):2047, 2023.
- [28] Xiyu Du and RD Deegan. Ring formation on an inclined surface. *Journal of Fluid Mechanics*, 775:R3, 2015.
- [29] Roxana Belen Pérez Hidalgo, Josías N Molina-Courtois, Yojana JP Carreón, Orlando Díaz-Hernández, and Jorge González-Gutiérrez. Dried blood drops on vertical surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 234:113716, 2024.
- [30] Marc A Hampton, Tuan AH Nguyen, Anh V Nguyen, Zhi Ping Xu, Longbin Huang, and Victor Rudolph. Influence of surface orientation on the organization of nanoparticles in drying nanofluid droplets. *Journal of colloid and interface science*, 377(1):456–462, 2012.
- [31] Ricardo Herrera-Sandoval, Yojana JP Carreón, Orlando Díaz-Hernández, and Jorge González-Gutiérrez. Drying of pendant drops of blood. *Colloid and Polymer Science*, 301(11):1325–1336, 2023.
- [32] Eleni Dokou, Mark A Barteau, Norman J Wagner, and Abraham M Lenhoff. Effect of gravity on colloidal deposition studied by atomic force microscopy. *Journal of colloid and interface science*, 240(1):9–16, 2001.
- [33] Wenliang Qi, Junhui Li, and Patricia B Weisensee. Evaporation of sessile water droplets on horizontal and vertical biphobic patterned surfaces. *Langmuir*, 35(52):17185–17192, 2019.
- [34] Luizmae Aspillaga, Daniela Jan Bautista, Samantha Noelle Daluz, Katherine Hernandez, Josef Atrel Renta, and Edgar Clyde R Lopez. Nucleation and crystal growth: Recent advances and future trends. *Engineering Proceedings*, 56(1):22, 2023.

- 
- [35] Esra Ibanoglu. Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. *Food chemistry*, 90(4):621–626, 2005.
- [36] Yong-Bin Yan, Qi Wang, Hua-Wei He, and Hai-Meng Zhou. Protein thermal aggregation involves distinct regions: sequential events in the heat-induced unfolding and aggregation of hemoglobin. *Biophysical journal*, 86(3):1682–1690, 2004.
- [37] DMO Mulvihill and M Donovan. Whey proteins and their thermal denaturation—a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11(1):43–75, 1987.
- [38] Zee-Yong Park and David H Russell. Thermal denaturation: a useful technique in peptide mass mapping. *Analytical Chemistry*, 72(11):2667–2670, 2000.
- [39] Colleen Kelly and Matthew J Gage. Protein unfolding: Denaturant vs. force. *Bio-medicines*, 9(10):1395, 2021.
- [40] Claudia G Benítez-Cardoza, Arturo Rojo-Domínguez, and Andrés Hernández-Arana. Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry*, 40(30):9049–9058, 2001.
- [41] Cynthia Akkermans, Atze Jan van der Goot, Paul Venema, Erik van der Linden, and Remko M Boom. Formation of fibrillar whey protein aggregates: Influence of heat and shear treatment, and resulting rheology. *Food Hydrocolloids*, 22(7):1315–1325, 2008.
- [42] Claudio Soto. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(1):49–60, 2003.
- [43] Qianhui Xu, Yeyang Ma, Yunpeng Sun, Dan Li, Xin Zhang, and Cong Liu. Protein amyloid aggregate: Structure and function. *Aggregate*, 4(4):e333, 2023.
- [44] Anthony L Fink. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and design*, 3(1):R9–R23, 1998.
- [45] Peter G Vekilov. Phase transitions of folded proteins. *Soft Matter*, 6(21):5254–5272, 2010.
- [46] James M Bier, Casparus JR Verbeek, and Mark C Lay. Thermal transitions and structural relaxations in protein-based thermoplastics. *Macromolecular materials and engineering*, 299(5):524–539, 2014.
- [47] Maria Grazia Bridelli et al. Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated biological macromolecules. *Fourier Transforms-High-Tech Application and Current Trends*, 90:6254, 2017.
- [48] Gil Mor, Irene Visintin, Yinglei Lai, Hongyu Zhao, Peter Schwartz, Thomas Rutherford, Luo Yue, Patricia Bray-Ward, and David C Ward. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21):7677–7682, 2005.

- 
- [49] MM Verbeek, Danielle de Jong, and HPH Kremer. Brain-specific proteins in cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurodegenerative diseases. *Annals of clinical biochemistry*, 40(1):25–40, 2003.
- [50] John L Markley. Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of proteins: An overview. *Methods in enzymology*, 176:12–64, 1989.
- [51] Tatyana O Pleshakova, Natalia S Bukharina, Alexander I Archakov, and Yuri D Ivanov. Atomic force microscopy for protein detection and their physicochemical characterization. *International journal of molecular sciences*, 19(4):1142, 2018.
- [52] Janine Wilkinson, Chak Tam, Alexandros Askounis, and Sheng Qi. Suppression of the coffee-ring effect by tailoring the viscosity of pharmaceutical sessile drops. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 614:126144, 2021.
- [53] Emmanuel de la O-Cuevas, Selene R Islas, Perla Gallegos-Flores, EL Esparza-Ibarra, Hugo Tototzintle-Huitle, and José M Saniger. Modulating the interaction of graphene substrates with human interleukin-6 and its monoclonal antibody: a study by raman images. *RSC advances*, 13(22):15114–15120, 2023.
- [54] Erwin Frey, Jacob Halatek, Simon Kretschmer, and Petra Schwillle. Protein pattern formation. *Physics of biological membranes*, pages 229–260, 2018.
- [55] Karen A Esmonde-White, Francis WL Esmonde-White, Michael D Morris, and Blake J Roessler. Characterization of biofluids prepared by sessile drop formation. *Analyst*, 139(11):2734–2741, 2014.
- [56] Maheshwar Gopu, Sachin Rathod, Uma Namangalam, Ravi Kumar Pujala, S Sunil Kumar, and Dileep Mampallil. Evaporation of inclined drops: formation of asymmetric ring patterns. *Langmuir*, 36(28):8137–8143, 2020.
- [57] Sumesh P Thampi and Madivala G Basavaraj. Beyond coffee rings: Drying drops of colloidal dispersions on inclined substrates. *ACS omega*, 5(20):11262–11270, 2020.
- [58] Anusuya Pal and Amalesh Gope. Texture identification in liquid crystal-protein droplets using evaporative drying, generalized additive modeling, and k-means clustering. *The European Physical Journal E*, 47(5):35, 2024.
- [59] Maryam Parsa, Souad Harmand, and Khellil Sefiane. Mechanisms of pattern formation from dried sessile drops. *Advances in colloid and interface science*, 254:22–47, 2018.
- [60] Ghazal Biglari, Maedeh Saberi, Shervin Issakhani, Omid Jadidi, Jafar Farhadi, Vahid Bazargan, and Marco Marengo. Deposition patterns of evaporating sodium alginate sessile droplets cross-linked by calcium chloride. *Macromolecular Materials and Engineering*, 308(12):2300171, 2023.

- 
- [61] Celine Sadek, Pierre Schuck, Yannick Fallourd, Nicolas Pradeau, Cecile Le Floch-Fouere, and Romain Jeantet. Drying of a single droplet to investigate process–structure–function relationships: a review. *Dairy Science & Technology*, 95(6):771–794, 2015.
- [62] Hyoungsoo Kim, François Boulogne, Eujin Um, Ian Jacobi, Ernie Button, and Howard A Stone. Controlled uniform coating from the interplay of marangoni flows and surface-adsorbed macromolecules. *Physical review letters*, 116(12):124501, 2016.
- [63] Marcello Cavallaro Jr, Lorenzo Botto, Eric P Lewandowski, Marisa Wang, and Kathleen J Stebe. Curvature-driven capillary migration and assembly of rod-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52):20923–20928, 2011.
- [64] Wei Han and Zhiqun Lin. Learning from “coffee rings”: ordered structures enabled by controlled evaporative self-assembly. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(7):1534–1546, 2012.
- [65] Mingwei Yang, Dejian Chen, Jie Hu, Xinyu Zheng, Zu-Jin Lin, and Haomiao Zhu. The application of coffee-ring effect in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 157:116752, 2022.
- [66] Tim Still, Peter J Yunker, and Arjun G Yodh. Surfactant-induced marangoni eddies alter the coffee-rings of evaporating colloidal drops. *Langmuir*, 28(11):4984–4988, 2012.
- [67] Wouter Sempels, Raf De Dier, Hideaki Mizuno, Johan Hofkens, and Jan Vermant. Auto-production of biosurfactants reverses the coffee ring effect in a bacterial system. *Nature communications*, 4(1):1757, 2013.
- [68] Hua Hu and Ronald G Larson. Marangoni effect reverses coffee-ring depositions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14):7090–7094, 2006.
- [69] Jiazhen Sun, Minxuan Kuang, and Yanlin Song. Control and application of “coffee ring” effect in inkjet printing. *Progress in Chemistry*, 27(8):979, 2015.
- [70] Khellil Sefiane, Gail Duursma, and Aiman Arif. Patterns from dried drops as a characterisation and healthcare diagnosis technique, potential and challenges: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 298:102546, 2021.
- [71] Jesse D Killion and Srinivas Garimella. Gravity-driven flow of liquid films and droplets in horizontal tube banks. *International Journal of Refrigeration*, 26(5):516–526, 2003.
- [72] A Bateni, A Ababneh, JAW Elliott, AW Neumann, and A Amirfazli. Effect of gravity and electric field on shape and surface tension of drops. *Advances in Space Research*, 36(1):64–69, 2005.

- 
- [73] Eloise C Tredenick, W Alison Forster, Ravindra Pethiyagoda, Rebecca M van Leeuwen, and Scott W McCue. Evaporating droplets on inclined plant leaves and synthetic surfaces: Experiments and mathematical models. *Journal of Colloid and Interface Science*, 592:329–341, 2021.
- [74] Hongyue Chen, Yongjian Zhang, Heyi Wang, Xin Dong, and Duyang Zang. Evaporation caused invaginations of acoustically levitated colloidal droplets. *Nanomaterials*, 13(1):133, 2022.
- [75] Xiaoqiang Zhang, Hongyue Chen, Yuhan Wang, Xin Gao, Zhijun Wang, Nan Wang, and Duyang Zang. Ultrasound induced grain refinement of crystallization in evaporative saline droplets. *Ultrasonics Sonochemistry*, page 106938, 2024.
- [76] Azam Jeihanipour and Jörg Lahann. Deep-learning-assisted stratification of amyloid beta mutants using drying droplet patterns. *Advanced Materials*, 34(24):2110404, 2022.
- [77] Markus F Templin, Dieter Stoll, Monika Schrenk, Petra C Traub, Christian F Vöhringer, and Thomas O Joos. Protein microarray technology. *TRENDS in Biotechnology*, 20(4):160–166, 2002.
- [78] KD Kumble. Protein microarrays: new tools for pharmaceutical development. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 377(5):812–819, 2003.
- [79] David Brutin. *Droplet wetting and evaporation: from pure to complex fluids*. Academic Press, 2015.
- [80] Yojana JP Carreón, Jorge González-Gutiérrez, MI Pérez-Camacho, and Hilda Mercado-Uribe. Patterns produced by dried droplets of protein binary mixtures suspended in water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161:103–110, 2018.
- [81] Dmitriy Glibitskiy, Olga Gorobchenko, Oleg Nikolov, Tatyana Cheipesh, Tatyana Dzhimieva, Inna Zaitseva, Alexander Roshal, Mihail Semenov, and Gennadiy Glibitskiy. Influence of aluminum and iron chlorides on the parameters of zigzag patterns on films dried from bsa solutions. *Scientific Reports*, 13(1):9426, 2023.
- [82] OA Gorobchenko, DM Glibitskiy, OT Nikolov, TA Cheipesh, TN Dzhimieva, IS Zaitseva, AD Roshal, MA Semenov, and GM Glibitskiy. The effect of biologically active substances on bsa and on the textures of films obtained by drying water-salt solutions of bsa. *Low Temperature Physics*, 50(1):48–55, 2024.
- [83] Yuki Fukatani, Daniel Orejon, Yutaku Kita, Yasuyuki Takata, Jungho Kim, and Khehlil Sefiane. Effect of ambient temperature and relative humidity on interfacial temperature during early stages of drop evaporation. *Physical Review E*, 93(4):043103, 2016.
- [84] Moutushi Dutta Choudhury, Nupur Aggarwal, and Naveen Kumar. Influence of relative humidity on the structure of complex fluid drops during drying. *Journal of Materials Engineering and Performance*, pages 1–5, 2024.

- 
- [85] Tapan Kumar Pradhan and Pradipta Kumar Panigrahi. Suppressing internal convection of a droplet using confinement during protein crystallization. *Journal of Applied Physics*, 128(8), 2020.
- [86] Maryam Parsa and Alexandros Askounis. Inclined colloidal drops: Evaporation kinetics and pattern formation. *Frontiers in Mechanical Engineering*, 9:1086544, 2023.
- [87] Jin Young Kim, Marta Gonçalves, Narina Jung, Hyoungsoo Kim, and Byung Mook Weon. Evaporation and deposition of inclined colloidal droplets. *Scientific Reports*, 11(1):17784, 2021.
- [88] Fei Tao, Qian Han, and Peng Yang. Interface-mediated protein aggregation. *Chemical Communications*, 59(95):14093–14109, 2023.
- [89] Yongdae Shin and Clifford P Brangwynne. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, 357(6357):eaaf4382, 2017.
- [90] W Michael Babinchak and Witold K Surewicz. Liquid–liquid phase separation and its mechanistic role in pathological protein aggregation. *Journal of molecular biology*, 432(7):1910–1925, 2020.
- [91] L etitia Jean, Chiu Fan Lee, and David J Vaux. Enrichment of amyloidogenesis at an air-water interface. *Biophysical journal*, 102(5):1154–1162, 2012.
- [92] Letitia Jean, Chiu Fan Lee, Chongsoo Lee, Michael Shaw, and David J Vaux. Competing discrete interfacial effects are critical for amyloidogenesis. *The FASEB Journal*, 24(1):309–317, 2010.
- [93] Yushi Bai, Quan Luo, and Junqiu Liu. Protein self-assembly via supramolecular strategies. *Chemical Society Reviews*, 45(10):2756–2767, 2016.
- [94] Erik van der Linden and Paul Venema. Self-assembly and aggregation of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4-5):158–165, 2007.
- [95] César L Avila, Silvina Chaves, Sergio B Socias, Esteban Vera-Pingitore, Florencia González-Liz arraga, Cecilia Vera, Diego Ploper, and Rosana Cheh n. Lessons learned from protein aggregation: toward technological and biomedical applications. *Biophysical reviews*, 9:501–515, 2017.
- [96] Richard F Tester and Stéphane JJ Debon. Annealing of starch—a review. *International journal of biological macromolecules*, 27(1):1–12, 2000.
- [97] Jian Yang, Xianggui Liu, Jinxing Zhao, Xuelian Pu, Zetong Shen, Weiyi Xu, and Yuejun Liu. The structural evolution of  $\beta$ -to- $\alpha$  phase transition in the annealing process of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Polymers*, 15(8):1921, 2023.
- [98] Shenzhong Zou, Zhaojun Wang, Maomao Zeng, Zhiyong He, and Jie Chen. Improving the storage stability of soy protein isolate through annealing. *Foods*, 13(4):615, 2024.

- 
- [99] Patrick Masson and Sofya Lushchekina. Conformational stability and denaturation processes of proteins investigated by electrophoresis under extreme conditions. *Molecules*, 27(20):6861, 2022.
- [100] Zaida L Almeida and Rui MM Brito. Structure and aggregation mechanisms in amyloids. *Molecules*, 25(5):1195, 2020.
- [101] Eleonora Mari, Caterina Ricci, Silvia Pieraccini, Francesco Spinozzi, Paolo Mariani, and Maria Grazia Ortore. Trehalose effect on the aggregation of model proteins into amyloid fibrils. *Life*, 10(5):60, 2020.
- [102] Gennadiy Glibitskiy, Dmitriy Glibitskiy, Olga Gorobchenko, Oleg Nikolov, Alexander Roshal, Mikhail Semenov, and Anatoliy Gasan. Textures on the surface of bsa films with different concentrations of sodium halides and water state in solution. *Nanoscale research letters*, 10:1–10, 2015.
- [103] Anusuya Pal, Amalesh Gope, Ari S Athair, and Germano S Iannacchione. A comparative study of the drying evolution and dried morphology of two globular proteins in de-ionized water solutions. *RSC advances*, 10(29):16906–16916, 2020.
- [104] Heather Meloy Gorr, Joshua M Zueger, and John A Barnard. Characteristic size for onset of coffee-ring effect in evaporating lysozyme-water solution droplets. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(40):12213–12220, 2012.
- [105] Ayantika Sett, Manish Ayushman, Swagata Dasgupta, and Sunando DasGupta. Analysis of the distinct pattern formation of globular proteins in the presence of micro-and nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(38):8972–8984, 2018.
- [106] Anusuya Pal, Amalesh Gope, Rumani Kafle, and Germano S Iannacchione. Phase separation of a nematic liquid crystal in the self-assembly of lysozyme in a drying aqueous solution drop. *MRS Communications*, 9(1):150–158, 2019.
- [107] Anusuya Pal, Amalesh Gope, and Germano S Iannacchione. A comparative study of the phase separation of a nematic liquid crystal in the self-assembling drying protein drops. *MRS Advances*, 4(22):1309–1314, 2019.
- [108] Binita Pathak, John Christy, Khellil Sefiane, and Devrim Gozuacik. Complex pattern formation in solutions of protein and mixed salts using dehydrating sessile droplets. *Langmuir*, 36(33):9728–9737, 2020.
- [109] Tatiana A Yakhno. Complex pattern formation in sessile droplets of protein-salt solutions with low protein content. what substance fabricates these patterns. *Phys. Chem*, 1(1):10–13, 2011.
- [110] Anusuya Pal, Amalesh Gope, and Germano Iannacchione. Temperature and concentration dependence of human whole blood and protein drying droplets. *Biomolecules*, 11(2):231, 2021.

- 
- [111] MengNi Gao, XianFu Huang, and YaPu Zhao. Formation of wavy-ring crack in drying droplet of protein solutions. *Science China Technological Sciences*, 61:949–958, 2018.
- [112] Carlos Acuña, Alfonso Mier y Terán, Maria Olga Kokornaczyk, Stephan Baumgartner, and Mario Castelán. Deep learning applied to analyze patterns from evaporated droplets of viscum album extracts. *Scientific Reports*, 12(1):15332, 2022.
- [113] Carlos Acuña, Maria Olga Kokornaczyk, Stephan Baumgartner, and Mario Castelán. Unsupervised deep learning approach for characterizing fractality in dried drop patterns of differently mixed viscum album preparations. *Fractal and Fractional*, 7(10):733, 2023.
- [114] Heather Meloy Gorr, Ziyi Xiong, and John A Barnard. Pattern recognition for identification of lysozyme droplet solution chemistry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115:170–175, 2014.
- [115] A Pal, A Gope, and GS Iannacchione. Statistical image analysis of drying bovine serum albumin droplets in phosphate buffered saline. arxiv 2021. *arXiv preprint arXiv:2105.05922*.
- [116] Matjaz Bevk and Igor Kononenko. A statistical approach to texture description of medical images: a preliminary study. In *Proceedings of 15th IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS 2002)*, pages 239–244. IEEE, 2002.
- [117] Anusuya Pal, Amalesh Gope, and Germano S Iannacchione. Statistical image analysis of drying bovine serum albumin droplets in phosphate buffered saline. *Biomedical Data Mining for Information Retrieval: Methodologies, Techniques and Applications*, pages 213–235, 2021.
- [118] Kunio Takeda, Akira Wada, Kazuo Yamamoto, Yoshiko Moriyama, and Koichiro Aoki. Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment. *Journal of Protein Chemistry*, 8:653–659, 1989.
- [119] Vladimir N Novikov and Alexei P Sokolov. Temperature dependence of structural relaxation in glass-forming liquids and polymers. *Entropy*, 24(8):1101, 2022.
- [120] Jörn WP Schmelzer, Timur V Tropin, and Christoph Schick. Effects of structural relaxation of glass-forming melts on the overall crystallization kinetics in cooling and heating. *Entropy*, 25(11):1485, 2023.
- [121] Robert D Deegan, Olgica Bakajin, Todd F Dupont, Greb Huber, Sidney R Nagel, and Thomas A Witten. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 389(6653):827–829, 1997.
- [122] Peter J Yunker, Tim Still, Matthew A Lohr, and AG Yodh. Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions. *nature*, 476(7360):308–311, 2011.

- [123] Yanshen Li, Cunjing Lv, Zhaohan Li, David Quéré, and Quanshui Zheng. From coffee rings to coffee eyes. *Soft matter*, 11(23):4669–4673, 2015.