



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

*Estudio de Propiedades dinámicas de
sistemas acuosos sobre-enfriados*

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Ciencias Físicas

por *Guillermo A. Frank*

Director de Tesis: Dr. Horacio R. Corti

Dr. Mario C. Marconi

Lugar de Trabajo: Depto. Física – FCEyN - UBA

1 de agosto de 2008

Estudio de Propiedades dinámicas de sistemas acuosos sobre-enfriados

Resumen

Este trabajo de Tesis aborda la problemática del transporte molecular en medios sobre-enfriados, cercanos a la transición vítrea. En esas condiciones, la relación entre los tiempos de relajación estructural y la difusión molecular no puede ser descrita por los modelos de líquidos comunes. La relación clásica de Stokes-Einstein $D \sim \eta^{-1}$, entre difusión molecular D y viscosidad del medio η , queda invalidada. Ocurre un *desacople* entre la movilidad molecular (*i.e.* de solutos disueltos) y la viscosidad del solvente.

A lo largo de los capítulos siguientes se estudió este fenómeno para solutos de distinto tamaño en sistemas modelo de sacarosa y trehalosa acuosa. Se procedió a determinar experimentalmente la difusión de solutos fluorescentes por medio de la metodología FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) para distintas concentraciones de disacárido en agua. Los resultados obtenidos se interpretaron a la luz de modelos teóricos existentes para líquidos sobre-enfriados (teoría del acoplamiento de modos, modelo de Adam-Gibbs, modelo del volumen libre, etc.). Se estudió el papel de las heterogeneidades *estructurales* del sistema en el grado de *desacople* entre D y η . Finalmente, se desarrolló un modelo simple que permite explicar este fenómeno.

Palabras clave: líquidos sobre-enfriados, Stokes-Einstein, desacople, sacarosa, trehalosa.

Dynamic properties of aqueous supercooled systems

Abstract

The dissertation deals with the molecular transport phenomena in supercooled media, close to the glass transition. Under supercooling conditions, standard hydrodynamic models cannot be used to describe the relationship between structural relaxation time and molecular diffusion. The usual Stokes-Einstein relation $D \sim \eta^{-1}$ for molecular diffusion D and viscosity η no longer holds. It appears to be a *decoupling* between molecular mobility (*i.e.* of the dissolved solute) and the solvent's viscosity.

Decoupling phenomena for solutes of different sizes in aqueous sucrose and trehalose matrices was analyzed. First, fluorescent probe diffusion was measured using the FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) technique for different concentrations of disaccharides in water. The experimental results were then contrasted with conventional supercooled liquid theories (*i.e.* mode coupling theory, Adam-Gibbs theory, free volume theory, etc.). Second, the role of the system *structural* heterogeneities on the degree of *decoupling* between D and η was determined and a simple model explaining the decoupling phenomena was developed.

Keywords: supercooled liquids, Stokes-Einstein, decoupling, sucrose, trehalose.

A mi familia y mis amigos José María Cordero y César Moreno.

¹Escrito en L^AT_EX.

Contenidos

1	Introducción y objetivos	1
1.1	Introducción	1
1.2	Objetivos	2
2	Antecedentes	4
2.1	Difusión de solutos	4
2.2	La viscosidad	7
2.3	Consideraciones finales	16
3	Parte Teórica	18
3.1	Teorías de la viscosidad y difusión	18
3.1.1	Teoría de los dominios cooperativos para la viscosidad	18
3.1.2	Teoría del acoplamiento de modos (MCT) para la viscosidad	21

3.1.3	Teoría del volumen libre de Cohen-Turnbull-Grest para la difusión	25
3.2	Relación entre viscosidad y difusión	27
3.2.1	Relaciones generales	27
3.2.2	Modelos de <i>desacople</i> viscosidad-difusión	29
3.3	Análisis de las teorías usadas	33
3.3.1	Validez de la teoría WLF	33
3.3.2	Relación entre WLF y MCT	34
3.3.3	Validez del modelo hidrodinámico de Stokes	36
3.4	Consideraciones finales	40
4	Método FRAP: descripción experimental y solución alternativa	42
4.1	Introducción	43
4.2	Arreglo Experimental	44
4.3	El procedimiento FRAP	48
4.4	La función de recuperación de la fluorescencia	51
4.5	Una solución alternativa para función de recuperación de fluorescencia en FRAP	54
4.5.1	Teoría	54
4.5.2	Análisis numérico	59

<i>CONTENIDOS</i>	iii
4.5.3 Resultados y discusión	62
4.5.4 Conclusiones	69
5 Resultados de difusión en sacarosa y trehalosa acuosa	71
5.1 Difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa.	71
5.1.1 Introducción	71
5.1.2 Tratamiento de los datos	77
5.1.3 Resultados	80
5.2 Difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de trehalosa	87
5.2.1 Introducción	87
5.2.2 Resultados	90
5.3 Difusión de dextrano-fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa	97
5.3.1 Introducción	97
5.3.2 Resultados	97
6 Discusión de los resultados y conclusiones	100
6.1 Movilidad de fluoresceína y otros solutos en soluciones acuosas de saca- rosa sobre-enfriadas	100

6.2	Movilidad de fluoresceína y otros solutos en soluciones acuosas de trehalosa sobre-enfriadas	103
6.3	Movilidad de dextrano-fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa sobre-enfriadas	109
6.4	Conclusiones finales y perspectivas	112
A	Datos de agua pura	116
B	Datos de soluciones de trehalosa	119
C	Datos de soluciones de sacarosa	122
D	Complementos sobre la fluoresceína	125
D.1	Coefficiente de fricción de la fluoresceína	125
D.2	Esfericidad de la fluoresceína	128
D.3	Hidratación de la fluoresceína	129
E	Complementos sobre el desacople	132
E.1	Viscosidad de la mezcla disacárido-agua	132
E.2	Explicación complementaria sobre el <i>desacople</i>	134

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1.1 Introducción

El objetivo de investigar las propiedades de no-equilibrio en sistemas acuosos en el régimen sobre-enfriado es dilucidar algunos de los aspectos relativos a la dinámica de deterioro de biomoléculas en matrices de azúcares-agua. Las propiedades de transporte en estos sistemas acuosos sobre-enfriados son fundamentales para predecir el tiempo de vida de especies lábiles. Conocer sus características difusionales es vital para un mejor control y predicción de la estabilidad de biomateriales. Es directo el interés que estos estudios tienen en el campo de la tecnología de alimentos, fármacos, etc.

Desde el punto de vista básico, es de destacar que las propiedades de los sistemas líquidos sobre-enfriados cerca de la transición vítrea es uno de los campos de mayor actividad dentro de la Fisicoquímica de materia condensada. En particular, hay un creciente interés en el estudio tanto experimental como de simulación computacional

de procesos que ocurren en estos sistemas que presentan inhomogeneidades tanto estructurales como dinámicas.

1.2 Objetivos

Dentro del marco planteado en la Introducción, la presente Tesis tiene como objetivo general estudiar los procesos de transporte de moléculas en sistemas acuosos de interés práctico, y se focalizará en dar respuesta a los siguientes interrogantes,

- ¿Cuál es el alcance de los modelos de continuo en la descripción del transporte de moléculas en fluidos sobre-enfriados? Es decir, hasta que punto resultan válidas las relaciones hidrodinámicas *clásicas* en el régimen de no-equilibrio, cercano a la transición vítrea.
- ¿Cómo es la interacción soluto-solvente en los sistemas acuosos de interés y cuál es su relevancia en relación con el transporte de moléculas en esos sistemas? En este marco, es sumamente importante dar una descripción del escenario microscópico que rodea al soluto y vincularlo con magnitudes macroscópicas medibles.
- Las propiedades de transporte molecular, ¿son las mismas en solutos grandes y pequeños, respecto del solvente?
- ¿Es posible predecir el transporte molecular en las cercanías del estado sólido amorfo con modelos alternativos de movilidad?

Para responder todas estas preguntas se procederá a medir la difusión de solutos en sistemas modelo de disacárido en agua. La dependencia de este coeficiente de trans-

porte con la viscosidad de la solución es de máxima relevancia. Por un lado, permite conocer mejor el rango de validez de los modelos clásicos. Por otro, es necesaria para evaluar modelos de transporte alternativos.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Difusión de solutos

El transporte de un soluto inmerso en un solvente está caracterizado por el coeficiente de difusión D . Según la ecuación de Einstein-Smoluchowski, éste representa el desplazamiento cuadrático medio por unidad de tiempo (ver Capítulo 3), es decir,

$$D \sim \frac{\langle \Delta \mathbf{r}^2 \rangle}{\Delta t} \quad (2.1)$$

En el caso de partículas rígidas esféricas inmersas en un líquido, D se relaciona inversamente con la viscosidad η del solvente a través de la relación fundamental de Stokes-Einstein [1],

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R} \quad (2.2)$$

donde K es la constante de Boltzmann, T la temperatura, η es la viscosidad del solvente y R es el radio hidrodinámico del soluto (cfr. Capítulo 3). La constante 6π corresponde a la condición de adherencia del solvente en el contorno del soluto. Bajo la condición de deslizamiento, su valor es 4π .

La expresión (2.2) es válida en el equilibrio termodinámico y supone que el soluto no rota. Además se demostró experimentalmente que R debe tomar en cuenta la hidratación molecular del soluto [1].

La evidencia experimental muestra un apartamiento de la relación $D \sim \eta^{-1}$ para solutos de tamaño menores a similares al del solvente. Jordan y Bauer [2] en 1959, e Hikita *et al.* [3] tiempo después observaron que la difusión de oxígeno en sacarosa acuosa se correlacionaba con la viscosidad de la solución por medio de la relación $D \sim \eta^{-2/3}$. El exponente $2/3$ ya había sido obtenido por Hiss y Cussler [4] para la difusión de solutos pequeños en una gran cantidad de solventes puros (hidrocarburos). La universalidad de estos resultados mostró que la violación de (2.2) no dependía de si el solvente era puro, o una mezcla. Más bien, era consecuencia de la relación de tamaños entre el soluto y las moléculas de solvente.

Muchos autores [5]-[8] llevaron a cabo experimentos detallados en sacarosa acuosa (para distintas fracciones en peso de azúcar/solución $\% \omega/\omega$), variando el tamaño del soluto. En la Tabla 2.1 y en la Figura 2.1 se resumen sus resultados. En general, obtuvieron exponentes algo mayores que $2/3$ y que se incrementaba conforme aumentaba el tamaño del soluto. En el caso de fluoresceína, la relación de Stokes-Einstein se cumple para un amplio rango de D . Sin embargo, en la región de muy alta viscosidad aparece un *desacople* entre D y η . La forma detallada del *desacople* se muestra en la Figura 2.2. Champion *et al.* [9] determinaron el punto en que se produce el *desacople*, en

Tabla 2.1: Exponente a correspondiente a la relación $D \sim \eta^{-a}$ para distintos solutos. Los valores fueron obtenidos para soluciones de sacarosa acuosa a $T \approx 298$ K. Los radios hidrodinámicos surgen de la relación de Stokes-Einstein $R = KT/(4\pi\eta D)$ (condición de deslizamiento). En el caso de fluoresceína, R se tomó de la referencia [14] y el valor de a corresponde a la línea continua de la Figura 2.2.

Nombre	Fórmula	P.M. (g)	R (Å)	a
Metanol [7]	CH ₃ -OH	32	2,35	0,66
Acetonitrilo [7]	CH ₃ -CN	41	2,25	0,69
Etanoato de etilo [6]	CH ₃ -COO-CH ₂ -CH ₃	88	3,11	0,72
Etanoato de pentilo [6]	CH ₃ -COO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	130	3,75	0,90
Ferrocenometanol [8]	C ₁₁ H ₁₂ FeO	216	4,20	0,92
Fluoresceína [9, 14]	C ₂₀ H ₁₂ O ₅	332	5,02	≈ 1

términos de una temperatura reducida T/T_g , escalada por la temperatura de transición vítrea T_g . Es decir, la temperatura en que se produce una transición, acompañada de *cambios marcados en la respuesta termodinámica*¹. Hallaron que para $T_g/T > 0,86$ aparecía abruptamente el *desacople*. La magnitud del desacople no pudo ser explicada por cambios en la conformación espacial de la fluoresceína. También se observó este desacople para seis diferentes solutos en el solvente puro o-terfenilo [12].

En las soluciones acuosas de trehalosa se estudió la difusión tanto de sales simples (NaCl, LiCl) como de óxido de polietileno (PEO) [13]. Este último es un polímero de alto peso molecular (35.000 g/mol). En la Figura 2.3 se muestra la relación difusión-viscosidad de PEO. Es claro que para este soluto se cumple la relación de Stokes-Einstein. Sin embargo, las viscosidades no son lo suficientemente elevadas como para saber si ocurre un desacople cerca de la transición vítrea.

¹Ésta es una definición general dada por Angell [10]. En un sentido teórico, T_g marca el pasaje de un estado ergódico a uno no-ergódico. Desde el punto de vista experimental, es aproximadamente la temperatura en la cual el tiempo de relajación τ es del orden de 100 s [11]. Una definición calorimétrica la establece como aquella en la que se produce un salto en C_p durante un barrido lento, siguiendo algún protocolo predeterminado. Esta última es la que se usará en adelante.

Los resultados hasta la fecha se pueden resumir en tres tipos de escenarios. En el escenario de solutos pequeños respecto del solvente (azúcar-agua), la relación de Stokes-Einstein no se cumple desde viscosidades muy cercanas a la del agua. Las evidencias experimentales muestran que $D \sim \eta^{-a}$ es una relación más apropiada y que $a < 1$. En el escenario en que el soluto tiene un tamaño semejante al solvente, el exponente a se acerca a la unidad. A pesar de ello, se encuentra que existe una temperatura crítica (mayor a T_g) a partir de la cual, la relación de Stokes-Einstein pierde validez abruptamente, aunque sigue valiendo una expresión del tipo $D \sim \eta^{-a}$ con $a < 1$. La difusión traslacional resulta mucho mayor que la esperada. No hay evidencia experimental para saber si esto también ocurre en escenarios en que los solutos son mucho mayores al solvente, al menos para las mezclas disacárido-agua.

En el caso de soluciones de sacarosa, la temperatura crítica $T_g/T_c \approx 0,86$ del desacople coincide aproximadamente con un cambio de régimen para la viscosidad η . La viscosidad sigue una ley de potencias cerca de T_c ($T > T_c$). En la región del desacople ($T < T_c$), su comportamiento está dado por la ecuación fenomenológica de Williams, Landel y Ferry (WLF).

2.2 La viscosidad

Se desprende de la discusión anterior que la viscosidad de la solución es muy importante para analizar la movilidad de solutos, especialmente en la región sobre-enfriada, cerca de la transición vítrea. En esta sección analizaremos qué se conoce acerca del comportamiento de la viscosidad en soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa en función de la temperatura y la concentración.

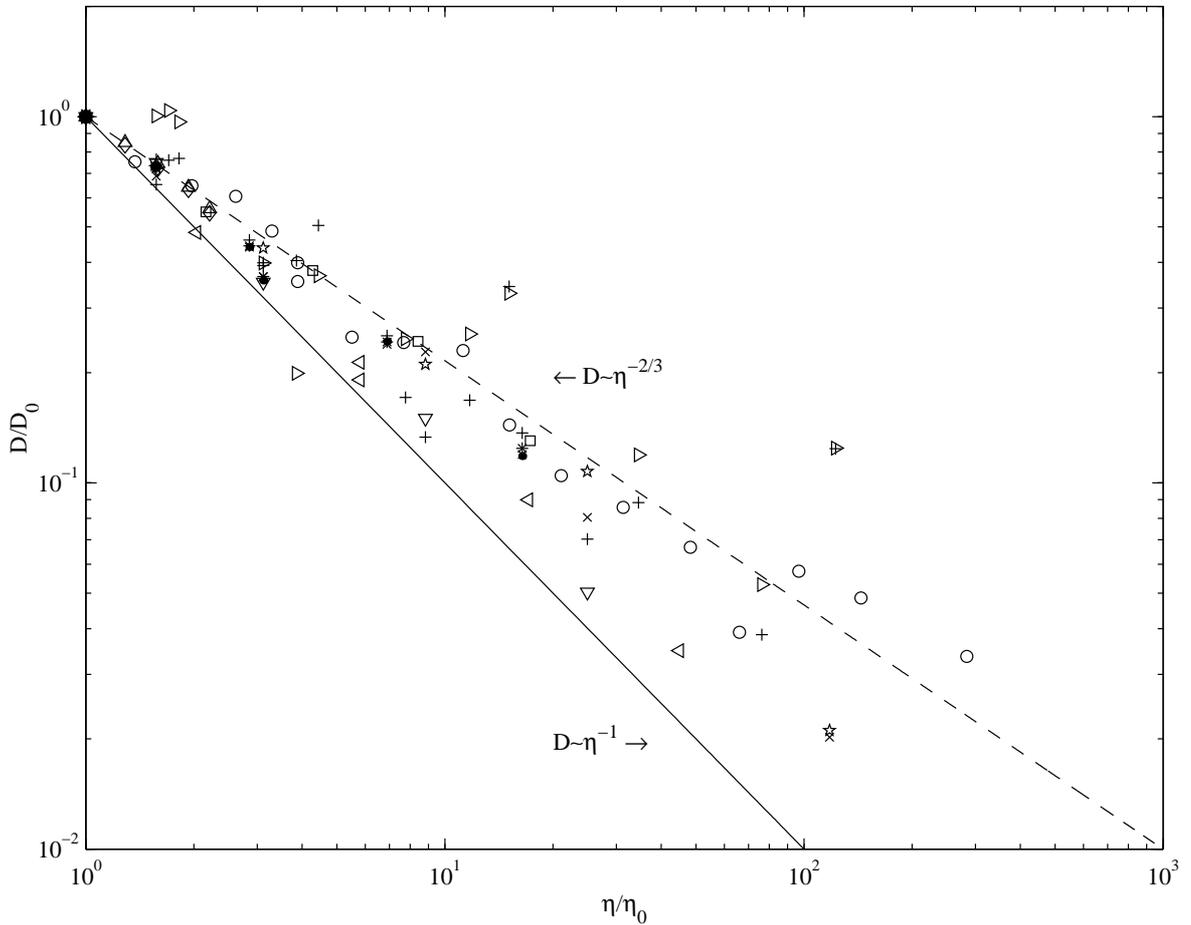


Figura 2.1: Relación entre la difusión de trazas (D) y la viscosidad (η) de soluciones de sacarosa acuosa. D_0 es la difusión del soluto en agua a dilución infinita. η_0 es la viscosidad del agua. Las observaciones corresponden a $T_g/T < 0,86$. Los datos representan los siguientes solutos: \circ Xe [5], \square O_2 [3], \triangle metanol (CH_3OH) [7], ∇ etanol (CH_3-CH_2-OH) [15], \triangleright n-hexanol ($CH_3(CH_2)_5OH$) [16], \star n-hexanal ($CH_3(CH_2)_4CHO$) [15], \diamond etanonitrilo (CH_3-CN) [7], $+$ etanoato de etilo ($CH_3-COO-CH_2-CH_3$) [6, 15, 16], $*$ n-etanoato de propilo ($CH_3-COO-(CH_2)_2-CH_3$) [6], \times n-etanoato de butilo ($CH_3-COO-(CH_2)_3-CH_3$) [6, 15], \bullet n-etanoato de pentilo ($CH_3-COO-(CH_2)_4-CH_3$) [6] y \triangleleft ferrocenometanol ($C_{11}H_{12}FeO$) [8]. La línea continua muestra la relación de Stokes-Einstein para un amplio rango de coeficientes de difusión. La línea a trazos guía la vista para la ley experimental $D \sim \eta^{-2/3}$. En aquellas referencias en que no figuraban las viscosidades, se usó la expresión (2.5) de Génotelle para las mezclas sacarosa-agua y las Tablas A.1 y A.2 para la viscosidad de agua pura. En aquellas referencias en que no figuraba D_0 , se obtuvo por extrapolación de D .

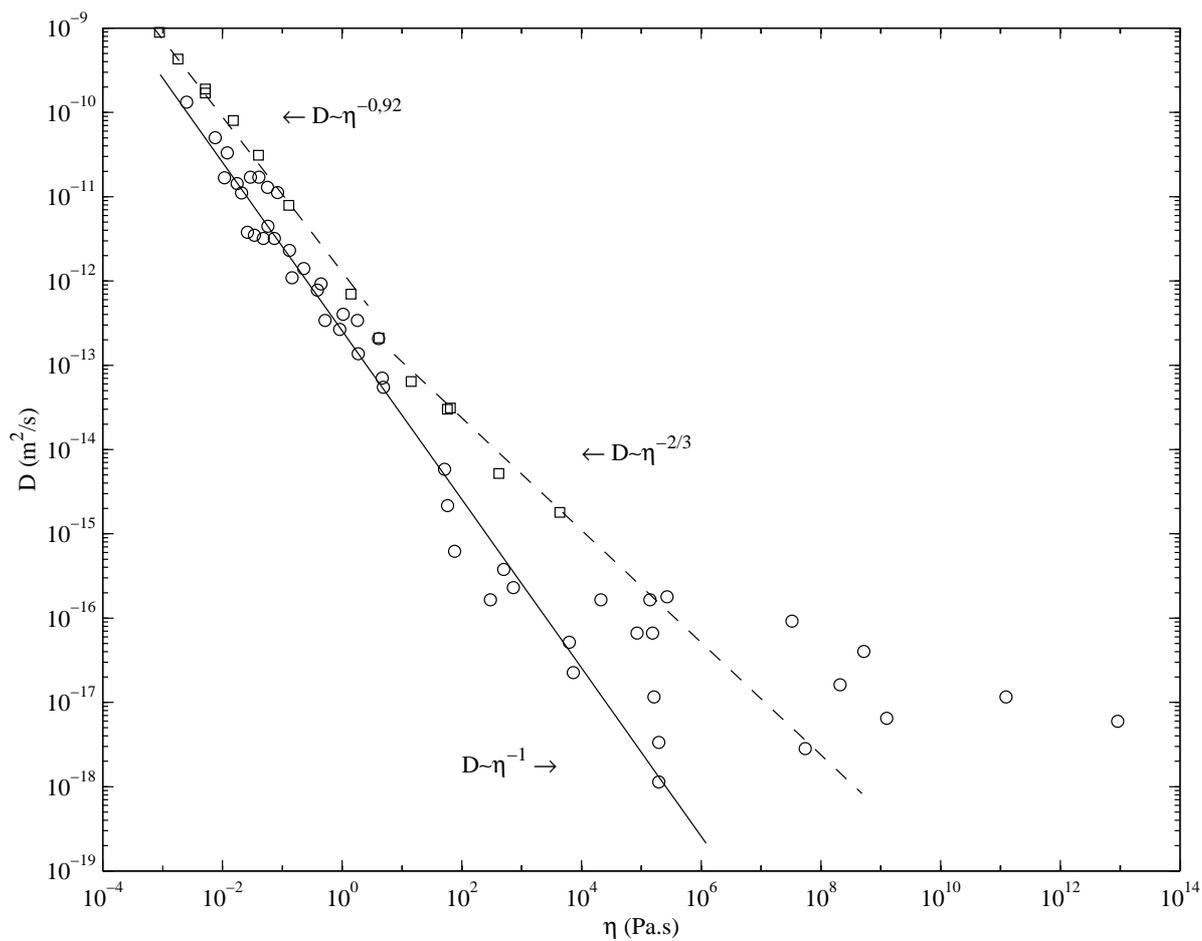


Figura 2.2: Relación entre la difusión de trazas (D) y la viscosidad (η) de soluciones de sacarosa acuosa. Los datos representados corresponden a trazas de fluoresceína ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$), medido por Champion *et al.* [9]. La línea continua muestra la relación de Stokes-Einstein para un amplio rango de coeficientes de difusión. Las líneas a trazos guían la vista para las leyes experimentales $D \sim \eta^{-0.92}$ (línea superior) y $D \sim \eta^{-2/3}$ (línea inferior).

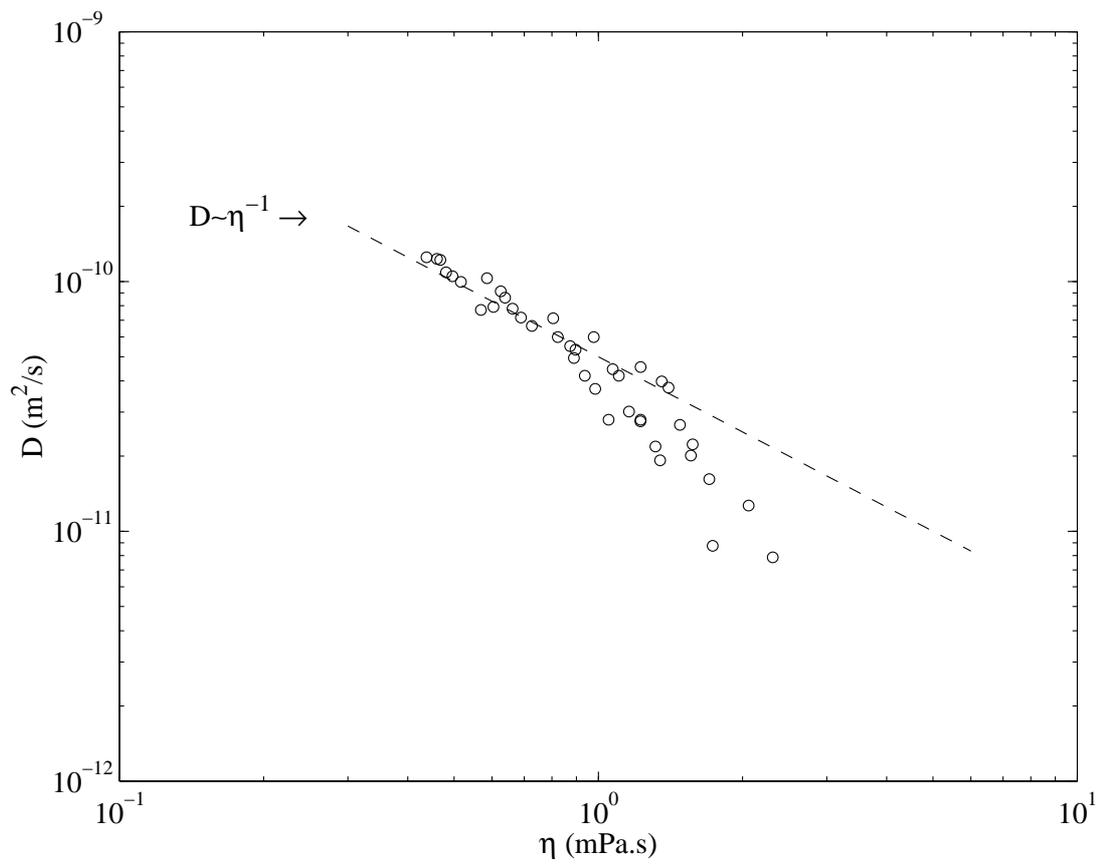


Figura 2.3: Relación entre la difusión de óxido de polietileno (D) y la viscosidad (η) de soluciones de trehalosa acuosa. Los datos fueron medido por Magazù *et al.* [13]. La línea de trazos muestra la relación de Stokes-Einstein.

Las primeras mediciones de la viscosidad en sacarosa acuosa comenzaron hacia principios del siglo XX. En las décadas del '40 al '60 [17, 18] se terminaron de elaborar las tablas actualmente vigentes (ver Tabla C.2). Los datos de viscosidad de trehalosa acuosa son más recientes [19]-[23] y están reunidos en la Tabla B.1.

En el régimen de muy baja viscosidad es válida la relación de Einstein [1],

$$\eta/\eta_0 = 1 + 2,5\phi \quad (2.3)$$

que vincula la fracción en volumen del disacárido (ϕ) con respecto a la viscosidad de la solución (η) y la del agua pura (η_0).

Muchos trabajos obtuvieron otras expresiones empíricas, típicamente de la forma,

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + \nu\phi + c\phi^2 + \dots \quad (2.4)$$

Mathlouthi [24] resumió estos resultados, la mayoría derivados de las relaciones originales de Einstein [1], Huggins [25] y Kraemer [26]. En 1978 Génotelle [24, 27] obtuvo una expresión para soluciones de sacarosa en el amplio rango de concentraciones de 0-85% ω/ω y temperaturas de 283 K a 353 K ²,

$$\log_{10} \eta(s, t) = 22,46 f(s) + 1,1\phi(t) + 43,1\phi(t)f^{1,25}(s) - 0,114 \quad (\log_{10} \text{ mPa.s}) \quad (2.5)$$

²Tiene un error menor a $\pm 1\%$ y es actualmente el *standard* adoptado por la *International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis* (ICUMSA).

$$f(s) = \frac{s}{1900 - 18s} \quad , \quad \phi(t) = \frac{30 - t}{91 + t} \quad (2.6)$$

siendo t ($^{\circ}C$) la temperatura y s la concentración de sacarosa en $\% \omega/\omega$ (fracción en peso sacarosa/solución).

La viscosidad de las mezclas sacarosa-agua *no* sigue un comportamiento tipo Arrhenius, o sea, $\log_{10} \eta \sim 1/T$. En 1985 Angell [28] clasifica este tipo de materiales super-Arrhenius como *frágiles* con respecto a la relajación en viscosidad. La viscosidad está relacionada con el tiempo de relajación τ por medio de la relación de Maxwell $\eta = G_{\infty} \tau$ (G_{∞} es el módulo de rigidez instantáneo). Este concepto señala que en un rango cercano a T_g , la viscosidad (o equivalentemente, la relajación τ) puede aumentar varios ordenes de magnitud [29], contrario a lo que ocurre en el régimen de baja concentración de sacarosa y alta temperatura (ver Figura 2.4). El mismo comportamiento muestran las soluciones acuosas de trehalosa (Figura 2.5).

Soesanto y Williams [30] señalaron que entre los coeficientes de una ecuación que describa la viscosidad debe figurar T_g y $\eta_g = \eta(T_g)$. Por este motivo introdujeron exitosamente en 1981 la ecuación de Williams, Landel y Ferry (WLF) (publicada originalmente en la referencia [31]), apoyada en las teorías del volumen libre (cfr. Capítulo 3),

$$\log_{10} \left(\frac{\eta}{\eta_g} \right) = \frac{C_1 (T - T_g)}{C_2 + (T - T_g)} \quad (2.7)$$

con $C_1 = -17,44$ y $C_2 = 51,6$. La teoría asigna validez a (2.7) en regiones próximas a T_g , por lo que el rango de aplicabilidad dado por Soesanto y Williams estuvo entre T_g

y $T_g + 100$ K.

La dependencia de la viscosidad con la concentración a T_g/T constante puede desprejarse [32]. Los ajustes en la Figuras 2.4 y 2.5 muestran cómo es posible obtener el mismo comportamiento (dentro del error experimental) para soluciones disacárido-agua de distinta concentración.

En 1988 Slade y Levine [33] establecieron, para soluciones de carbohidratos, que el rango de validez de WLF se corresponde bien con la diferencia $T_m - T_g$, donde T_m es la temperatura de fusión del carbohidrato (en su forma anhidro). Observaron que, en general, también se cumple que $T_m/T_g \approx 1,5$. En los casos en que esta relación no se cumple (por defecto o por exceso), la ecuación WLF es sólo posible con valores bien diferentes de C_1 y C_2 respecto de los *universales* detallados en (2.7). En el caso de sacarosa, el cociente T_m/T_g es 1,35-1,43 [30, 33] y para trehalosa da $\sim 1,25$, según datos de la referencia [34] y de la Tabla 5.4. En el análisis de Slade y Levine, un cociente bajo implica que WLF es válida sólo en un estrecho ámbito de temperaturas. Es posible que, debido a esto, la transición vítrea se alcance a viscosidades menores que las usuales ($\eta_g < 10^{12}$ Pa.s). Las soluciones con valores bajos de η_g se corresponden con altas T_g . Esto ocurre especialmente con las mezclas de trehalosa-agua, cuya T_g es elevada.

Las causas de que el régimen WLF sea más o menos estrecho son varias. Slade y Levine [33] señalan a la asimetría del carbohidrato (con sus moléculas asociadas) como una posible causa. En un ambiente de escaso volumen libre, la asimetría afecta su movimiento roto-translatorio y anticipa la transición vítrea. Magazù *et al.* [35] corroboraron experimentalmente esta hipótesis. Por otro lado, la capacidad de interactuar del disacárido (por medio de uniones puente H) altera la estructura de la mezcla,

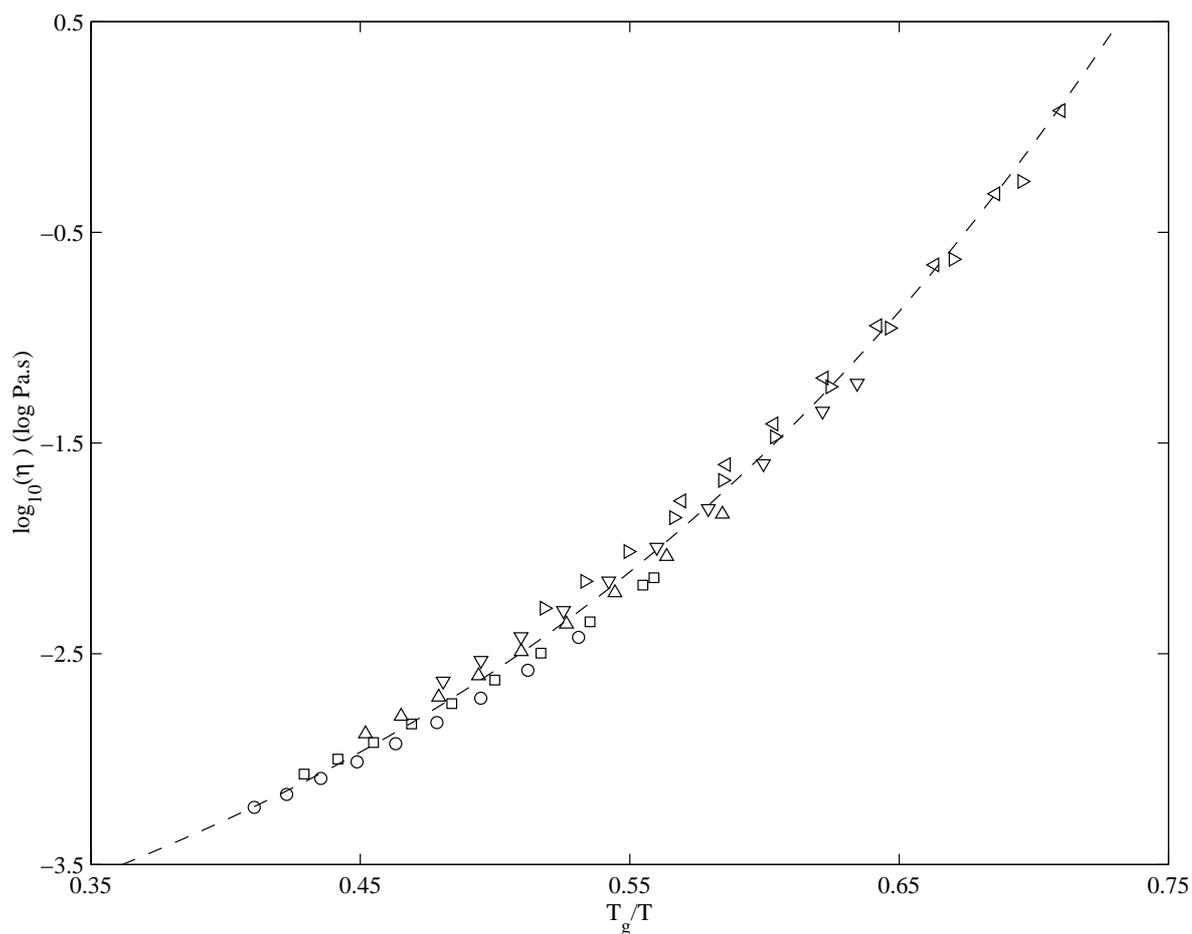


Figura 2.4: Logaritmo de la viscosidad en función de la temperatura reducida T_g/T para soluciones de sacarosa acuosa. La línea de trazos corresponde al ajuste experimental $\log_{10} \eta = 19,704.y^3 - 13,455.y^2 + 7,1778.y - 5.2678$ ($y = T_g/T$). T_g se interpoló según la relación $T_g = (\omega.338 K + 4,85.(1 - \omega) 135 K)/(\omega + 4,85.(1 - \omega))$, siendo ω la fracción en peso de sacarosa. Los datos representan las siguientes concentraciones en peso de sacarosa: \circ 20%, \square 30%, \triangle 40%, ∇ 50%, \triangleright 60% y \triangleleft 70%. Los datos y el ajuste experimental se reprodujeron de la referencia [32].

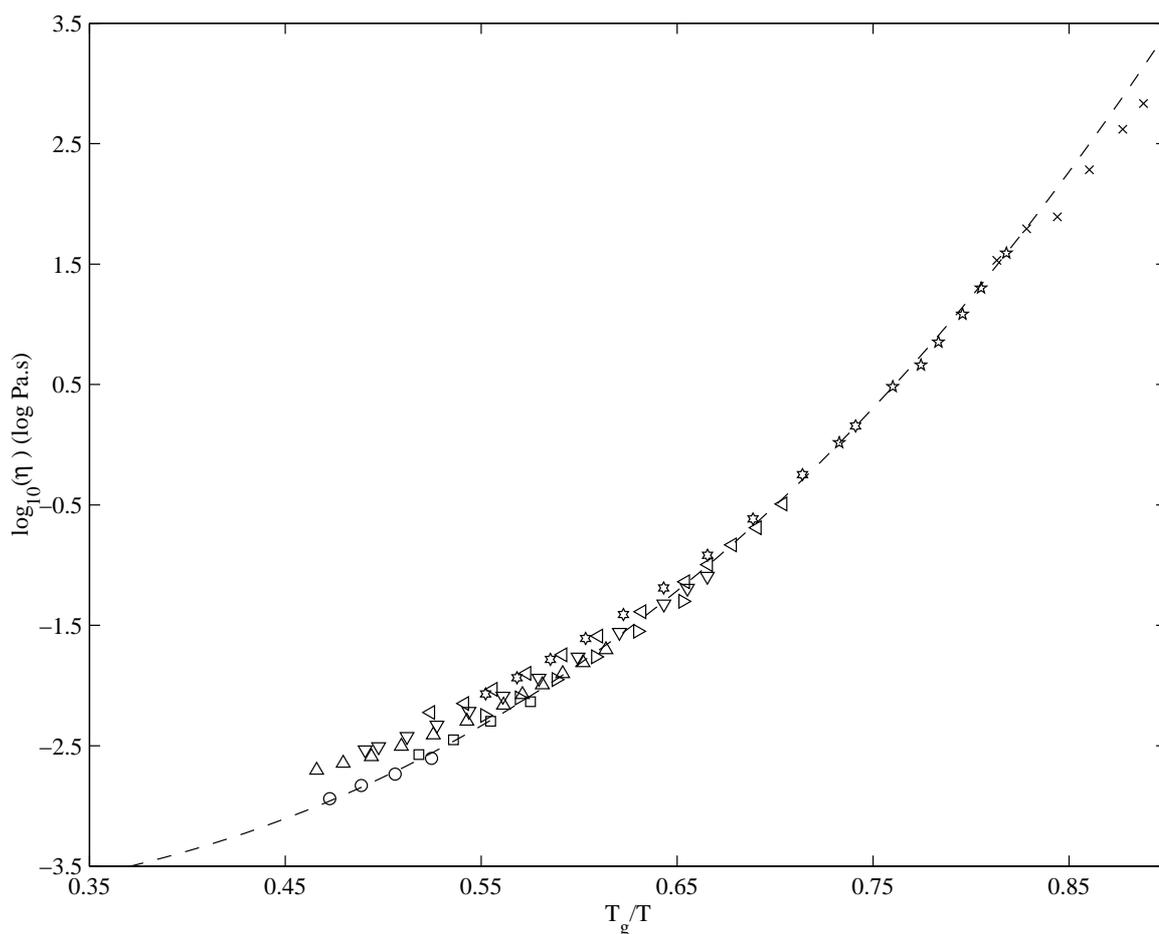


Figura 2.5: Logaritmo de la viscosidad en función de la temperatura reducida T_g/T para soluciones de trehalosa acuosa. La línea de trazos corresponde al ajuste experimental $\log_{10} \eta = 7,9108.y^3 + 4,4126.y^2 - 2,6518.y - 3,5265$ ($y = T_g/T$). T_g se interpoló según la relación $T_g = (\omega.388 K + 5,21.(1 - \omega) 138 K) / (\omega + 5,21.(1 - \omega))$, siendo ω la fracción en peso de trehalosa. Los datos representan las siguientes concentraciones en peso de trehalosa: \circ 10%, \square 30%, \triangle 38,3%, ∇ 48,1%, \triangleright 50%, \triangleleft 54,9%, $*$ 60,6%, \star 65% y \times 72,5%. Los datos y el ajuste experimental se reprodujeron de la referencia [32].

afectando la viscosidad (cfr. referencia [36]). El disacárido, incluso, es capaz de formar *redes* de moléculas unidas por uniones puente H [21, 37, 38]. La trehalosa, en particular, puede cambiar su conformación espacial para interactuar mejor con moléculas de agua [36, 39].

2.3 Consideraciones finales

La difusión de solutos en el régimen WLF (cerca de la transición vítrea) es mayor que la predicha por Stokes-Einstein. Si el soluto es muy pequeño (respecto del solvente, azúcar-agua), es posible que difunda a través de *canales* formados entre *redes* de moléculas de solvente (cfr. referencias [21, 37]). Esto dependerá en gran medida de la capacidad de interacción del soluto con el solvente (uniones puente H, etc.).

Los solutos *atrapados* en recintos (debidos a moléculas de solvente) pueden difundir por *saltos* hacia otras regiones (*hopping process* [40]). Este proceso no parece estar claro aún [40], pero se sabe que los saltos ocurren luego de largos períodos dentro de los recintos. Tanto los solutos de tamaño comparable al solvente como los pequeños pueden estar sometidos a este proceso. Las simulaciones con partículas tipo Lennard-Jones muestran que el proceso de *saltos* conduce a un desacople entre viscosidad y difusión, especialmente para solutos pequeños respecto del solvente [40]. La existencia de este proceso conduce al fracaso de la teoría del acoplamiento de modos (MCT) en el régimen ultra-viscoso (ver Capítulo 3 y referencia [40]).

Aún en el caso en que el soluto esté fuertemente *ligado* al solvente (*i.e.* interacciones puente H) su movilidad puede ser superior a la predicha por Stokes-Einstein. En ese caso, la difusión está facilitada por movimientos de las *redes* de moléculas de solvente

[9]. Esto es compatible con el régimen WLF y las redes mencionadas son las llamadas *regiones cooperativas* (ver capítulo 3).

Capítulo 3

Parte Teórica

3.1 Teorías de la viscosidad y difusión

Las expresiones para la viscosidad η y la difusión D como función de T y T_g se apoyan en las teorías de los dominios cooperativos, del volumen libre y del acoplamiento de modos (MCT). Las dos primeras conducen a expresiones del tipo WLF para η y D , respectivamente. La MCT, en cambio, obtiene una ley de potencias para η . En los siguientes apartados se darán las principales expresiones para cada una.

3.1.1 Teoría de los dominios cooperativos para la viscosidad

La teoría de los dominios cooperativos de Adam y Gibbs [41] considera al sistema formado por N subsistemas independientes llamados regiones cooperativas (*Cooperatively rearranging regions*). En la Figura 3.1 (a) se muestra un esquema cualitativo.

Cada dominio contiene z moléculas. Esta cantidad puede variar desde un valor mínimo $z = z^*$ hasta $z \rightarrow \infty$.

Adam y Gibbs plantearon una función de partición de equilibrio isotérmica-isobárica para el sistema. A partir de ella dedujeron que la probabilidad media de transición de un estado del sistema a otro viene dada por la expresión,

$$\omega(T) \sim e^{-z^* \Delta\mu / (KT)} \quad (3.1)$$

siendo K la constante de Boltzmann, y $\Delta\mu = \mu' - \mu$ la diferencia entre el potencial químico molecular de los subsistemas en condición de tener una transición (μ') y el de los N subsistemas (μ). Se considera que $\Delta\mu$ es prácticamente independiente de T y z . El tamaño crítico z^* se determina como el cociente entre una entropía configuracional crítica S_c^* y la entropía configuracional del sistema S_c ($z^* = S_c^*/S_c$). La entropía configuracional es aquella asociada a las configuraciones (posiciones moleculares) del sistema.

El tiempo de relajación estructural del sistema es $\tau_\omega \sim \omega^{-1}(T)$. A su vez, la viscosidad se puede relacionar con τ_ω por medio de la relación de Maxwell $\eta \sim G_\infty \tau$ (donde G_∞ es el módulo de rigidez instantáneo y τ el tiempo de relajación maxwelliano) [42] siempre y cuando asimilemos $\tau \sim \tau_\omega$. Por lo tanto, esta teoría predice el siguiente comportamiento,

$$\frac{\eta(T)}{\eta(T_s)} = e^{C/(TS_c(T)) - C/(T_s S_c(T_s))} \quad (3.2)$$

donde $C = S_c^* \Delta\mu / K$ y T_s es alguna temperatura de referencia. Para que (3.2) se

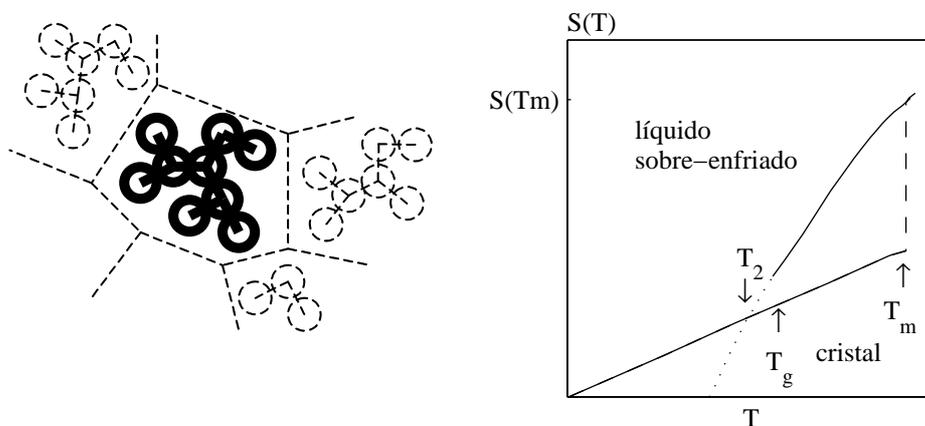


Figura 3.1: (a) A la izquierda, dominios cooperativos representados cualitativamente. Dentro de cada dominio las moléculas se consideran ligadas. Las líneas de trazos separan las celdas imaginarias de Voronoi. (b) A la derecha, representación cualitativa de la entropía S en función de la temperatura T para el régimen sobre-enfriado. T_m es la temperatura de fusión. La línea continua inferior representa un sistema cristalizado. La línea continua superior representa a un líquido sobre-enfriado. La línea punteada conduce a $S_c(T_2) = 0$ (ver texto).

pueda expresar en términos prácticos, Adam y Gibbs debieron relacionarla con la termodinámica asumiendo que cerca de T_g , $S_c(T) \approx S_l(T) - S_{cr}(T)$. S_l es la entropía de la fase líquida y S_{cr} la cristalina, según se muestra en la Figura 3.1 (b).

Esta diferencia se anula para alguna temperatura $T_2 < T_g$ en la que se esperaría que el sistema alcance una transición de fase de segundo orden. Bajo estas condiciones, y luego de alguna manipulación algebraica, se obtiene una ecuación del tipo de Williams-Landel-Ferry (WLF) [31],

$$\ln\left(\frac{\eta}{\eta_s}\right) = \frac{C_1(T - T_s)}{C_2 + (T - T_s)} \quad (3.3)$$

$$C_1 = -\frac{C}{\Delta C_p T_s \ln(T_s/T_2)} \quad , \quad C_2 = \frac{T_s \ln(T_s/T_2)}{\ln(T_s/T_2) + [1 + T_s/(T - T_s)] \ln(T/T_s)} \quad (3.4)$$

donde $S_c(T) \approx \Delta C_p \ln(T/T_2)$ y $\Delta C_p \approx C_p^l(T_g) - C_p^{cr}(T_g)$ es la diferencia de capacidades caloríficas entre la fase líquida y la cristalina (suponiendo que se mantiene constante en un entorno de T_g).

3.1.2 Teoría del acoplamiento de modos (MCT) para la viscosidad

La MCT estudia las fluctuaciones de la densidad ρ del sistema y trata de explicar muchos resultados obtenidos a través de experimentos de *scattering*. La magnitud de interés en estos experimentos es el espectro de relajación $\phi(\omega)$, o sea, la transformada de Fourier de la función de relajación $\phi(t)$. $\phi_k(t)$ corresponde a la autocorrelación normalizada $\phi_k(t) = \langle \rho_{-k}(0) \rho_k(t) \rangle / \langle \rho_{-k}(0) \rho_k(0) \rangle$ [43] (siendo k la componente de longitud de onda espacial).

En el espectro de relajación se encuentra una frecuencia $\omega_\alpha = 1/\tau_\alpha$ en la que aparece una resonancia, cuyo valor es muy sensible a los cambios de temperatura T . No se la puede relacionar con movimientos vibracionales o rotacionales moleculares, dado que éstos tienen frecuencias típicas mayores, del orden de $\omega_0 \approx 10^{12}$ a 10^{14} s^{-1} . El hecho de que ω_α dependa fuertemente de T permite intuir que tiene que ver con reacomodamientos estructurales colectivos del sistema.

La resonancia ω_α se desplaza hacia frecuencias menores, en la medida que enfriamos el

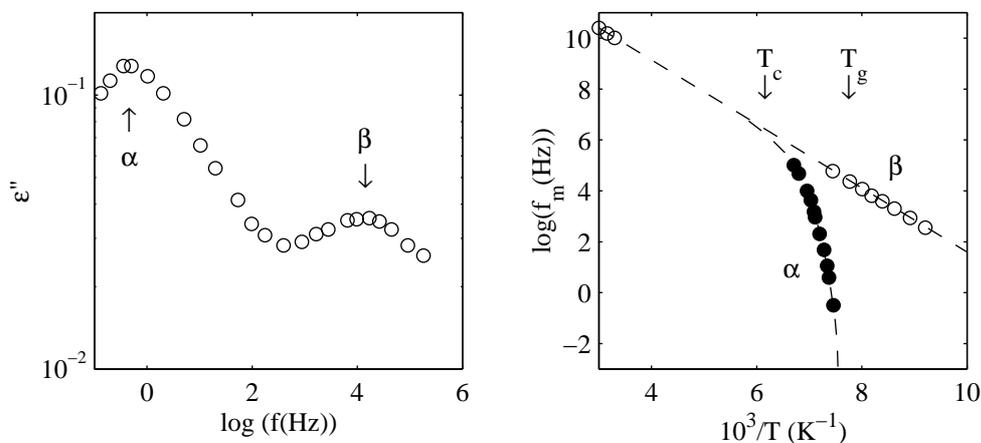


Figura 3.2: (a) A la izquierda, ejemplo de espectro de relajación dieléctrica para 17,2% fracción molar de cloruro de fenilo ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$) en cis-decahidronaftaleno ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}$) ($T = 133,7 \text{ K}$, $T_g = 131 \text{ K}$). Las pérdidas dieléctricas se relacionan con el espectro de relajación por medio de la relación $\epsilon'' \sim \omega\phi(\omega)$. Las flechas indican las frecuencias de resonancia para la relajación α y β . (b) A la derecha, la misma solución que en (a). Se representan las frecuencias de resonancia f_m en función de la temperatura. Las flechas muestran la temperatura crítica T_c de separación entre la relajación α y β , y la temperatura de transición vítrea T_g . Ambos gráficos fueron reproducidos de la referencia [44].

sistema. Pero a partir de cierta temperatura, las espectroscopías empiezan a mostrar una segunda resonancia. Es una resonancia más regular, pero también más débil que la que ocurre en ω_α . Se observa que esta nueva resonancia se da a una frecuencia $\omega_\beta > \omega_\alpha$ (ver el ejemplo de la Figura 3.2 (a)). La separación entre ambas frecuencias es más notoria conforme nos aproximamos a T_g .

Las tres resonancias que muestran las espectroscopías están vinculadas por la relación de orden $\omega_\alpha < \omega_\beta < \omega_0$. La resonancia β es intermedia a las otras dos, de manera que es razonable pensar que se relaciona con la dinámica de un grupo pequeño de moléculas, o sea, con una molécula y las de su entorno.

En la Figura 3.2 (b) se observa una región estrecha en la que se produce la separación entre la relajación α y la β . Podemos asociarla con la temperatura T_c de transición

entre un régimen líquido y otro más parecido al estado vítreo. A temperaturas altas ($T > T_c$) la resonancia β está *enmascarada* por la α , mientras que para $T \rightarrow T_g$ ambas se separan.

Para explicar la separación entre la relajación α y la β , la MCT parte de una ecuación de evolución temporal microscópica [43, 45] y llega a la expresión,

$$\ddot{\phi}(t) + \omega_0^2 \phi(t) + \int_0^t M(\tau) \dot{\phi}(t - \tau) d\tau = 0 \quad (3.5)$$

para un valor de k fijo. Las condiciones iniciales son $\phi(0) = 1$, $\dot{\phi}(0) = 0$. M es una función de memoria. En una primera aproximación se considera $M(t) = \lambda \omega_0^2 \phi^2(t)$ [45, 46] donde λ es un parámetro de control dependiente de la densidad y la temperatura del sistema.

La solución de (3.5) depende del valor de λ . En la Figura 3.3 (b) se ejemplifica una solución para $\lambda < 4$. τ_0 , τ_β y τ_α son tres escalas de tiempo necesarias para expresar la solución de (3.5). Estas tres relajaciones están relacionadas según [44],

$$\left\{ \begin{array}{l} \tau_\beta \sim (4 - \lambda)^{-1/(2a)} \cdot \tau_0 \quad , \quad 0 < a < \frac{1}{2} \\ \tau_\alpha \sim (4 - \lambda)^{-\gamma} \cdot \tau_0 \quad , \quad \gamma = \frac{1}{2a} + \frac{1}{2b} \quad , \quad 0 < b < 1 \end{array} \right.$$

El valor $\lambda_c = 4$ es un punto crítico (asociado a la temperatura crítica T_c). Cuando $\lambda \rightarrow \lambda_c$ (pero siendo $\lambda < \lambda_c$) se observa que $\tau_\alpha \rightarrow \infty$. El sistema ya no relaja completamente.

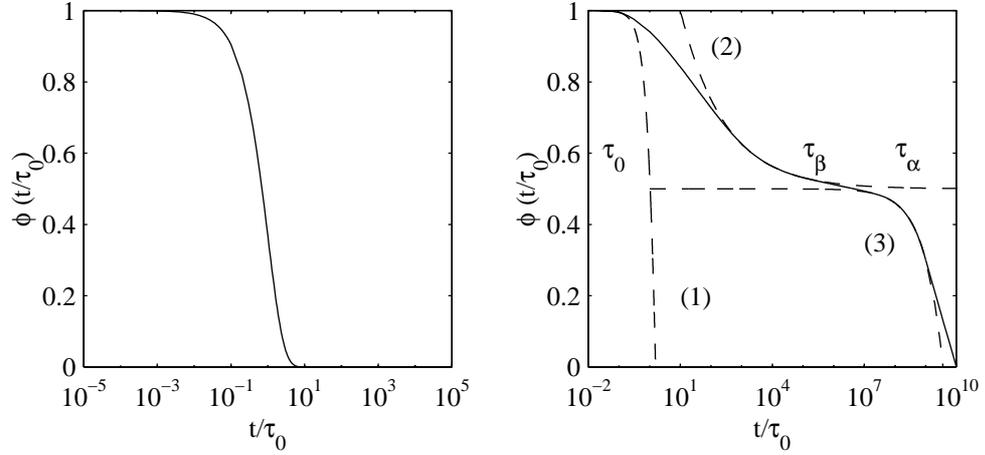


Figura 3.3: (a) A la izquierda, función de autocorrelación $\phi(t/\tau_0)$ característica de un sistema sin memoria. (b) A la derecha, autocorrelación según las soluciones de la MCT para $\lambda < \lambda_c$. Las curvas a trazos representan (1) movimientos vibracionales moleculares dados por $\phi(t) = \cos(\omega_0 t)$, (2) relajación β dada por $\phi(t) = 0.5 + \sqrt{0,001} (t/\tau_\beta)^{-0.3}$ y (3) relajación α dada por $\phi(t) = 0.5 - 0.01 (t/\tau_\alpha)^{0.7}$. τ_α y τ_β se definen en el texto. La línea continua representa cualitativamente la solución exacta de la MCT.

La viscosidad se relaciona con el tiempo de relajación por medio de la expresión de Maxwell $\eta \sim G_\infty \tau$ [42]. Cuando $T \rightarrow T_c^+$, domina la relajación α y es posible considerar $\tau \sim \tau_\alpha$. La viscosidad seguirá un comportamiento,

$$\eta \sim (T - T_c)^{-\gamma} \quad (3.6)$$

para $(T - T_c)/T_c \ll 1$.

La validez de (3.6) se extiende sobre un rango estrecho de temperaturas. Sólo vale si $T \rightarrow T_c^+$, cuando el grado de empaquetamiento del sistema es elevado. Por otro lado, la divergencia en T_c no es realista, por lo que en un muy estrecho entorno de ésta tampoco es aplicable. La ausencia de un comportamiento WLF ($\sim \exp(1/|\lambda - \lambda_c|)$ para $T > T_c$) se debe a que la MCT no toma en cuenta la existencia de regiones cooperativas [46].

3.1.3 Teoría del volumen libre de Cohen-Turnbull-Grest para la difusión

Cohen y Turnbull [47, 48], y Grest [49] plantearon un modelo basado en que,

- Es posible ubicar regiones en el sistema en donde las moléculas ocupan un cierto volumen específico v (*celdas*).
- Si éste es mayor que un valor crítico dado v_c , puede ocurrir un desplazamiento o reordenamiento dentro de esa región.
- El proceso de reordenamiento no requiere de energía libre porque se supone que el volumen libre medio total del sistema $v_f = v - v_c$ permanece constante.

Las celdas cuyo volumen es mayor que el volumen crítico ($v > v_c$) fueron asimiladas a un estado líquido. Las celdas en que $v < v_c$ fueron consideradas en estado condensado. Las celdas líquidas forman fragmentos (*clusters*) si están en contacto con al menos z celdas vecinas líquidas (en general, $z > 3$). Dentro de cada uno de estos fragmentos puede ocurrir reordenamientos, que son los que contribuyen a la *difusión*.

La teoría del volumen libre es básicamente una aproximación de campo medio [49] en la que la densidad de distribución de celdas de volumen v se obtiene minimizando la energía libre del sistema. Conocida esta distribución, se deduce [47, 49] que la contribución a la difusión de un fragmento líquido formado por ν celdas líquidas es,

$$D_\nu \sim e^{-v_m/\langle v_f \rangle} \quad (3.7)$$

donde v_m es el volumen molecular y $\langle v_f \rangle$ es el volumen libre medio de las celdas líquidas.

La difusión total del sistema (D) es la suma de las contribuciones parciales D_ν de cada fragmento líquido de tamaño $\nu = \nu_{\min}, \dots, \infty$, ponderadas por la distribución de fragmentos. En este punto, Cohen y Grest introducen la teoría de la *percolación* para determinar esta distribución. Observan que, cerca de la transición vítrea, el comportamiento de D no cambia mucho respecto de D_ν , resultando finalmente,

$$D = D_0 e^{-v_m/\langle v_f \rangle} \quad (3.8)$$

La aplicabilidad de (3.8) depende de la posibilidad de relacionar $\langle v_f \rangle$ con magnitudes termodinámicas. Típicamente se hace la aproximación [46] $\langle v_f \rangle \approx v_g \Delta\alpha(T - T_0)$ (siendo v_g el volumen en la transición vítrea). $\Delta\alpha = \alpha(T_g^+) - \alpha(T_g^-)$ es la diferencia de coeficientes de expansión térmica (a presión constante) antes y después de la transición vítrea [46]. En general, se tienen valores $\Delta\alpha \sim 5 \cdot 10^{-4} \text{ 1/}^\circ\text{K}$ y $0,3 \leq \alpha(T_g^-)/\alpha(T_g^+) \leq 0,5$. Si se realizan los reemplazos correspondientes, se llega a una ecuación de Fulcher-Tammann-Hesse,

$$D = D_0 e^{-B^*/(\Delta\alpha(T-T_0))} \quad (3.9)$$

con $B^* \cong 0,9 \pm 0,3$ [46].

3.2 Relación entre viscosidad y difusión

3.2.1 Relaciones generales

La movilidad de una partícula viene dada por el cociente entre su velocidad v y la fuerza externa aplicada f , es decir, $b = v/f$ [50]. Su inversa ($1/b$ ¹) es el coeficiente de fricción ζ . En el caso de una partícula grande, inmersa en un líquido que sigue un movimiento browniano, éste se relaciona con la función de autocorrelación de velocidad por medio del siguiente decaimiento exponencial [53],

$$\langle v(0) v(t) \rangle = \langle v^2 \rangle e^{-\zeta t/m} \quad , \quad t > 0 \quad (3.10)$$

La expresión (3.10) vale para cualquiera de las tres coordenadas cartesianas porque se supone homogeneidad del medio. La relación con la difusión D es inmediata, puesto que por definición [52],

$$D = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{6t} \langle |\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)|^2 \rangle = \int_0^\infty \langle v(0) v(t) \rangle dt = m \langle v^2 \rangle b \quad (3.11)$$

donde en la última igualdad se apeló a (3.10). Además se supuso que las moléculas del medio (solvente) son de dimensión mucho menor que nuestra molécula de prueba (solute) y que las colisiones son abundantes y rápidas, de manera que las fuerzas aleatorias se corresponden con un ruido blanco gaussiano.

Para vincular la expresión (3.11) con magnitudes termodinámicas es necesario plantear

¹No confundir este coeficiente de fricción con el usado en cierta literatura [51], en el que se asocia $m\zeta = 1/b$, siendo m la masa del soluto. Kubo distingue esta última, llamando $m\gamma = 1/b$ [52].

alguna distribución de equilibrio. Típicamente se usa la de Boltzmann [54], en la que $\langle v^2 \rangle = KT/m$ (m es la masa de la partícula, K la constante de Boltzmann y T la temperatura del sistema). En el caso de usar una estadística de Maxwell, la relación difiere en un factor constante $D = (4/3)KTb$ [55].

En general, el teorema de *fluctuación-disipación* asegura que el cociente entre la fluctuación (aquí representada por D) y la disipación (representada por b , también llamada función respuesta) es proporcional a T [56], es decir $D/b \sim T$. La relación de Stokes-Einstein (2.2) es un caso particular del teorema para sistemas en el equilibrio termodinámico, con solutos grandes y rodeados por un fluido (solvente). En ese caso, la fricción hidrodinámica de Stokes es $1/b = C\pi\eta R$ [50], siendo R la dimensión característica del soluto y η la viscosidad dinámica del solvente. Si la partícula es esférica, R coincide con su radio. En el caso de un elipsoide, dependerá de su orientación respecto de su velocidad translacional y de su relación de semi-ejes mayor a menor [50, 57]. La constante C depende de las condiciones de contorno soluto-solvente ($C = 4$ para resbalamiento y $C = 6$ para adherencia).

En el caso de sistemas metaestables (régimen sobre-enfriado), muy cerca del equilibrio y suponiendo linealidad en la respuesta del sistema, la relación de Stokes-Einstein (2.2) toma una forma más general, donde la movilidad es dependiente de la frecuencia [52]. Fuera del equilibrio y cerca el estado vítreo, es posible definir una temperatura efectiva T_f , de manera que $D/b \sim T_f$ [58]. T_f depende de la escala de tiempos (o equivalentemente, de la frecuencia) y es mayor que T [58].

3.2.2 Modelos de *desacople* viscosidad-difusión

En la literatura de los últimos años encontramos muchos modelos que explican la ruptura de la relación de Stokes-Einstein (Ec. (2.2)). Muchos de ellos se basan en modelos de redes de nodos fijos.

Jung *et al.* [59] y Garrahan y Chandler [60] analizaron el comportamiento de una hilera de *spines*, del tipo ... $\uparrow\downarrow\uparrow\downarrow\downarrow\uparrow$ Su dinámica viene dada por la regla de que un dado *spin* puede cambiar de estado si el *spin* a su izquierda está en el estado $n_i = +1$. Esta restricción al movimiento le brinda *cooperatividad* al sistema y lo hace capaz de desplegar *dominios* (heterogeneidades) dinámicos.

La relajación estructural (τ) en la hilera de *spines* escala como una ley de potencias. Lo mismo ocurre con la difusión (partículas que van saltando entre sitios vecinos con *spin* \uparrow). Las simulaciones demuestran que a altas temperaturas $D \sim \tau^{-1}$, pero a bajas temperaturas $D \sim \tau^{-0,73}$. Es decir, se produce una violación de la relación de Stokes-Einstein atribuida a las fluctuaciones en las heterogeneidades. Este sistema *no* conserva la cantidad total de *spines* \uparrow y \downarrow [61] y, por lo tanto, no es del todo realista.

Díaz-Sánchez *et al.* [62] estudiaron una red bi-dimensional, formada por estructuras $\top, \perp, \vdash, \dashv$. Este sistema simula moléculas asimétricas con distintas orientaciones. Los resultados mostraron que tanto la relajación estructural como la difusión siguen una ley de potencias con un exponente $2,65 \leq \gamma \leq 2,70$,

$$\tau \sim (\rho_{\max} - \rho)^{-\gamma} \quad , \quad D \sim (\rho_{\max} - \rho)^{\gamma} \quad (3.12)$$

donde ρ es la fracción de nodos ocupados en la red y ρ_{\max} es la ocupación máxima

posible.

El modelo no viola la relación de Stokes-Einstein, pero sigue el comportamiento predicho por la MCT con un exponente cercano al valor de 2,58 anticipado por ésta para partículas esféricas [46].

Concluimos que la frustración del movimiento por asimetría molecular por sí sola no lleva al desacople entre viscosidad y difusión. En cambio, si observamos nuevamente el modelo de Jung *et al.* [59], advertimos que las restricciones capaces de generar cooperatividad en el sistema y que son formadoras de dominios, conducen a la ruptura de la relación de Stokes-Einstein.

Cicerone *et al.* [63] estudiaron una red cúbica simple, espacialmente heterogénea. En su modelo, una partícula podía saltar hacia nodos vecinos, permaneciendo un tiempo de relajación τ en cada nodo. La heterogeneidad consistió en asignar un tiempo de relajación τ_1 para algunas regiones *rápidas* (o *líquidas*) del sistema y otro τ_2 ($\tau_2 > \tau_1$), para regiones *lentas* (o *sólidas*). También se le asignó dinámica a cada región, cambiando su estado (*lento* o *rápido*) cada cierto tiempo τ' . En el caso de heterogeneidades estáticas ($\tau' = \infty$) el desacople entre la difusión y el tiempo de relajación medio del sistema aumentaba, en la medida que el sistema se volvía más heterogéneo (mayor τ_2/τ_1). Para τ_2/τ_1 constante, y variando τ' , el desacople *no* se maximizó cuando $\tau' \rightarrow 0$. Esto mostró que era necesario un mecanismo de fluctuación de las heterogeneidades espaciales para que se produzca el desacople (cf. Jung *et al.* [59] y Chandler [60]). El tiempo de relajación de ese mecanismo es difícil de determinar.

Además de los modelos de redes, existen teorías que proponen la existencia de dominios (heterogeneidades), cada uno con tiempos de relajación estructurales τ diferentes.

Tarjus y Kivelson [64] consideran que la relación de Stokes-Einstein es válida sólo dentro de cada dominio, pero que en la escala de tiempos experimentales, una molécula atraviesa un número grande de estos dominios. La difusión medida será un valor medio de la difusión en cada dominio.

El modelo de Tarjus y Kivelson [64] supone que existe una distribución de dominios dependiente de su tamaño $\rho(L)$. La probabilidad de encontrar a una molécula en un dominio de tamaño entre L y $L + dL$ es $\rho(L) L^2 dL$. Si la relajación estructural en cada medio sigue la relación $\tau \sim \exp[E(L)/KT]$ ($E(L)$ es una energía libre de activación), la viscosidad será,

$$\eta \sim \int_0^{\infty} dL L^2 \rho(L) e^{E(L)/KT} \quad (3.13)$$

En cambio, la difusión en cada dominio es proporcional a $T/\eta(L) \sim T \exp[-E(L)/KT]$.

La difusión medida es,

$$D \sim \int_0^{\infty} dL L^2 \rho(L) e^{-E(L)/KT} \quad (3.14)$$

Tarjus y Kivelson concluyen que la simple existencia de dominios es causa del desacople. Si la temperatura es suficientemente alta, desaparece el concepto de dominios (heterogeneidades) y se obtiene una relación de Stokes-Einstein.

Xia y Wolynes [65, 66] plantearon la existencia de heterogeneidades, pero *no* consideraron válida la relación de Stokes-Einstein dentro de cada dominio. En lugar de la movilidad de Stokes, usaron la expresión dada por Hodgdon y Stillinger. Ésta considera que la región adyacente a cada molécula ($r < L$) tiene una viscosidad local η , distinta

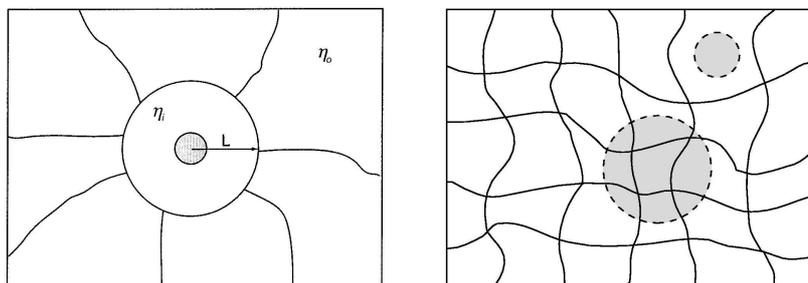


Figura 3.4: A la izquierda, partícula (gris) moviéndose en un dominio (L) de viscosidad η_i , distinta de la viscosidad media del sistema η_0 . A la derecha, diagrama de una distribución de heterogeneidades. En gris se muestran dos regiones, una más chica respecto de los dominios típicos, y otra mayor que ellos.

de la viscosidad macroscópica η_0 ($r > L$) (ver Figura 3.4). La expresión de la movilidad de un soluto de radio $R < L$ en este medio es,

$$b = \frac{1}{4\pi \eta_0 R f(l, \zeta)} \quad (3.15)$$

donde $f = f(l, \zeta)$ es una función conocida, $l = L/R$ y $\zeta = \eta_0/\eta$. La difusión dentro de cada dominio es KTb (ver Ec. (3.11)) y la difusión medida es el promedio sobre todas las heterogeneidades. A diferencia del modelo de Tarjus y Kivelson, la distribución de heterogeneidades depende de la entropía configuracional.

Los modelos de Tarjus y Kivelson, y de Xia y Wolynes son más realistas que el de Cicerone *et al.* en cuanto que admiten la existencia de una distribución de heterogeneidades, en lugar de sólo dos tipos de regiones [66]. Sin embargo, el modelo de Xia y Wolynes determina esa distribución a partir del espacio configuracional. Tarjus y Kivelson sólo hacen consideraciones sobre el volumen de las heterogeneidades.

3.3 Análisis de las teorías usadas

3.3.1 Validez de la teoría WLF

Williams *et al.* [31] obtuvieron valores experimentales constantes de C_1 y C_2 dentro del rango $T_g < T < T_g + 100 K$ en la Ec. (3.3). Sin embargo, en (3.4) se observa que C_2 depende de la temperatura T . Esto impone un límite al rango de aplicabilidad de (3.3). Si se usa la expansión $\ln(1+x) = x - x^2/2 + x^3/3 - x^4/4 + \dots$ [67], el coeficiente C_2 resulta,

$$C_2 \cong \frac{T_s \ln(T_s/T_2)}{\ln(T_s/T_2) + 1 + \frac{1}{2} \frac{T - T_s}{T_s} + O\left[\left(\frac{T - T_s}{T_s}\right)^2\right]} \quad (3.16)$$

La dependencia con la temperatura se pierde en la medida que $T \rightarrow T_s$. En general, Williams *et al.* [31] encontraron que las viscosidades para distintos materiales ajustaban mejor la ecuación (3.3) si se elige $T_s = T_g + 50 K$ en lugar de $T_s = T_g$. Los argumentos fueron de carácter experimental, pero se pueden complementar con el hecho de que una referencia a mitad de camino entre T_g y $T_g + 100 K$ estabiliza más el valor de C_2 , según (3.16).

Cuando se cambia la temperatura de referencia T_s en la ecuación (3.3), a otra $T_{s'}$, se obtiene una nueva ecuación WLF de parámetros [41, 68],

$$C'_1 = \frac{C_1 C_2}{C_2 - (T_s - T_{s'})} \quad , \quad C'_2 = C_2 - (T_s - T_{s'}) \quad (3.17)$$

donde C'_1 y C'_2 representan los parámetros definidos por $T_{s'}$. Es inmediato que $C'_1 C'_2 =$

$C_1 C_2$ y que $C'_2 - T_{s'} = C_2 - T_s$. Ambas expresiones son invariantes ante cambios de la temperatura de referencia. Las magnitudes,

$$B = -C_1 C_2 \quad , \quad T_\infty = T_s - C_2 \quad (3.18)$$

son parámetros constantes del sistema. La ecuación WLF (3.3) puede ser expresada en función de ellos [69, 70],

$$\ln \left(\frac{\eta}{\eta_{s^*}} \right) = \frac{B}{T - T_\infty} \quad (3.19)$$

que es la forma equivalente de Vogel-Fulcher-Tammann-Hesse. T_∞ es la temperatura de Vogel, es decir, aquella en la que $\eta \rightarrow \infty$. B se interpreta como una energía de activación del sistema.

Suele asociarse T_∞ con la T_2 dada por Adam y Gibbs. Sin embargo, a veces no coinciden ($T_2 < T_\infty$) debido a que $S_c < S_l - S_{cr}$, o sea, hay una fracción de esa diferencia que no contribuye con la movilidad. Por lo tanto, según Miller [71], lo correcto es considerar $S_c(T_\infty) = 0$. Esto no implica necesariamente que T_∞ deba ser interpretado como el punto de una transición de fase [46].

3.3.2 Relación entre WLF y MCT

Un desarrollo novedoso propuesto por Kumar [72] permite relacionar sencillamente la ecuación WLF con la viscosidad dada por MCT. Básicamente considera al sistema compuesto por partículas rígidas (sólidas) en un medio líquido. La dinámica de la

viscosidad viene dada por la ecuación de Einstein $\eta = \eta_0 (1 + \gamma \delta\phi)$, donde $\gamma = 2,5$ y $\delta\phi$ es una pequeña fracción en volumen de las partículas rígidas. Por cada $\delta\phi$ que se agrega en el sistema, éste se desplaza de su valor anterior $\eta(\phi)$ según la relación de Einstein,

$$\eta(\phi + \delta\phi) = \eta(\phi) \left(1 + \gamma \frac{\delta\phi}{1 - \phi} \right) \quad (3.20)$$

donde el denominador $(1 - \phi)$ garantiza que la fracción en volumen sea considerada respecto del volumen líquido. Más aún, el volumen líquido efectivo es más pequeño porque antes de llegar a $\phi = 1$ el sistema pasa al estado amorfo (en el lenguaje de *percolación*, es el punto en el que desaparece el último fragmento percolante). Según la MCT, este estado se alcanza para un cierto valor crítico $\phi_c < 1$. Entonces, se debe reemplazar el denominador por $(\phi_c - \phi)$. En el límite $\delta\phi \rightarrow 0$ resulta,

$$\frac{d\eta}{\eta} = \gamma \frac{d\phi}{\phi_c - \phi} \quad , \quad \eta = \eta_0 \left(\frac{\phi_c - \phi}{\phi_c} \right)^{-\gamma} \quad (3.21)$$

Para WLF, el estado amorfo (transición vítrea) se alcanza para algún otro $\phi_0 > \phi_c$. Esto se debe a que, de acuerdo con Adam y Gibbs, los reacomodamientos cooperativos hacen posible una relajación estructural completa del sistema. Esto no está contemplado en la MCT.

La Ec. (3.21) debe ser modificada para $\phi_0 > \phi_c$. Los agregados $\delta\phi$ no sólo deben estar referidos a la fracción líquida $(\phi_0 - \phi)$, sino que además deben estar ponderados por la probabilidad de que se incorporen en regiones cooperativas. La fracción $(\phi_0 - \phi)$ se reemplaza por una magnitud proporcional a $(\phi_0 - \phi)^2$, resultando,

$$\frac{d\eta}{\eta} = \alpha \frac{d\phi}{(\phi_0 - \phi)^2} \quad , \quad \eta = \eta_0 e^{-\alpha/\phi_0} e^{\alpha/(\phi_0 - \phi)} \quad (3.22)$$

La constante α incluye a γ y a coeficientes debidos al denominador $(\phi_0 - \phi)^2$. Las formas MCT y WLF surgen inmediatamente si se supone que $\phi = \phi(T)$ y que crece monótonamente, mientras T decrece (por ejemplo, $\phi \sim T_g/T$) [72]. En el caso WLF, al introducir esta relación y el factor α , se pierde el valor concreto de las constantes involucradas. Pero en MCT, el exponente $\gamma = 2,5$ se mantiene. Es sorprendente que la MCT predice independientemente un $\gamma = 2,58$ para partículas esféricas [46].

3.3.3 Validez del modelo hidrodinámico de Stokes

En las Figuras 2.1 y 2.2 se muestra la relación entre D y η para solutos de tamaño menor o comparable al solvente. La relación de Einstein establece que,

$$D = \frac{KT}{\zeta} \quad (3.23)$$

siendo ζ la fricción total sobre el soluto. Si el soluto es grande y rodeado por un fluido, ζ es la fricción hidrodinámica de Stokes $\zeta_H = C\pi\eta R$ ($4 \leq C \leq 6$). Esto no concuerda bien con los datos experimentales cuando señalan que $\zeta \sim \eta^a$ ($a < 1$).

La teoría hidrodinámica molecular [73] y la MCT [51, 74] incluyen un término microscópico en la fricción total,

$$\frac{1}{\zeta} = \frac{1}{\zeta_M} + \frac{1}{\zeta_H} \quad (3.24)$$

donde ζ_M es la fricción microscópica. La expresión (3.24) considera que el soluto es no cargado.

La fricción hidrodinámica ζ_H ocurre por el movimiento colectivo de las moléculas de solvente (fluido). ζ_M , en cambio, se debe a las colisiones directas (no correlacionadas) y repetidas (correlacionadas) del soluto con su entorno. La fricción por colisiones directas viene dada por la teoría de Enskog [73],

$$\zeta_E = \frac{8}{3} \sqrt{2\pi KT\mu} nr^2 g(r) \quad (3.25)$$

donde μ es la masa reducida soluto-solvente, $g(r)$ es la función de correlación radial a la distancia r (r es aproximadamente la distancia a los primeros vecinos) y n es la densidad media de partículas de solvente.

La fricción microscópica es $\zeta_M \cong \zeta_E + \zeta_R$, donde ζ_R es la fricción por colisiones repetidas [51]. ζ_R se vuelve dominante cuando el soluto queda atrapado en *recintos* formados por moléculas de solvente.

La expresión (3.24) presenta una falla importante cuando D es pequeño porque no permite que $D < KT/\zeta_E$ [73]. Si el soluto es grande respecto del solvente, este efecto es despreciable porque ζ_H domina respecto de ζ_E . Esto se debe a que ζ_H es del orden $\mathcal{O}(R)$, mientras que ζ_E es $\mathcal{O}(R^2)$.

Cuando el soluto es un ion en un solvente polar, se producen interacciones de tipo ion-dipolo. El movimiento del ion perturba la polarización de equilibrio del solvente, de manera que pierde energía en el proceso. Esta pérdida de energía del ion se formaliza como una fricción, llamada dieléctrica.

Se considera que la fricción dieléctrica (ζ_d) es aditiva a la fricción de Stokes (ζ_s) [75].

Es decir,

$$\zeta \cong \zeta_s + \zeta_d = 6\pi\eta R + \zeta_d \quad (3.26)$$

donde ζ es la fricción total sobre el soluto, si se desprecia la fricción ζ_M .

El modelo de Zwanzig [76, 77] para la fricción dieléctrica considera al ion como una esfera de radio R moviéndose lentamente con velocidad constante en un medio dieléctrico de permitividad compleja $\epsilon(\omega)$ (dependiente de la frecuencia ω). El medio permanece en reposo mientras el ion se desplaza. Éste, a su vez, está constituido por una carga puntual q en su centro. Bajo estas condiciones, se deduce que,

$$\zeta_d \cong 79,8 \times \frac{2}{3} \frac{q^2}{R^3} \cdot \frac{1}{\epsilon(0)^2} \left(\frac{d\epsilon(\omega)}{d(i\omega)} \right)_{\omega=0} \quad (3.27)$$

para velocidades pequeñas. Todas las magnitudes se expresan en unidades MKSC. El coeficiente 79,8 convierte el lado derecho de la igualdad a ζ_d , expresado en unidades gaussianas ².

El modelo dieléctrico de Debye establece que,

$$\epsilon(\omega) = \epsilon(\infty) + \frac{\epsilon(0) - \epsilon(\infty)}{1 - i\omega\tau} \quad (3.28)$$

donde $\epsilon(0)$ es la permitividad estática y $\epsilon(\infty)$ es aquella para $\omega \rightarrow \infty$ (permitividad ins-

²Si todas las magnitudes se trabajan en unidades gaussianas, este coeficiente debe omitirse. Zwanzig [76] utilizó íntegramente unidades gaussianas.

tantánea). τ es el tiempo de relajación dieléctrica del medio. Realizando la derivación en (3.27), se llega a la expresión final,

$$\zeta_d \cong 79,8 \times \frac{2}{3} \frac{q^2}{R^2} \cdot \frac{\tau}{R} \cdot \frac{\epsilon(0) - \epsilon(\infty)}{\epsilon(0)^2} \quad (3.29)$$

válida siempre y cuando la velocidad del soluto no exceda el valor $\epsilon(0)R/(6\epsilon(\infty)\tau)$ [76].

Los sistemas disacárido-agua de interés en esta Tesis presentan tiempos de relajación dieléctrica (τ) del orden de $10^{-11} - 10^{-10}$ s, permitividad estática $\epsilon(0) \approx 40.\epsilon_0 - 80.\epsilon_0$ ³ y permitividad instantánea $\epsilon(\infty) \approx 5.\epsilon_0$ [78]-[80]⁴. Esto conduce a valores de ζ_d , para el caso de solutos mono-aniónicos ($q = e$), entre 10^{-10} y 3.10^{-9} gr/s. Si el soluto es dianiónico, estos valores se cuadruplican ($q = 2e$). Aún así, la fricción de Stokes sigue predominando en nuestro sistema de interés. Por ejemplo, para sistemas cuya viscosidad sea $\eta > 10$ mPa.s y un soluto típico de $R = 5 \text{ \AA}$, la fricción de Stokes que se obtiene según (3.26) es de 10^{-7} gr/s.

Esto nos lleva a concluir que en los sistemas bajo estudio $\zeta_s \gg \zeta_d$ y, por lo tanto, no será tenida en cuenta en adelante. Observemos también que estas afirmaciones son válidas siempre y cuando el soluto se desplace lentamente. Según Zwanzig [76], su velocidad no debe superar $\epsilon(0)R/(6\epsilon(\infty)\tau) \sim 10$ m/s. En general, este es el caso para todos los líquidos.

³ ϵ_0 es la permitividad del vacío. Recordemos que estamos usando magnitudes en el sistema MKS.

⁴En términos rigurosos, los tiempos de relajación dados en esta literatura corresponden a los hallados para el modelo de Cole-Cole en lugar del de Debye. Pero lo que se intenta aquí es dar un orden de magnitud en lugar de un valor preciso.

3.4 Consideraciones finales

Las teorías sobre la viscosidad y difusión son consistentes en cuanto que plantean un escenario de dominios cooperativos (WLF), celdas (CTG), o bien, recintos (MCT). La WLF y la CTG establecen un comportamiento similar, como función de la temperatura (ver (3.19) y (3.9)). Sin embargo, al vincular ambas, se obtiene,

$$\ln D \sim -\frac{B}{T - T_0} \cdot \frac{B^*}{B\Delta\alpha} \sim \frac{B^*}{B\Delta\alpha} \ln \eta \quad (3.30)$$

Si $B^* \cong 1$, $B = -C_1 C_2 \text{ K}$ y $\Delta\alpha \cong 5 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$, el coeficiente de (3.30) resulta superior a la unidad. Esto es contrario a los resultados de las Figuras 2.1 y 2.2. Vemos una falla importante de las teorías usadas.

Por otro lado, la MCT predice una ley de potencias para η en función de la temperatura. También establece la pérdida de ergodicidad para una temperatura crítica T_c . La formación de recintos provoca que los solutos colisionen repetidamente con su entorno, reduciendo su movilidad. Sin embargo, esto no conduce a una dependencia $D \sim \eta^{-a}$ ($a < 1$).

Los modelos de redes muestran que la cooperatividad del movimiento y la formación de heterogeneidades espaciales llevan al desacople entre la viscosidad y la difusión. Sillescu [81] señala, en su revisión sobre los trabajos de Stillinger y Hodgdon [82, 83], que las heterogeneidades *espaciales* se introducen por suposiciones independientes del mecanismo de fluctuación. Por eso es que distintas teorías presentan *heterofases*, pero sus dinámicas son distintas.

El modelo de Cicerone *et al.* [63] mostró la necesidad de un mecanismo de fluctuación de las heterogeneidades espaciales para maximizar el desacople (*i.e.* compatibles con las observadas experimentalmente). Es decir que, según su modelo, las heterogeneidades deben ser dinámicas. Sin embargo, el modelo de Tarjus y Kivelson [64] no es dinámico y basta la sola existencia de heterogeneidades (estáticas) para provocar el desacople. La afirmación de Sillescu [81] del párrafo anterior resuelve esta aparente contradicción.

Capítulo 4

Método FRAP: descripción experimental y solución alternativa

En este capítulo se describe la metodología empleada para conocer la difusión de soluciones acuosas de azúcares en la región sobre-enfriada cerca de la transición al estado vítreo. No hay muchas técnicas capaces de medir difusiones pequeñas. Las más importantes son la de *Forced Rayleigh scattering* (FRS) y la de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP), una de cuyas variantes se desarrolla a continuación. FRAP permite observar difusiones en un amplio rango (10^{-9} m²/seg a 10^{-17} m²/seg), es aplicable a una amplia variedad de fluoróforos según las condiciones de solubilidad y requiere que el medio sea translúcido.

4.1 Introducción

El procedimiento FRAP que usamos consiste en generar un haz intenso de diámetro ω y corta duración (haz de escritura) que foto-blanquee irreversiblemente una muestra con moléculas fluorescentes. Luego, se monitorea la recuperación de la fluorescencia en esa región por medio de un haz de menor intensidad (haz de lectura). El coeficiente de difusión D del fluoróforo en el medio viscoso se obtiene a partir de la función respuesta medida $F(t)$.

$F(t)$ es la evolución temporal de la concentración media de moléculas fluorescentes en la región monitoreada (ver Sección 4.3). Su forma matemática proviene de la solución teórica de la ecuación de Fick en volumen, para las condiciones iniciales y de contorno propias de la geometría usada. La solución dada por Axelrod *et al.* [84] es la más usada en situaciones como la nuestra. Ella supone que los haces de escritura y lectura son idénticos (aunque de intensidades diferentes). En la práctica, éste no siempre es el caso (por ejemplo, por recorrer caminos ópticos diferentes, etc.). Por otro lado, esta función no es lineal respecto de D , de manera que el tratamiento de los datos es complejo y en muchos casos pueden quedar enmascarados otros efectos como difusión anómala, convección, etc.

En la Sección 4.4 se presenta una expresión alternativa para la función respuesta $F(t)$ en términos del coeficiente de difusión del soluto y que es capaz de solucionar los problemas mencionados. En la Sección 4.5 se realiza un análisis numérico detallado de la alternativa propuesta y se la compara con la solución clásica de Axelrod *et al.*. En la Sección 4.5.3 se extenderá esta comparación a una situación ideal, por medio de la simulación de una función de recuperación. Ésta se obtendrá a partir de un coeficiente

de difusión conocido más ruido blanco Gaussiano.

4.2 Arreglo Experimental

El sistema, mostrado en la Figura 4.1, consiste en un haz gaussiano de longitud de onda $\lambda = 488 \text{ nm}$, generado por un láser de argón (a) de 700 mW (Coherent Innova 90) de manera de foto-blanquear la muestra (haz de escritura) y también excitar las moléculas no foto-blanqueadas de fluoróforo (haz de lectura). Ambos haces se generaron con el láser de Ar, emitiendo a partir de una cavidad estable. La emisión natural de esta cavidad es un modo Gaussiano y corresponde al modo transversal eléctrico de menor orden (TEM_{00}). Además, se caracterizó el haz, midiendo su perfil de intensidades por un método de rueda dentada.

El obturador (3), junto con el temporizador (6), en la Figura 4.1, permiten conmutar entre el haz de escritura y el de lectura. El haz de escritura de parámetros $I'(0)$ y ω' es enfocado en la muestra mediante el sistema de espejos y lente (c), pasando a través de la cuña (2) y el obturador (3) (estado abierto). Las cuñas están constituidas por vidrio BK7. La intensidad del haz de escritura que sale del divisor es alrededor del 85% del original.

El haz de luz secundario es de alrededor del 4% de la intensidad original; después de la primera división del haz, su intensidad se reduce por un factor de 10^{-3} en el atenuador Inconel (4) y ésta se propaga luego a la segunda cuña que lo refleja hacia la muestra por el mismo camino que el haz de escritura cuando el obturador está cerrado. El temporizador electrónico (6) controla la posición del obturador para escribir (estado abierto) y para leer (estado cerrado). El retardo entre el cierre del obturador (3) y la

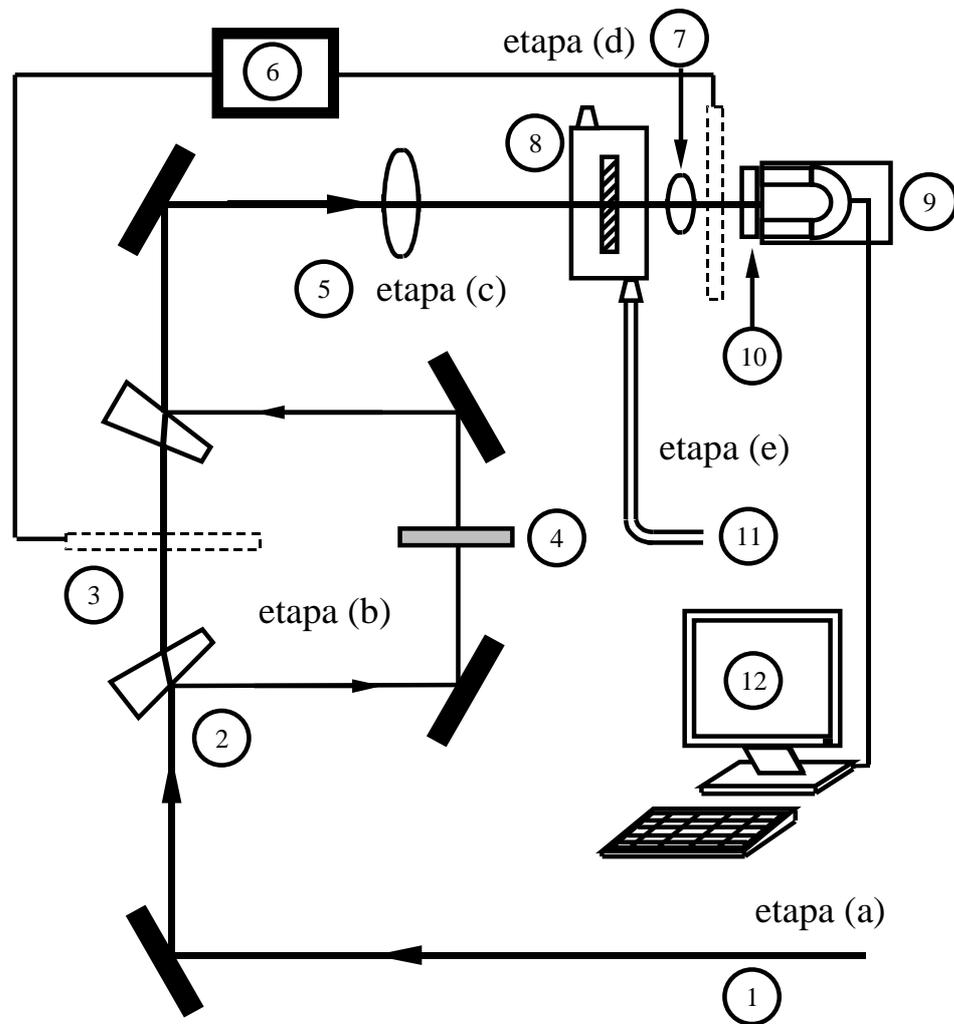


Figura 4.1: Esquema experimental usado para FRAP. Las etapas que lo forman son (a) generación del haz. (b) divisor de haz. (c) acondicionamiento del haz. (d) colector de luminiscencia (e) baño térmico. Dentro de cada una se muestra (1) haz gaussiano (2) cuña (3) obturador (4) atenuador $\times 10^{-3}$ (5) lente de enfoque (6) temporizador (7) lente colectora (8) muestra (9) foto-multiplicador (10) filtro 515 nm (11) circuito N_2 (12) sistema de adquisición.

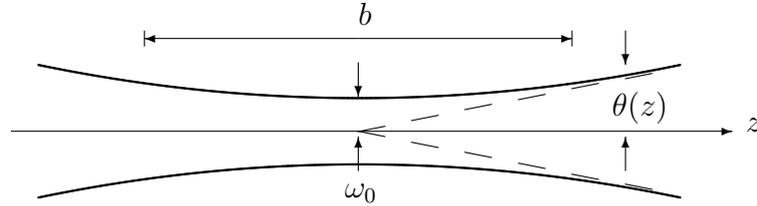


Figura 4.2: Propagación de un haz gaussiano a lo largo de z . Se observa el comportamiento del ancho $\omega(z)$ y del ángulo de divergencia $\theta(z)$. El parámetro confocal b es la distancia en la cual $\omega(z) \leq \sqrt{2}\omega_0$. ω_0 es la cintura del haz.

apertura de su homólogo delante del foto-tubo (9) (tiempo de sombra) es de alrededor de 100 ms. Este retardo fue implementado para evitar una iluminación accidental del detector (9) con el intenso haz de escritura.

En la Figura 4.1 se representa una lente convergente (5) que permite controlar el tamaño del haz. La lente enfoca el haz después de haberse propagado una distancia z_l . El tamaño del haz está dada por $\omega(z_l) \approx \theta \cdot z_l$, siendo $\theta = 0,5$ mrad. En la posición de la lente (5) $z_l = 4,36$ m, y el valor medido del tamaño del haz es 2,18 mm. La propagación del haz gaussiano luego de atravesar la lente se representa en la Figura 4.2.

El valor de tamaño mínimo del haz es $\omega_0 = \omega(z_m)$, donde z_m es ahora la distancia desde la lente convergente. Suponemos que z_m es bastante cercano a la distancia focal de la lente, f , y por lo tanto $\omega_0 \approx \lambda f / (\pi \omega(z_l))$.

Por otra parte, la distancia confocal, b , que es la distancia donde $\omega(z) \leq \sqrt{2}\omega_0$ (siendo ω_0 el tamaño mínimo del haz) está dada por,

$$b \approx 2\sqrt{2} \frac{\lambda f^2}{\pi \omega^2(z_l)} \quad (4.1)$$

Para la distancia focal $f = 25$ cm, resulta $b = 4,2$ mm y $\omega_0 \cong 18 \mu\text{m}$. Debido a que el espesor de la muestra (8) fue de 1 mm, este valor de b garantiza que el haz sea uniforme a lo largo de la muestra cuando ésta se coloca en el plano focal de la lente convergente. Debe notarse que el tamaño mínimo es el mismo para ambos haces, escritura y lectura, es decir $\omega'_0 = \omega_0$.

Este valor de ω_0 permite medir coeficientes de difusión del orden de $10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ en un tiempo del orden de los minutos, lo que es un factor de diseño del experimento muy razonable.

El sistema se completa con un sistema de enfriamiento para controlar la temperatura de la muestra. Consiste en la circulación de nitrógeno seco desde un recipiente con nitrógeno líquido y una resistencia calefactora ubicada cerca de la muestra. La temperatura en la pared de la celda (de cobre) donde se aloja la muestra fue medida con una termo-resistencia calibrada de platino.

La fluorescencia de la muestra es emitida en todo el ángulo sólido, por lo que se usa una lente colectora (7) para enfocar la señal. Se interpone un filtro (10) para eliminar la componente de excitación $\lambda = 488$ nm, antes de llegar al detector (9).

La concentración de la floresceina en la mezcla de disacárido-agua fue de alrededor de $15 \mu\text{M}$, la concentración de sacarosa estuvo en el rango de 10 a 90 % ω/ω , y la temperatura se varió entre 15°C y 20°C . Por lo tanto, la temperatura reducida, definida como la relación entre la temperatura de transición vítrea y la temperatura

de trabajo, T_g/T , varió entre 0,47 and 0,91.

La determinación del tamaño del haz, o bien, la calibración del sistema FRAP, fue realizada teniendo como referencia las medidas del coeficiente de difusión de fluoresceína en sacarosa acuosa dados por Champion et al [9] (soluciones de 30 y 43,5% ω/ω). El procedimiento se describe en la Sección 5.1.2. La calibración por medio de soluciones de fluoresceína en agua, usando como referencia los coeficientes de difusión de la Tabla 5.2, fue descartada. Esto se debió a que los tiempos de recuperación de estas soluciones son muy cortos en este sistema y conduce a errores experimentales grandes.

4.3 El procedimiento FRAP

En la técnica FRAP se parte de una concentración inicial c_0 de moléculas de prueba fluorescentes. Al aplicar un haz de escritura durante un periodo corto t_b (comparado con el tiempo característico de la difusión), la concentración en la región alcanzada por el haz decae exponencialmente. La concentración de moléculas de prueba al inicio de la recuperación ($t = 0$) resulta,

$$c(r, 0) = c_0 e^{-k(r)t_B} \quad (4.2)$$

donde $k(r)$ es la tasa media de foto-blanqueo. Esta magnitud depende de la potencia del haz de escritura y del rendimiento cuántico del foto-blanqueo (*quantum yield*). El proceso de foto-blanqueo en cada molécula fluorescente ocurre luego de producidos múltiples ciclos de absorción-emisión. Típicamente se da luego de $3 \cdot 10^4$ ciclos.

Si la intensidad del haz de escritura $I(r)$ está por debajo de la intensidad de saturación $(hc/\lambda)/(\sigma_0\tau_0)$ (donde σ_0 es la sección eficaz de absorción del fluoróforo y τ_0 el tiempo de vida del estado emisor), la probabilidad de efectos no lineales en el fluoróforo es mínima. Intensidades inferiores a 10^4 W.cm^2 asegura que no habrá efectos foto-químicos adicionales al de foto-blanqueo [85].

Bajo las condiciones descritas, es posible asumir [85]-[88] que la tasa media de foto-blanqueo depende linealmente de la intensidad del haz de escritura, es decir, $k(r) = \alpha I(r)$. Se define el parámetro de foto-blanqueo como $K = \alpha I(0) t_b$, donde $I(0)$ es la intensidad máxima generada en el centro del haz. La constante α contiene la información sobre las propiedades foto-físicas del fluoróforo (*i.e.* rendimiento cuántico del foto-blanqueo y sección eficaz de absorción) y de la longitud de onda del haz λ . Si el haz es gaussiano, el perfil de intensidades es,

$$I(r) = I(0) e^{-2r^2/\omega^2} \quad (4.3)$$

donde ω es el semi-ancho del haz cuando éste decae a e^{-2} . $I(0)$ se relaciona con la potencia total del haz según la expresión $I(0) = 2P_0/(\pi\omega^2)$. En el caso de un haz circular uniforme,

$$I(r) = I(0) \Theta(\omega - r) \quad (4.4)$$

donde ω es el radio del haz, $\Theta(r)$ es la función escalón de Heaviside e $I(0) = P_0/(\pi\omega^2)$.

La Figura 4.3 muestra el perfil de moléculas fluorescentes foto-blanqueadas para distintos parámetros K . Se representó el perfil para el instante inicial de la recuperación

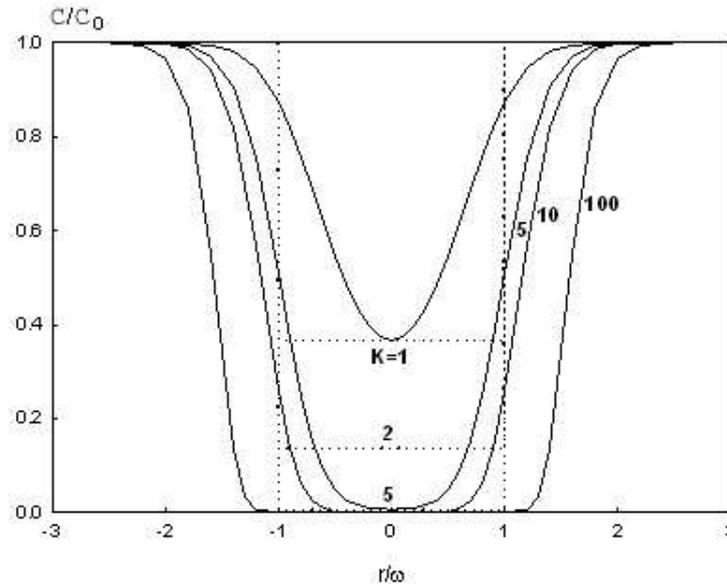


Figura 4.3: Perfiles de recuperación de fluorescencia para haces de escritura gaussianos (líneas continuas) y circular uniformes (líneas punteadas). En cada curva se indica el valor del parámetro de foto-blanqueo K .

(momento en que comienza a actuar el haz de escritura) y para los casos de escritura gaussiana y circular uniforme. En la escritura circular uniforme se observa un foto-blanqueo completo para $K > 5$, mientras eso sólo vale en el centro del perfil cuando la escritura es gaussiana. También, en éste último caso, la concentración de moléculas sin foto-blanquear es aún importante ($\approx 50\%$) cuando $r = \omega$ y $K = 5$.

El perfil generado por un haz de escritura gaussiano es vuelve semejante al del circular uniforme para valores elevados de K . Para $K = 1000$ (no representado), un haz gaussiano de radio ω genera un perfil similar al obtenido por un haz circular uniforme de radio 2ω .

La evolución de la función de recuperación $F(t)$ está determinada por la difusión de moléculas fluorescentes desde la región sin foto-blanquear a la foto-blanqueada (en

ausencia de flujos convectivos). Su forma matemática viene dada por [84],

$$F(t) = \frac{q}{A} \int I(r) c(r, t) d^2r \quad (4.5)$$

donde q es la eficiencia cuántica total, A es el factor de atenuación del haz de lectura y $c(r, t)$ es la solución de la ecuación de difusión para las moléculas de prueba fluorescentes.

Durante el proceso de difusión de moléculas fluorescentes hacia la región foto-blanqueada, existe una difusión de moléculas foto-blanqueadas en sentido contrario que no es observada por el método FRAP. En las condiciones experimentales usuales, la concentración de moléculas foto-blanqueadas y moléculas fluorescentes es muy baja en comparación con la concentración de solvente. Por lo tanto, el efecto producido por el flujo saliente de moléculas foto-blanqueadas puede ser despreciado.

4.4 La función de recuperación de la fluorescencia

Axelrod *et al.* [84] hallaron las expresiones matemáticas para las funciones de recuperación de la fluorescencia en el caso de haces de escritura gaussianos y uniformes. La expresión obtenida para el caso gaussiano es la siguiente,

$$F_G(t) = \frac{qP_0c_0}{A} \nu K^{-\nu} \gamma(\nu, K) \quad (4.6)$$

donde $\nu = (1 + 2t/\tau_D)^{-1}$, $\tau_D = \omega^2/4D$ (D es el coeficiente de difusión del fluoróforo) es

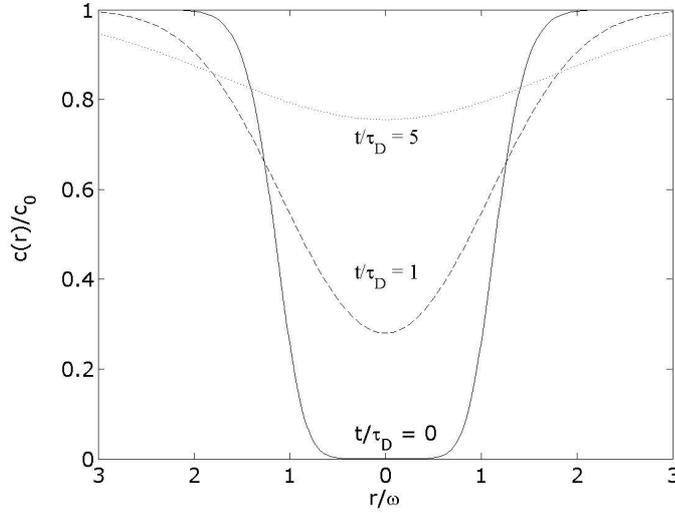


Figura 4.4: Perfiles de concentración de fluoróforo (normalizados) debidos a un haz de escritura gaussiano como función de la distancia (normalizada) al centro del haz. El parámetro de foto-blanqueo es $K = 10$. La curva para $t = 0$ fue obtenida a partir de la ecuación (4.2). Para $t > 0$ se integró numéricamente la ecuación (4.12) por medio de la regla compuesta de Simpson, en el intervalo $[0,10]$. Se usó un subintervalo de integración $h = 0,05$.

el tiempo característico de la difusión, y $\gamma(\nu, K) = \int_0^K e^{-r} r^{\nu-1} dr$ es la función gamma incompleta [89]. Como $\gamma(\nu, K) = \Gamma(\nu)[1 + \mathcal{O}(K^{-1})] \approx \Gamma(\nu)$ [90], cuando $K \rightarrow \infty$, la ecuación (4.6) converge a,

$$F_G(t) = \frac{qP_0c_0}{A} \nu K^{-\nu} \Gamma(\nu) \quad (4.7)$$

donde $\Gamma(\nu)$ es la función gamma. Para valores de $K \geq 4$ y $t/\tau_D \geq 0,25$, la discrepancia entre ambas expresiones está dentro del 1% [84]. En la Figura 4.4 se muestran los perfiles de recuperación debidos a haces de escritura gaussianos y parámetro $K = 10$. Se representaron tres instantes (referidos al tiempo normalizado t/τ_D), incluyendo el perfil inicial.

Axelrod *et al.* [84] propusieron un método de ajuste que considera sólo tres puntos de la curva de recuperación (método de los tres puntos). Los puntos que se requiere conocer son $F(0)$, $F(\tau_{1/2})$ y $F(\infty)$, siendo $\tau_{1/2}$ el tiempo en el que la forma fraccional de la función de recuperación $f(t)$ vale $1/2$,

$$f(t) = \frac{F_G(\tau_{1/2}) - F_G(0)}{F_G(\infty) - F_G(0)} = \frac{1}{2} \quad (4.8)$$

El parámetro de foto-blanqueo K se calcula teniendo en cuenta que en el comienzo de la recuperación ($\nu = 1$), $\gamma(1, K) = 1 - e^{-K}$ [89]. Para el haz de escritura gaussiano resulta que,

$$F_G(0) = \left(\frac{qP_0c_0}{A} \right) \frac{1 - e^{-K}}{K} \quad (4.9)$$

y el coeficiente de difusión se obtiene a partir de la expresión,

$$D = \frac{\omega^2}{4\tau_{1/2}} \gamma_D \quad (4.10)$$

donde la constante $\gamma_D = \tau_{1/2}/\tau_D$ es una función creciente de K para un haz gaussiano. Axelrod *et al.* [84] graficaron $\gamma_D(K)$ para un amplio rango de K . Para un haz uniforme, $\gamma_D = 0,88$ y es independiente de K .

Todas estas expresiones suponen que los haces de escritura y lectura son similares. En la práctica, esto no siempre se cumple. El haz de lectura puede recorrer un camino óptico distinto respecto del que recorre el haz de escritura. Incluso, es posible que ambos haces sean generados por láseres diferentes. En estos casos, la ecuación (4.6) ya

no resulta válida.

La principal desventaja de las soluciones dadas por Axelrod *et al.* [84] es que no son lineales en el coeficiente D . Los procedimientos no lineales para el ajuste de datos pueden conducir a valores de τ_D (o D) sesgados. En otras palabras, las estimaciones de τ_D diferirán, en general, del valor esperado [91]. Más aún, fenómenos espúrios (*i.e.* difusión anómala en líquidos sobre-enfriados, debida al proceso de formación de pequeños cristales) pueden quedar enmascarados en un valor incorrecto de τ_D .

4.5 Una solución alternativa para función de recuperación de fluorescencia en FRAP

4.5.1 Teoría

Como se mencionó en la Sección 4.3, la solución de la ecuación (4.5) requiere conocer la concentración de moléculas fluorescentes $c(r, t)$, bajo la condición inicial (4.2) y la condición de contorno $c(\infty, t) = c_0$.

La Figura 4.5 muestra la geometría del problema de interés, en el caso en que el tamaño del haz de escritura ω' es menor que el tamaño del haz de lectura ω . El perfil de concentraciones representado en la Figura 4.5 corresponde a un valor bajo del parámetro de foto-blanqueo K .

Dada la simetría radial del problema, el perfil de concentraciones es independiente de la coordenada φ . La solución de la ecuación de Fick,

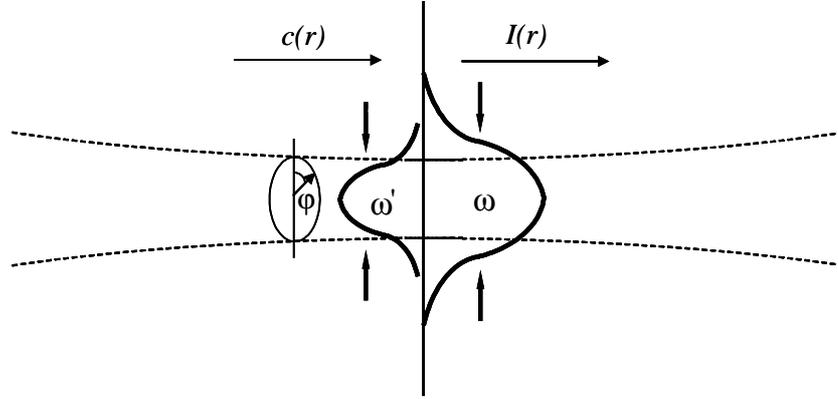


Figura 4.5: Perfil de concentración inicial $c(r, 0)$ de las moléculas de prueba fluorescentes, y perfil de intensidad del haz de lectura $I(r)$. Las flechas indican la difusión en sentido radial de las moléculas fluorescentes desde fuera hacia el interior de la región foto-blanqueada.

$$\frac{\partial c(r, t)}{\partial t} = D \nabla_r^2 c(r, t) \quad (4.11)$$

se puede escribir en la forma integral [84],

$$c(r, t) = \frac{1}{2Dt} e^{-r^2/(4Dt)} \int_0^\infty I_0\left(\frac{r'r}{2Dt}\right) e^{-r'^2/(4Dt)} c(r') r' dr' \quad (4.12)$$

donde $I_0(rr'/2Dt)$ es la función modificada de Bessel de primera clase [92].

La función de recuperación de la fluorescencia se obtiene según la Ec. (4.5), ponderando $c(r, t)$ por la intensidad del haz de lectura, y teniendo en cuenta la eficiencia cuántica y el factor de atenuación. En el caso de un haz de lectura gaussiano, resulta,

$$\begin{aligned}
F(t) &= \frac{q}{A} \iint c(r, t) I(r) r dr d\varphi = \\
&= \frac{q P_0}{A} \frac{4}{\omega^2} \int_0^\infty \frac{1}{2Dt} e^{-\frac{r'^2}{4Dt}} c(r') r' dr' \cdot \left[\int_0^\infty e^{-(\frac{1}{4Dt} + \frac{2}{\omega^2})r^2} I_0\left(\frac{r'r}{2Dt}\right) r dr \right] \\
&= \frac{q P_0}{A} \frac{4\nu}{\omega^2} \int_0^\infty e^{-(2\nu/\omega^2)r'^2} c(r') r' dr' \tag{4.13}
\end{aligned}$$

donde la expresión entre corchetes se resolvió [93] considerando que $I_0(z) = J_0(iz)$ (función de Bessel de primera clase).

Aquí es dónde nuestra solución se aparta de la de Axelrod *et al.* [84]. Inspeccionando la Figura 4.3, vemos que se puede considerar un haz de escritura gaussiano suficientemente intenso (K elevado) como para foto-blanquear uniformemente una región de tamaño ω' , es decir, $c(r') = c_0 \Theta(r' - \omega')$. ω' corresponde al perfil inmediatamente posterior al foto-blanqueo y su valor dependerá de K . En general $\omega' \neq \omega$, incluso para haces gaussianos de escritura y lectura similares. Bajo este supuesto, la evolución de la recuperación de fluorescencia toma la forma,

$$F(t) = \frac{qP_0c_0}{A} e^{-2\nu(\omega'/\omega)^2} \tag{4.14}$$

Hacia el final de la evolución, el sistema converge a $F(t \rightarrow \infty) \rightarrow qP_0c_0/A$. En cambio, cuando $t \rightarrow 0^+$, $\nu \rightarrow 1$ y la función de recuperación toma el valor inicial $F(0^+) = (qP_0c_0/A) e^{-2(\omega'/\omega)^2}$.

La Ec. (4.14) es linealizable en el coeficiente D . Esto se ve se claramente si se escribe,

$$Dt = -\frac{\omega^2}{4} \left[\left(\frac{\omega'}{\omega} \right)^2 \ln^{-1} \left(\frac{F(t)}{qP_0c_0/A} \right) + \frac{1}{2} \right] \quad (4.15)$$

Esta transformación magnifica los errores relativos en $F(t)$ a tiempos largos. Podría usarse un procedimiento de cuadrados mínimos ponderados para obtener estimaciones de D . Pero eso requiere conocer la distribución de probabilidades del error (*i.e.* Gaussiana) y realizar su correspondiente transformación. Para evitar las dificultades que conlleva, se prefirió usar un estimador robusto (ver sección 4.5.3).

La Ec. (4.15) no depende explícitamente de K , pero sí de la relación (ω'/ω) . Cuando el foto-blanqueo es intenso ($K \rightarrow \infty$), como se asume aquí, es de esperar que la función de recuperación $F_G(t)$ asociada con un haz de escritura gaussiano tenga un comportamiento similar a $F(t)$. Por lo tanto, a partir de la Ec.(4.7) y de la Ec. (4.14) se sigue que,

$$\frac{qP_0c_0}{A} e^{-2\nu(\omega'/\omega)^2} = \frac{qP_0c_0}{A} \nu \Gamma(\nu) e^{-\nu \ln K} \quad (4.16)$$

Ambos miembros son aproximadamente iguales si,

$$\left(\frac{\omega'}{\omega} \right)^2 = a \ln K + b \quad (4.17)$$

donde a y b son constantes a determinar. La nueva función de recuperación puede ser re-escrita de la siguiente forma,

$$F(t) = \frac{qP_0c_0}{A} K^{-2a\nu} e^{-2b\nu} = \frac{qP_0c_0}{A} \frac{K^{-2a\nu}}{1 + 2b\nu + 2b^2\nu^2 + \dots} \quad (4.18)$$

Comparándola con la Ec. (4.7), se puede hacer la identificación $2a = 1$, mientras que b debe estar relacionada con $\nu \Gamma(\nu)$. Si se expande la función gamma como una serie de potencias: $\Gamma(\nu) \cong \nu + \gamma^* \nu^2 + \dots$ ($\gamma^* \cong 0,57721566\dots$ es la constante de Euler-Mascheroni) [94], a primer orden podemos aproximar,

$$\left(\frac{\omega'}{\omega}\right)^2 \approx \frac{1}{2} \ln K + \frac{\gamma^*}{2} \quad (4.19)$$

que conecta la nueva solución con la dada por Axelrod *et al.*, según la Ec (4.7).

De las Ec. (4.2) y (4.3) se sigue que los perfiles mostrados en la Figura 4.3 obedecen la relación,

$$\left(\frac{r}{\omega}\right)^2 = \frac{1}{2} \ln K - \frac{1}{2} \ln \left[-\ln \left(\frac{c(r)}{c_0} \right) \right] \quad (4.20)$$

Si se compara esta última con la Ec. (4.19), concluimos que la solución propuesta es equivalente a la Ec. (4.7), cuando $c(\omega')/c_0 = 0,57$. La equivalencia se cumple independientemente del valor del parámetro de foto-blanqueo K , siempre que sea un valor elevado. Esta condición es diferente de la representada en la Figura 4.5, en donde K es bajo y $c(\omega')/c_0$ es cercano a cero.

Es importante destacar que si los haces de escritura y lectura tienen tamaños diferentes, la Ec. (4.19) ya no resulta válida y ω' debe determinarse de manera independiente.

4.5.2 Análisis numérico

La Ec. (4.19) es una aproximación a primer orden para un foto-blanqueo intenso. Debemos realizar un análisis numérico para obtener resultados más precisos, bajo las condiciones de Axelrod *et al.* (haces de escritura y lectura gaussianos similares). El siguiente análisis evaluará las discrepancias entre la solución propuesta y la de Axelrod *et al.*

El primer objetivo es estimar el rango de validez de la Ec. (4.17) y determinar los valores de a y b para ese rango. Para ello, se parte de minimizar la función integral del error cuadrático $e(\nu, \alpha) = F_G(\nu) - F(\nu, \alpha)$,

$$g(\alpha) = \int_{0^+}^1 e^2(\nu, \alpha) d\nu \quad (4.21)$$

donde $\alpha = (\omega'/\omega)^2$. Por lo tanto, el problema se reduce a resolver la ecuación $g'(\alpha) = 0$,

$$\int_{\epsilon}^1 (F_G(\nu) - F(\nu, \alpha)) F(\nu, \alpha) \nu d\nu = 0 \quad (4.22)$$

para $\epsilon \rightarrow 0^+$. La integración numérica de la Ec. (4.22) se realizó usando la regla compuesta de Simpson [95], cuyo error es del orden $\mathcal{O}(h^4)$. El ancho del intervalo de integración elegido fue $h \cong 5 \cdot 10^{-4}$. La búsqueda del cero del primer miembro en la Eq. 4.22 se realizó por el método de bisección [95] con una tolerancia menor a 10^{-4} .

En la Figura 4.6 se exhiben los resultados en función de un amplio rango de valores de K . Vemos que la forma funcional dada por la Eq. 4.19 resulta válida para $K > 3$, pero las constantes (a, b) requieren una corrección. El ajuste mínimo cuadrático mostrado

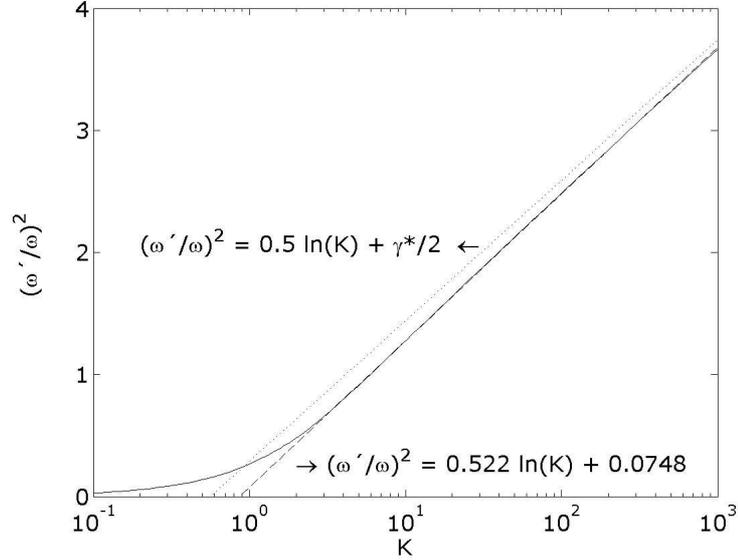


Figura 4.6: Relación $(\omega'/\omega)^2$ en función del parámetro de foto-blanqueo K . La línea llena representa la solución de la Ec. (4.22) para $\epsilon = 10^{-5}$. La línea punteada la aproximación a primer orden dado por la Ec (4.19). La línea de trazos corresponde al mejor ajuste posible (ver texto).

en la Fig. 4.6 determina que $a = 0,5219 \pm 0,00092$ y $b = 0,0748 \pm 0,0033$.

El siguiente objetivo es hallar una medida que describa cuán diferentes son las soluciones dadas por las Ec. (4.6) y Ec. (4.14). En otras palabras, lo que deseamos es saber si la discrepancia $e^2(\nu)$ es globalmente significativa a lo largo de todo el período $0 < \nu \leq 1$.

Notemos que $e^2(\nu, \alpha) = F_G^2(\nu) + F^2(\nu, \alpha) - 2F_G(\nu)F(\nu, \alpha)$. Usando la Ec (4.22) y definiendo que $Q = \int_{\epsilon}^1 F_G^2(\nu) \nu d\nu$, se obtiene,

$$\frac{1}{Q} \int_{\epsilon}^1 F^2(\nu, \alpha) \nu d\nu + \frac{1}{Q} \int_{\epsilon}^1 e^2(\nu, \alpha) \nu d\nu + \frac{2\delta}{Q} = 1 \quad (4.23)$$

El primer término mide el grado de semejanza de las dos soluciones. Es una medida

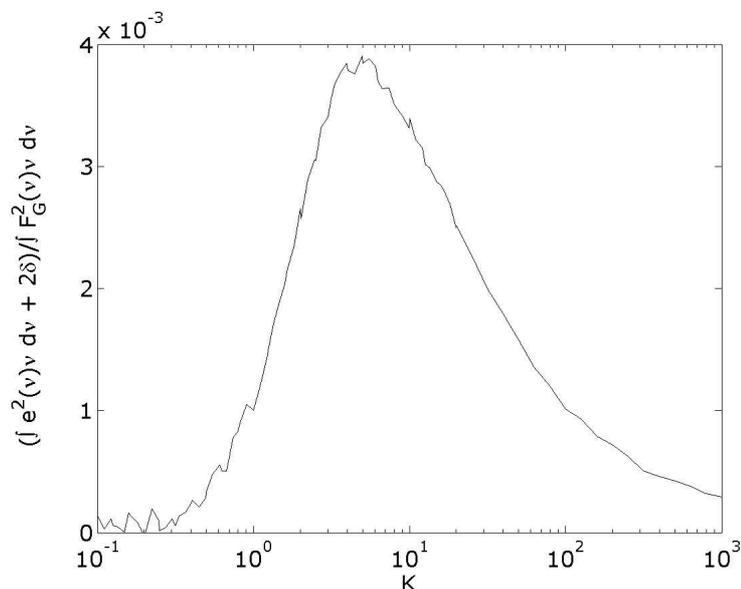


Figura 4.7: Error cuadrático medio total, normalizado por la función de recuperación $F_G(\nu)$, en función del parámetro de foto-blanqueo K .

parecida, aunque no igual, al estadístico R^2 . Si $F_G(\nu) \equiv F(\nu)$, este término vale uno, mientras que los otros dos se anulan. El segundo y tercer término representan las discrepancias teóricas y numéricas, respectivamente. En la Figura 4.7 se muestran contribuciones de $e^2(\nu)$ y δ en función de K . Esta última es despreciable respecto de la discrepancia numérica, por lo que sólo se tendrán en cuenta los dos primeros términos de la Ec. (4.23). En todas las integrales se presenta el factor de ponderación ν . La interpretación es que los tiempos muy largos ($\nu \rightarrow 0^+$) ya no son informativos porque ambas soluciones deben converger al valor común qP_0c_0/A .

La Figura 4.8 muestra la distribución del error cuadrático $e^2(\nu) \nu$ para tres situaciones de fotoblanqueo. Vemos que la discrepancia entre $F_G(\nu)$ y $F(\nu)$ es más acentuada en el rango $\nu > 0,8$ ($t/\tau_D < 0,125$), es decir, durante el primer 10% de la evolución temporal. Este rango hace un aporte importante al error cuadrático integrado y es

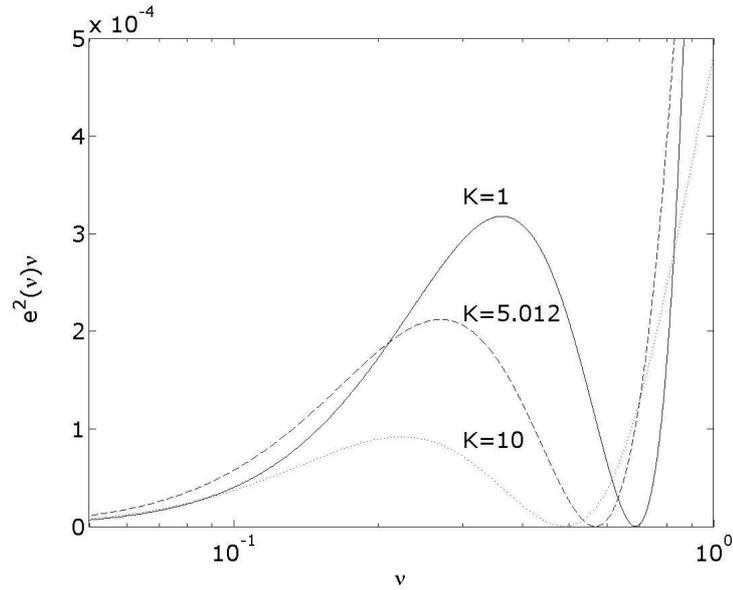


Figura 4.8: Distribución del error cuadrático, $e^2(\nu)\nu$, para tres condiciones de foto-blanqueo. El factor de peso ν privilegia los tiempos cortos ($\nu \rightarrow 1$) respecto de los tiempos largos ($\nu \rightarrow 0^+$).

la razón por la que encontramos un máximo en $K \cong 5$, a pesar de presentar errores menores a los casos $K < 5$ dentro de una amplia región en $\nu < 0,7$ ($t/\tau_D > 0,21$).

4.5.3 Resultados y discusión

En esta sección se discuten las características del nuevo procedimiento para obtener τ_D (y D) y se compara con el método de Axelrod *et al.* de los tres puntos. En primer lugar, la comparación se realiza sobre curvas de recuperación simuladas. Luego, se hará sobre un sistema real.

Resultados en sistemas simulados

Se simularon 10.000 curvas de recuperación, a las que se le sumó ruido blanco Gaussiano, cuya desviación típica fue $\sigma = 0,01$. Se fijaron los valores de $\tau_D = 24,5$ seg. y $K = 5$ (valor del foto-blanqueo cercano al experimental). El cociente (ω'/ω) se obtuvo de la Ec. (4.17) con parámetros $a = 0,5219$ y $b = 0,0748$ (ver Figura 4.6).

Se dejaron evolucionar las curvas de recuperación hasta $t/\tau_D = 20$, por lo que nunca se alcanzó el límite ideal $F(\infty) = 1$. Sobre ellas se aplicó el método de tres puntos y el nuevo procedimiento basado en la Ec. (4.15). Ambos se compararon con el valor conocido de τ_D .

En la Figura 4.9(a) se muestra una curva de recuperación normalizada, generada numéricamente. Los datos se generaron a partir de la Ec. (4.6), evaluada en 400 puntos equi-espaciados en el intervalo $0 \leq t \leq 20\tau_D$ y para $K = 5$. Se adicionó ruido blanco Gaussiano sobre todo el intervalo, con una desviación típica $\sigma = 0,01$.

La diferencia entre la estimación dada por el método de tres puntos y el desarrollado en esta Tesis se vuelve notoria en la región $\tau_D \leq t \leq 5\tau_D$. Allí se observa como el estimador robusto ajusta mejor los datos. Esto es aún más evidente en la Figura 4.9(b).

En la Figura 4.10 se presentan las 10.000 estimaciones de τ_D en la forma de un histograma. En el eje de abscisas se muestra la desviación relativa respecto del valor verdadero de τ_D . Las funciones de recuperación se extendieron hasta $t = 20\tau_D$ para el caso del método de tres puntos. Como resultado se obtuvo una desviación media del 7%. En el nuevo método, las desviaciones dependen de la porción de la curva transformada (Ec. 4.15) que se considere. La desviación media, para una porción $0 \leq t \leq \tau_D$

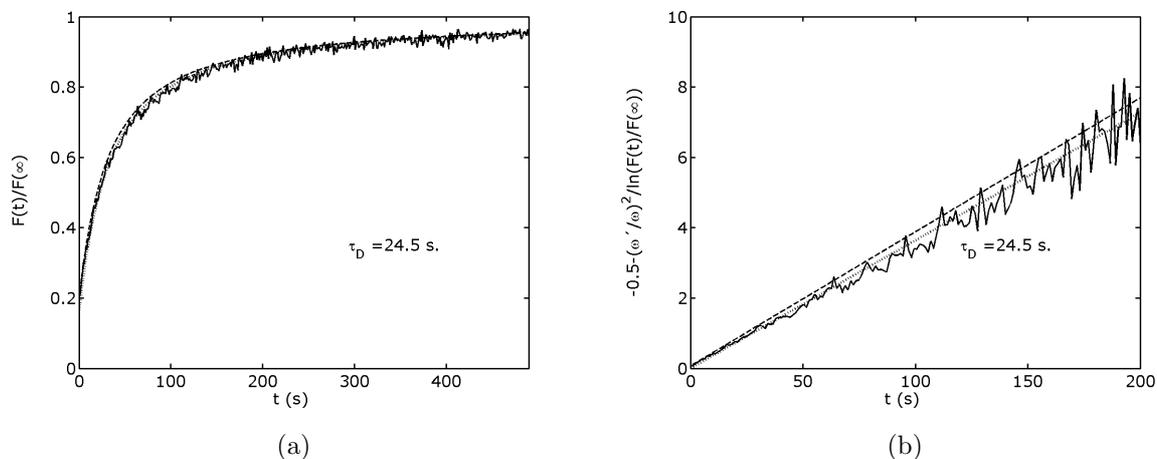


Figura 4.9: (a) Curva de recuperación normalizada $F(t)/F(\infty)$ generada por simulación numérica (datos sin transformar). (b) Representación de la misma curva, transformada según la Ec. (4.15). La línea continua corresponde a los datos generados numéricamente (más el ruido). La línea de trazos representa el ajuste por el método de Axelrod [84]. La línea punteada corresponde al ajuste robusto.

es del 5%. Además, la dispersión de esas estimaciones es menor respecto del método de los tres puntos.

La dispersión del nuevo método aumenta un poco si la porción de la curva considerada aumenta. Por ejemplo, para $0 \leq t \leq 2\tau_D$, la desviación media se incrementa a 10%, pero que la dispersión de su histograma disminuye, respecto de porciones de tiempo menores. En todos los casos, el nuevo método presenta dispersiones menores que el método de los tres puntos.

Las ventajas del nuevo método se evidencian más en las curvas experimentales. Difícilmente una curva experimental no quede afectada por fenómenos espúreos (por ejemplo, convección) a tiempos largos. Más aún, como se mencionó en la sección 4.4, con el método de tres puntos se obtiene el valor $\tau_{1/2}$, mientras que τ_D debe calcularse por medio de la función $\gamma_D(K)$, dada gráficamente por Axelrod *et al.* [84].

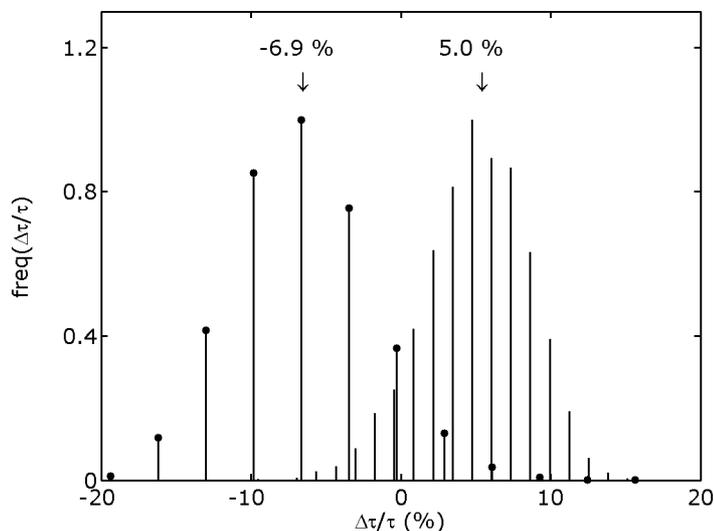


Figura 4.10: Histograma normalizado para las estimaciones dadas por el método de Axelrod *et al.* (líneas con círculos llenos) y por medio de la estimación robusta (líneas sin círculos). El eje de abscisas corresponde a la desviación relativa respecto del valor verdadero $(\tau - \tau_D)/\tau_D$ % ($\tau_D = 24,5$ seg). Ambos histogramas representan las frecuencias relativas de 10.000 simulaciones con ruido blanco Gaussiano ($\sigma = 0,01$). La estimación robusta se realizó a lo largo del intervalo $F(t)/F(\infty) < 0,522$ ($t \leq \tau_D$).

Análisis de curvas de recuperación reales con $\omega' \neq \omega$

La Ec. (4.14) es una expresión alternativa a la compleja Ec. (4.6) de Axelrod *et al.* para describir la recuperación de la fluorescencia. La Ec. (4.6) se simplifica si $\gamma(\nu, K) \approx \Gamma(\nu)$ cuando $K \geq 4$, pero persiste el inconveniente de que el tiempo característico τ_D ingresa en distintas partes de la ecuación. Esto hace difícil obtener una imagen física de su comportamiento. La nueva solución evita ese problema y da una expresión explícita para t/τ_D . Se puede usar por sí sola para tamaños de haces de escritura y lectura distintos ($\omega' \neq \omega$). Pero en combinación con la Ec. (4.17) para $K > 3$, permite describir la solución de Axelrod *et al.* con un buen grado de aproximación.

La solución $F(\nu)$ presenta una discrepancia importante respecto de $F_G(\nu)$ cuando

$t/\tau_D < 0,125$ ($\nu > 0,8$). En el caso en que $t/\tau_D \gg 1$, ambas soluciones convergen a qP_0c_0/A , pero el segundo miembro de la Ec. (4.15) muestra que Dt se acerca a una singularidad. Esta región, por lo tanto, se vuelve muy sensible al ruido (aleatorio y numérico). Una pequeña desviación de $F(\nu)$ lleva a que $\ln^{-1}[F(t)/(qP_0c_0/A)]$ colapse. El rango útil de aplicación de $F(\nu)$ es la región intermedia $t/\tau_D \sim 1$ ($\nu \sim 1/3$). Por esta razón, para obtener τ_D a partir de $F(\nu)$ se debe usar un procedimiento que privilegie la región intermedia, desechando datos de las regiones $t/\tau_D \ll 1$ o $t/\tau_D \gg 1$.

La solución $F(\nu, \alpha)$, dada por la Ec. (4.15) permite obtener τ_D en dos etapas. Se puede determinar primero $(\omega'/\omega)^2$ y luego, por medio de la Ec. (4.15), se estima τ_D . Los valores extremos $F(\nu = 1)$ y $F(\nu = 0^+)$ son los únicos independientes de τ_D , como ocurre en la solución de Axelrod *et al.* [84], y la relación análoga a la Ec. (4.9) es entonces,

$$\frac{F(\nu = 1)}{F(\nu = 0^+)} = e^{-2(\omega'/\omega)^2} \quad (4.24)$$

Contrariamente a lo que sucede con la Ec. (4.9) no es esperable que la Ec. (4.24) conduzca a una buena estimación de τ_D , a menos que $K \gg 1$. Esto se debe a que $F(\nu = 1)$ es dónde más discrepa la solución propuesta con $F_G(\nu)$. Este aspecto se discutió en relación con la Figura 4.8. En cambio, ambas soluciones serán semejantes si se evalúa $(\omega'/\omega)^2$ a partir de K (según la Figura 4.5).

El segundo miembro de la Ec. (4.15) transforma $F(t)$ hacia un comportamiento lineal de la recuperación de la fluorescencia. Esto es válido sólo en el rango útil de aplicación de t/τ_D . La estimación de τ_D debe hacerse en ese rango y mitigar los efectos dados por los puntos extremos $t/\tau_D \ll 1$ o $t/\tau_D \gg 1$. Notar que la Ec. (4.15) es de la

forma $y(t) = t/\tau_D$. Cualquier estimador que minimice alguna medida del error $u^2 = (y - t/\tau_D)^2$ será posible. Una medida inmune a valores de u^2 muy dispersos (*i.e.* *outliers*) es su mediana. El algoritmo de Barreto y Maharry [96] realiza el cálculo de esta medida y determina τ_D . Este estimador forma parte de la familia de los llamados estimadores *robustos*.

La Figura 4.11 es un ejemplo del procedimiento de Axelrod *et al.*, de la estimación robusta y de posibles discrepancias entre ambos. La línea continua muestra una evolución de la fluorescencia típica obtenida por FRAP. Esta medición presenta los problemas experimentales usuales. A tiempos cortos ($t \rightarrow 0$) se manifiesta una distorsión atribuible, según Saxton [97], a la difusión durante el pulso de escritura, imperfecciones del haz y limitaciones en la adquisición de datos. Luego predomina el proceso difusivo, caracterizado por la evolución lineal. A tiempos largos ($t \rightarrow \infty$) se notan los efectos debidos a la inmovilidad de una fracción del fluoróforo y su posible fotoblanqueo [84, 97].

Los ajustes en la Figura 4.11 corresponden a las soluciones $F_G(t)$ de Axelrod *et al.* y $F(t)$ (transformadas según el segundo miembro de la Ec. (4.15)). En ambos casos se determinó K por medio de la Ec. (4.9). $(\omega'/\omega)^2$ se obtuvo según la Figura 4.5, aunque si se hubiese usado la expresión asintótica $a \ln(K) + b$ su valor no hubiera cambiado mucho ($(\omega'/\omega)^2 \cong 0,595$). La estimación de Axelrod *et al.* por el método de los tres puntos dio $\tau_D = 30,5 \pm 1,4$ s. La incertidumbre corresponde a la incerteza en la posición del punto medio. Este método privilegia los puntos extremos y es por ello que el ajuste fracasa a tiempos intermedios (*i.e.* $t \approx \tau_D$). Si el proceso es difusivo, el ajuste debe realizarse sobre el rango lineal de la evolución.

La estimación robusta $\tau_D = 40,5 \pm 0,3$ s considera los puntos extremos como valores dispersos y mitiga sus efectos. Los puntos dispersos deben constituir menos del 50% de

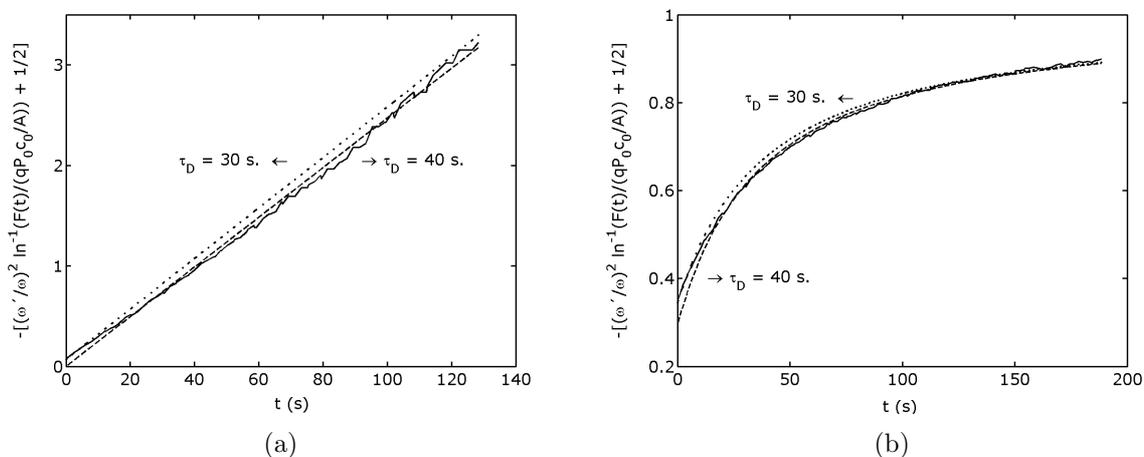


Figura 4.11: Recuperación de la fluorescencia para una muestra de fluoresceína ($C_{20}H_{12}O_5$) en sacarosa acuosa 45,2% ω/ω , medido a $T = 293$ K. La línea continua representa los datos experimentales; la línea de trazos corresponde al ajuste robusto de la Ec. (4.15) para $F(t) < 0,9$. La línea de trazos corresponde a la solución de Axelrod *et al.* [84], obtenida por el método de los tres puntos. El parámetro de foto-blanqueo fue $K = 2,71$, y $(\omega'/\omega)^2 = 0,608$ fue obtenido a partir de la línea continua de la Figura 4.6. (a) Los datos experimentales y las curvas de ajuste están escaladas de acuerdo con la transformación del segundo miembro de la Ec. (4.15). (b) Los datos experimentales y las curvas de ajuste están en su escala natural.

la evolución para que el algoritmo robusto tome la decisión correcta. Por ese motivo fue necesario eliminar la porción $F(t) > 0,9$. Si el corte se hubiese hecho en $F(t) > 0,85$, la estimación resultaría $\tau_D = 41,5 \pm 0,2$ s.

La incertidumbre en τ_D dada por el estimador robusto es sólo aproximada. Los valores asignados corresponden a dos desviaciones típicas, calculadas de la manera usual para un estimador mínimo cuadrático ordinario a partir de la varianza del error σ_u^2 . Sin embargo, para que σ_u^2 no se vea afectada por errores muy extremos, se sigue algún criterio de tolerancia. En este caso sólo se tomaron en cuenta los valores $|u| \leq 2,5 S$ ($S \cong 1,4826 \text{ median}|u(\tau_D)|$). El coeficiente 2,5 es el que fija el límite de tolerancia y es un valor arbitrario (aunque usual en la literatura [98]).

4.5.4 Conclusiones

Las Ec. (4.15) y (4.17) son nuestros resultados más importantes de este capítulo. Se mostró que la Ec. (4.17) es válida para un fotoblanqueo $K > 3$ con coeficientes $a = 0,5219 \pm 0,00092$ y $b = 0,0748 \pm 0,0033$. La Ec. (4.15), por su parte, muestra el hecho sorprendente de obtener una expresión explícita para Dt a partir de la recuperación de fluorescencia $F(t)$. Esto es particularmente útil si estamos estudiando difusión anómala (no Fickeana).

Las discrepancias entre $F_G(t)$ y $F(t)$ son más notorias a tiempos cortos. Así lo indica la Figura 4.8, especialmente para valores bajos de K . Axelrod *et al.* [84] observaron que en el rango $t/\tau_D \geq 0,25$ ($K \geq 4$) $F_G(t) \cong c_0 \nu K^{-\nu} \Gamma(\nu)$. Esta expresión es la que permitió hallar un valor de b independiente de K . El rango de aplicación de $F(t)$ quedó entonces restringido a los tiempos medios y largos de la evolución. Sin embargo, en la medida en que $F(t) \rightarrow qP_0c_0/A$, la Ec. (4.15) se acerca hacia una singularidad. Los tiempos $t/\tau_D \gg 1$ son muy vulnerables al error aleatorio y numérico.

La Ec. (4.15) es una herramienta para verificar que el proceso es de tipo difusivo. La evolución de la recuperación de fluorescencia obtenida por FRAP debe conducir a la relación lineal $y(t) = t/\tau_D$, al menos dentro del rango de aplicación de $F(t)$. Si no fuera así, estaríamos en presencia de difusión anómala (obstrucciones), o bien, de problemas experimentales. Saxton [97] y Axelrod *et al.* [84] atribuyen a estos últimos la presencia de distorsiones en los casos extremos $t \rightarrow 0$ y $t \rightarrow \infty$. El método de los tres puntos [84] no da una visión completa de esta problemática porque se apoya en el punto $F_G(\tau_{1/2})$, asumiendo una concordancia perfecta (salvo por el ruido aleatorio) entre la recuperación de fluorescencia teórica y experimental. Esto lleva a estimaciones

sesgadas de τ_D . La Figura 4.11 es un ejemplo de ello. Basarse casi exclusivamente en los puntos $F_G(\nu = 1)$ y $F_A(\nu = 0^+)$ puede conducir a estimaciones sesgadas de τ_D . La estimación lineal robusta parece ser una herramienta útil para sobrellevar estos inconvenientes.

Los resultados mostrados en las Figuras 4.9 y 4.10 para curvas simuladas numéricamente permiten concluir que el nuevo procedimiento lleva a un proceso de ajuste más simple y que no requiere conocer su evolución sobre periodos largos. Esto último es importante si se observa que a tiempos largos podemos encontrar distorsiones debidas a flujos convectivos y otros efectos espúreos.

Nuestra solución $F(t)$ se comparó permanentemente con la de Axelrod *et al.*, obtenida para haces de escritura y lectura del mismo tamaño. Pero $F(t)$ es más amplia porque admite distintos tamaños de los haces, ya sea por seguir distintos caminos ópticos o por usar láseres diferentes para cada función. En esos casos $F(t)$ puede dar una mejor descripción de la curva de evolución, especialmente para fotoblanqueos intensos.

El coeficiente de difusión depende del haz de lectura (y no del de escritura) por medio de la relación $D = \omega^2/(4\tau_D)$. Es importante caracterizar ω adecuadamente, ya que su incerteza contribuye cuadráticamente a la de D .

Capítulo 5

Resultados de difusión en sacarosa y trehalosa acuosa

5.1 Difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa.

5.1.1 Introducción

En el capítulo anterior (y Ref. [99]) se desarrolló una solución mejorada de la técnica de recuperación de la fluorescencia después del foto-blanqueo (FRAP) y se la comparó numéricamente con la solución clásica dada por Axelrod *et al.* [84].

Con el propósito de contrastar los resultados obtenidos con ambos métodos para un caso real, se midió el coeficiente de difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa en un amplio rango de concentraciones (10-90 % ω/ω), cubriendo viscosidades

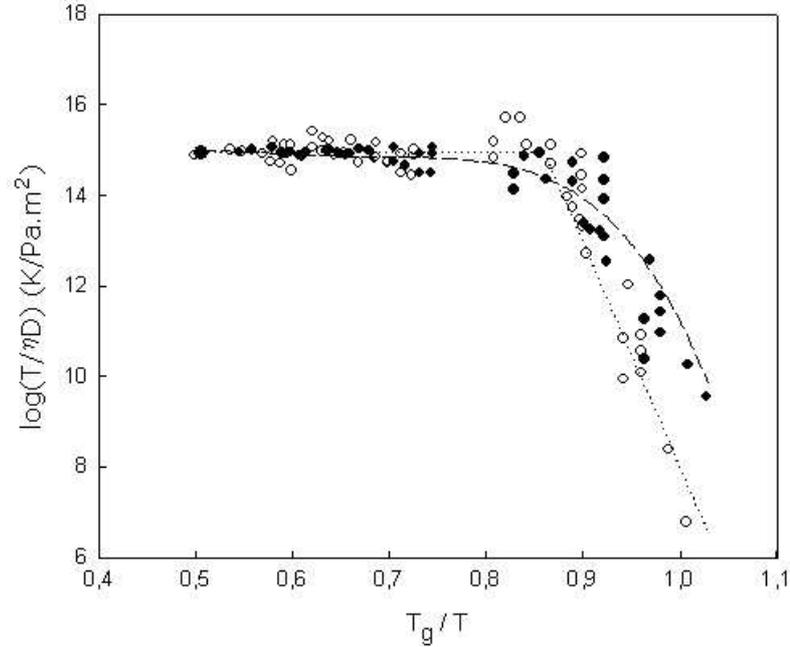


Figura 5.1: Gráfico de Stokes-Einstein ($T/\eta D$) vs. T_g/T para la difusión de fluoresceína en sacarosa acuosa. En las abscisas se representa la temperatura reducida T_g/T y en las ordenadas $\log_{10}(T/\eta D)$. Los símbolos blancos y las líneas punteadas corresponden a los datos originales de Champion *et al.* [9]. Los símbolos negros y líneas de trazos corresponden a los datos recalculados (ver texto).

desde $1,5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ hasta $7,2 \cdot 10^7 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, es decir, desde la región de líquido normal hasta la región de líquido sobre-enfriado. La movilidad de la fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa ya fue estudiada por Champion *et al.* [9], quienes observaron un desacople entre la difusión y la viscosidad, apartándose de la relación de Stokes-Einstein (SE) dada por la Ec. (2.2).

Los datos obtenidos por Champion *et al.* [9], para soluciones de sacarosa entre 30-90 % ω/ω y temperaturas en el rango de $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ se representan en la Figura 5.1 como una función de la inversa de la temperatura reducida.

Se observa que la relación SE se mantiene válida hasta $T_g/T \approx 0,86$, donde T_g es la

temperatura de transición vítrea para la solución de sacarosa. Debe notarse que el cociente $T/\eta D$ dado en la Ref. [9] fue calculado usando la viscosidad de las soluciones de sacarosa medidas por Champion *et al.* y las obtenidas por Bellows y King [100] y Kerr y Reid [101]. Los datos se ajustaron usando la ecuación WLF con parámetros propios de la región de líquido normal, y no pudieron describir bien la viscosidad en regiones sobre-enfriadas, donde se observan grandes desviaciones. Por esta razón, aquí se recalcularon las viscosidades de las soluciones de sacarosa usando la ecuación de Genotellé [27] en la región de líquido normal y una ecuación semiempírica en función de potencias de T_g/T [102],

$$\log_{10}(\eta/\text{mPa.s}) = -7,721 + 23,582 (T_g/T) - 44,078 (T_g/T)^2 + 37,039 (T_g/T)^3 \quad (5.1)$$

que describe con una desviación estándar de 0,023 unidades del $\log_{10} \eta$ todos los datos de viscosidad de sacarosa acuosa en la región sobre-enfriada ($0,70 < T_g/T < 0,90$) disponibles en la literatura.

Por otra parte, también se recalculó la temperatura de transición vítrea de las soluciones de sacarosa usando la información disponible en la literatura para los valores de $T_g(\text{onset})$ de mezclas acuosas de sacarosa y ajustando una ecuación de Gordon-Taylor [103],

$$T_g = \frac{\omega_1 T_{g1} + \omega_2 k_{GT} T_{g2}}{\omega_1 + \omega_2 k_{GT}} \quad (5.2)$$

donde ω_1 y ω_2 son las fracciones en peso del soluto y del agua, respectivamente, $T_{g1} =$

Tabla 5.1: Valores estimados de T_g para soluciones acuosas de sacarosa.

c (% ω/ω)	T_g (K)	c (% ω/ω)	T_g (K)
10,02	139,6	62,21	186,8
19,94	145,0	65,46	192,4
29,99	151,7	66,90	195,1
35,04	155,5	70,23	201,8
40,12	159,9	74,99	212,9
45,18	164,8	80,28	227,9
50,15	170,2	81,73	232,6
53,46	174,2	85,09	244,8
55,47	176,8	85,46	246,3
57,52	179,7	90,13	267,3
60,29	183,8		

336 K y $T_{g2} = 135$ K son las temperaturas de transición vítrea de la sacarosa pura y del agua pura, respectivamente, y $k_{GT} = 4,74$. El coeficiente de Gordon-Taylor k_{GT} usado es compatible con el análisis de la Ref. [104].

Las estimaciones de T_g para sacarosa acuosa estudiadas en este trabajo están resumidas en la Tabla 5.1.

Los valores recalculados difieren de los informados por Champion *et al.* mayormente en la región sobre-enfriada (ver Figura 5.1). Pero las conclusiones con respecto del desacople entre difusión y viscosidad permanecen sin cambios, si bien la nueva curva parece indicar que el desacople se encuentra en un valor de T_g/T menor que 0,86.

La dispersión de los datos en la región de $T_g/T < 0,86$ es mucho menor para los valores recalculados, como se observa en la Figura 5.1. El radio hidrodinámico (r_H) para la difusión de la fluoresceína en sacarosa acuosa puede ser obtenido de $\log_{10}(T/\eta D) = 14,83 \pm 0,10$ (unidades de $T/\eta D$ en $\text{KPa}^{-1}\text{m}^{-2}$), representado por la línea punteada horizontal de la Figura 5.2 para $T_g/T < 0,86$. Reemplazando este valor en la Ec. (2.2)

Tabla 5.2: Coeficiente de difusión y radio hidrodinámico de la fluoresceína en agua.

T ($^{\circ}\text{C}$)	pH	$D \times 10^{10}$ (m^2/s)	r_H (nm) ^a	Ref.
25	6,8	$4,5 \pm 0,1$	0,54 - 0,82	[105]
25	w ^b	$5,1 \pm 0,2$	0,48 - 0,72	[107]
27	9,0	5 ± 2	0,52 - 0,77	[108]
30	w ^b	$5,5_4 \pm 0,2$	0,50 - 0,75	[106]

^a calculados usando la Ec. (2.2) con las condiciones de adherencia ($C=6\pi$) o deslizamiento ($C=4\pi$);

^b medidos en agua (sin indicación de pH).

obtenemos $0,49 \pm 0,15$ nm y $0,74 \pm 0,22$ nm para r_H bajo las condiciones de adherencia y deslizamiento, respectivamente.

El radio hidrodinámico de la fluoresceína en agua, tal como se ha determinado mediante mediciones de difusión usando diferentes técnicas [105, 106], está resumido en la Tabla 5.2. Los valores promedio para las condiciones de adherencia (*stick*) y deslizamiento (*slip*), 0,51 nm y 0,76 nm, respectivamente, se hallan en muy buena concordancia con aquellos encontrados en soluciones acuosas de sacarosa.

La carga del anión de fluoresceína, y por lo tanto su estructura química (ver Figura 5.2), depende del pH [109]. La constante de disociación ácida para la conversión de un mono-anión en un di-anión es $\text{pK}_a = 6,43$ [110], significando que a un pH de agua neutra tenemos en solución alrededor de un 20% de mono-aniones, mientras que la especie di-anión es predominante para un $\text{pH} > 8$. Por lo tanto, las diferencias observadas para los coeficientes de difusión en la Tabla 5.2 podrían ser en parte debidas al pH de la solución, aunque la medición realizada con un $\text{pH} = 9$ [108], para la que se esperaría tener solamente la especie di-anión, presenta la mayor incertidumbre. Sin embargo, asumiendo que la solvatación de mono-aniones y di-aniones en agua es similar, concluimos que el radio hidrodinámico de la fluoresceína no cambia por agregado de

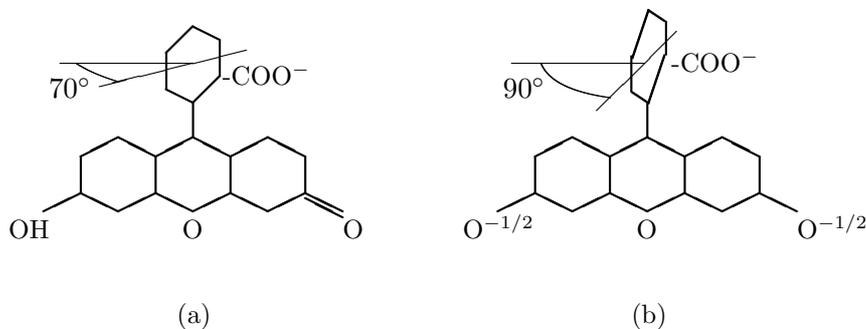


Figura 5.2: Estructura de la molécula de fluoresceína en su forma (a) monoaniónica ($C_{20}O_5H_{11}$) y (b) dianiónica ($C_{20}O_5H_{10}$). (-COO⁻) representa el grupo carboxílico.

sacarosa al agua.

La estimación del radio cristalográfico para la forma di-anión, usando el método desarrollado por Hubbard y Douglas [111] para elipsoides achatados, da $r_c \approx 0,35$ nm. Por lo tanto, la solvatación de di-aniones de fluoresceína en agua y en mezclas de sacarosa-agua corresponde a capas (asumiendo la forma esférica) de alrededor de 0,14 nm y 0,29 nm de espesor, respectivamente, dependiendo de las condiciones de contorno adoptadas para la fricción soluto-solvente. Esos valores están dentro del error experimental del cálculo de r_H , reforzando la idea de que la solvatación de este anión voluminoso es muy pobre.

En la región sobre-enfriada donde $T_g/T > 0,86$, la Ec. (2.2) da valores irreales del radio hidrodinámico, indicando un colapso de la ecuación SE. Este desacople entre viscosidad y difusión en soluciones acuosas de sacarosa fue también observado para un soluto neutro como el ferrocenometanol [8].

La relación de Stokes-Einstein asume que el soluto es una esfera rígida inmersa en un medio continuo. Por lo tanto, el radio hidrodinámico que se obtiene a partir de

ella, en soluciones reales, es mayor que el radio cristalográfico del soluto. Esto es consecuencia de que incluye la capa de solvatación que lo rodea, fenómeno ya conocido en el caso de solutos iónicos simples. Sin embargo, las discrepancias entre la difusión calculada usando la relación de Stokes-Einstein (junto con el radio cristalográfico) y la medida, rara vez excede un factor de 10. Cuando nos referimos a un desacople difusión-viscosidad, se están considerando discrepancias mayores a un orden de magnitud. En la Figura 5.1 se observa este tipo de discrepancias en el régimen sobre-enfriado, cercano a la transición vítrea. Allí, las heterogeneidades dinámicas son capaces de hacer caer la hipótesis del continuo en el solvente.

En esta Tesis se midieron los coeficientes de difusión de la fluoresceína di-aniónica en soluciones acuosas de sacarosa, tanto en el régimen de líquido normal como en el sobre-enfriado, usando la técnica FRAP y recurriendo a los diversos análisis de datos tratados en el capítulo anterior. De esta manera se convalidan las soluciones propuestas como convenientes para el ajuste lineal. También se comparan los resultados obtenidos en esta investigación (para la difusión en soluciones acuosas de sacarosa) con aquellos registrados por Champion *et al.* [9] y se discuten las diferencias observadas. Finalmente, comparamos los resultados de la difusión de los di-aniones de fluoresceína con aquellos de otros solutos iónicos y no-iónicos en sacarosa acuosa.

5.1.2 Tratamiento de los datos

Las expresiones para las curvas de recuperación de fluorescencia fueron tratadas en detalle en el capítulo anterior. Las Ec. (4.6), (4.15) y (4.17) resumen el análisis realizado al respecto. En la Figura 5.3 se muestran curvas de recuperación de la fluorescencia

típicas, medidas en soluciones acuosas de sacarosa de distintas viscosidades.

La aplicación de la Ec. (4.15) a las curvas experimentales para estimar la difusión D requiere del conocimiento de la relación $(\omega'/\omega)^2$, y del ancho del haz de lectura ω . Tal como se explicó en la sección 4.4 (y en la Ref. [99]), los valores del parámetro de foto-blanqueo K se obtienen por medio de la Ec. (4.9). Luego, los valores de $(\omega'/\omega)^2$ surgen a partir de la Figura 4.5. Para $K > 3$, esa curva se vuelve lineal y $(\omega'/\omega)^2 = 0,522 \ln K + 0,0748$ (ver Figura 4.1).

En cualquier caso, el término entre corchetes en la Ec. (4.15) puede ser calculado y trazado como una función del tiempo. La pendiente de esta traza (ver Figura 5.3) puede ser vista como la inversa del tiempo característico de difusión, τ_D . Por lo tanto, el coeficiente de difusión podría obtenerse de,

$$D = \frac{\omega^2}{4\tau_D} \quad (5.3)$$

siempre que conozcamos el ancho del haz de lectura ω . Si la muestra está desplazada de la región confocal, el tamaño real del haz de lectura será $\omega > \omega_0 \cong 18 \mu\text{m}$. La relación (ω/ω_0) depende de la posición de la muestra en el camino óptico del haz y no cambiará, salvo que se cambie la posición de la muestra. Por el contrario, la relación (ω'/ω) solamente da información de la intensidad del foto-blanqueo de la muestra.

El ancho ω (o bien, la relación ω/ω_0) del haz de lectura puede ser obtenida usando un sistema de referencia, donde el coeficiente de difusión de la muestra sea conocido. En este caso, se usó fluoresceína en sacarosa-agua al 30 y 45,5 % ω/ω_0 , para la que el valor medio de $\log_{10}(T/\eta D)$ es $14,83 \pm 0,17$ (unidades: $\text{KPa}^{-1}\text{m}^{-2}$) [9]. Se obtuvo el valor

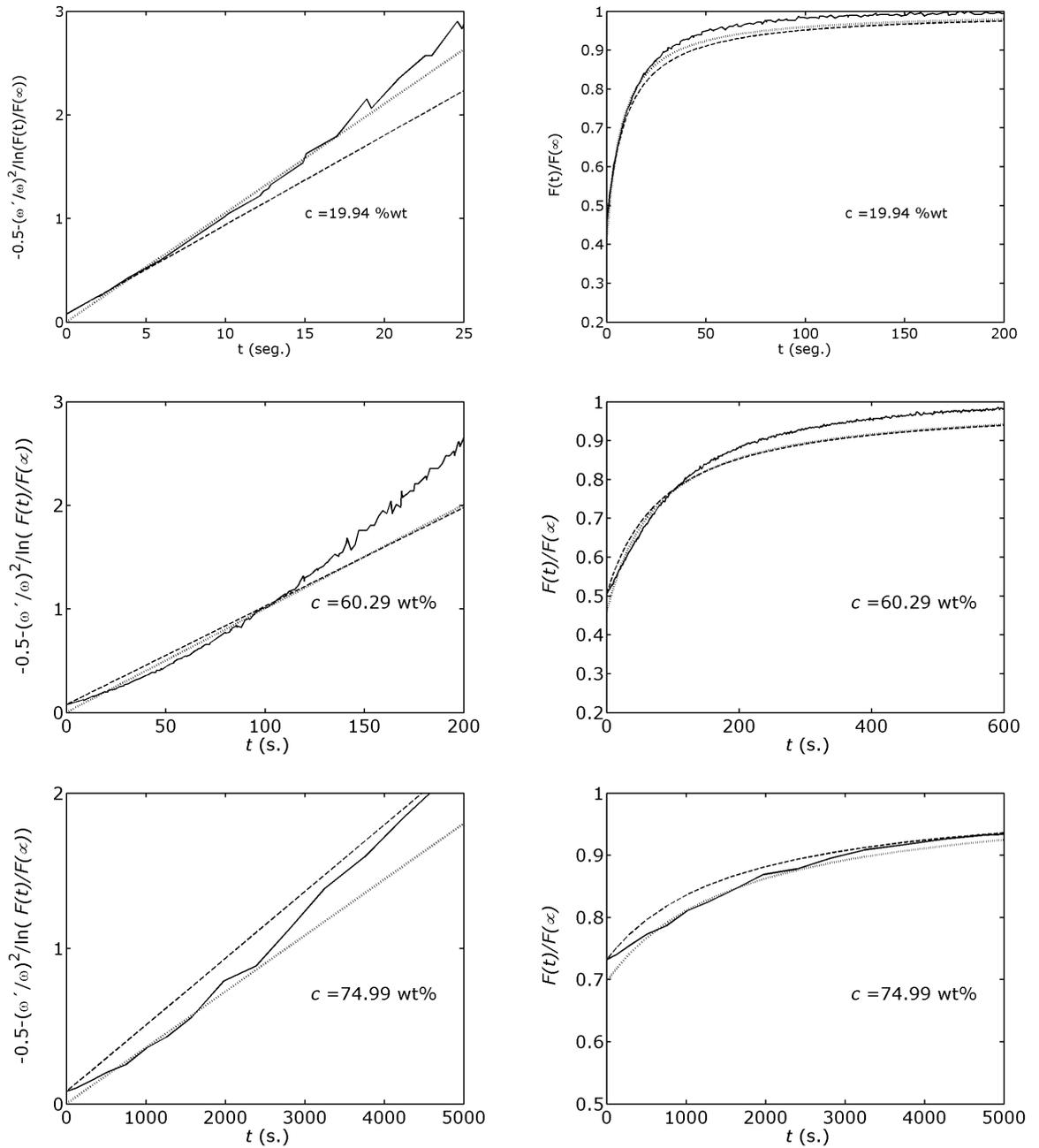


Figura 5.3: Función de recuperación de fluorescencia de fluoresceína en solución acuosa de sacarosa $F(t)$ (derecha) y su representación lineal de acuerdo con la Ecuación (4.15) (izquierda). La líneas continuas corresponden a los datos experimentales, las líneas de trazos corresponden al método de ajuste de Axelrod *et al.* [84] y las líneas punteadas al ajuste robusto (ver sección 4.5.3). Todas las funciones de recuperación están representadas de acuerdo con la transformación del lado de la derecha de la Ec. (4.15) y en su forma lineal. (a) sacarosa 19,94 % ω/ω ; (b) sacarosa 60,29 % ω/ω ; (c) sacarosa 74,99 % ω/ω .

de ω ajustando los tiempos característicos de 20 soluciones propias (de concentraciones comprendidas entre 10 y 40,12 % ω/ω) y, luego, se aplicó la Ec. (5.3). De este modo se llegó a $\omega = 70,1 \mu\text{m}$, que fue usado para obtener los coeficientes de difusión de fluoresceína en el resto de las mezclas sacarosa-agua.

5.1.3 Resultados

La función de recuperación, transformada de acuerdo con la Ec. (4.15), y la estimación a partir la Ec. (4.6), fueron mostradas en la Figura 4.11 (y en la Ref. [99]) para fluoresceína en sacarosa acuosa al 45,2 % ω/ω ($T = 293 \text{ K}$). También fueron tratadas allí las principales características del proceso de ajuste. Para completar la descripción, la Figura 5.3 muestra las curvas de recuperación de fluorescencia en soluciones acuosas de sacarosa, comprendidas entre 19,94% ω/ω y 74,99% ω/ω . Se puede observar el incremento del tiempo característico de recuperación con el incremento de viscosidad de la solución.

Los gráficos del lado izquierdo de la Figura 5.3 son lineales para el período inicial, mientras que se observan desviaciones positivas en tiempos largos. Esto es, la Ec. (4.15) no es más válida más allá de este límite probablemente impuesto por la contribución de la convección a la recuperación de la fluorescencia. Esta representación es mucho más simple que los datos sin transformar mostrados a la derecha de la Figura 5.3.

Está claro que el ajuste lineal robusto (líneas de puntos en la Figura 5.3) de la Ec. (4.15) para $F(t)/F(\infty) < 0,9$ es mejor que el correspondiente ajuste usando el método de los tres puntos [84] (líneas de rayas). Esto se debe a que, mayormente, el ajuste lineal robusto privilegia los datos en tiempos intermedios donde los errores experimentales

son minimizados.

El coeficiente de difusión de las moléculas fluorescentes (fluoresceína) en soluciones acuosas de sacarosa, junto a la viscosidad de las soluciones, está resumido en la Tabla 5.3. Allí se presentamos los coeficientes de difusión obtenidos usando el método de los tres puntos y aquellos obtenidos ajustando la Ec. (4.15) con un estimador lineal y con un estimador no-lineal (Ec. (4.14)).

La comparación de los ajustes lineales y no-lineales de la Ec. (4.15) indica claramente que los primeros dan el menor error, especialmente con el régimen sobre-enfriado (alta viscosidad, alto T_g/T). El ajuste no-lineal de las curvas de recuperación, no mostrado en la Figura 5.3, es similar al representado para el método de los tres puntos.

La incertidumbre en los coeficientes de difusión obtenidos con el ajuste robusto lineal es, en general, mucho menor que la de los coeficientes obtenidos con el método de los tres puntos, particularmente para las soluciones con concentraciones $c > 40\% \omega/\omega$. Por otra parte, menos de la mitad de los coeficientes de difusión obtenidos por el método de Axelrod *et al.*[84] coinciden, dentro del error experimental, con los obtenidos por el ajuste lineal robusto.

La reproducibilidad en las mediciones de los coeficientes de difusión no es satisfactoria, tal como puede verse en la Tabla 5.3, donde se observa que la dispersión en mediciones realizadas a la misma concentración y temperatura, es mayor que la desviación típica de cada medición individual. También resulta mayor que las diferencias en los coeficientes de difusión obtenidos por procedimientos de estimación diferentes. La principal ventaja de la solución alternativa basada en la Ec. (4.15), respecto del método de los tres puntos, es la simplicidad en su implementación, aún cuando la dispersión en mediciones

Tabla 5.3: Coeficiente de difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa.

c (% ω/ω)	T (K)	T_g/T	η (mPa.s)	K	D^a (10^{11} m ² /s)	D^b (10^{11} m ² /s)	D^c (10^{11} m ² /s)
10,02	295,8	0,472	1,20	1,18	29,1± 4,8	24,2± 1,2	32,1± 3,2
				2,79	38,0± 2,3	34,1± 6,4	45,7± 6,5
	296,2	0,471	1,19	1,04	23,3± 4,2	20,4± 0,7	25,5± 2,0
	19,94	295,4	0,491	1,79	1,89	14,7± 1,5	12,9± 0,3
	295,8	0,490	1,77	1,75	17,5± 0,3	14,1± 0,4	16,5± 0,7
	29,99	294,7	0,515	3,00	2,82	15,5± 0,8	11,2± 0,9
				3,06	20,1± 2,6	15,4± 1,9	23,5± 2,5
				2,90	27,5± 5,2	26,0± 3,1	34,7± 3,6
				2,01	25,7± 1,2	18,8± 1,5	27,1± 2,7
				295,0	0,514	2,97	3,16
35,04	294,7	0,528	4,08	2,90	10,1± 0,7	9,2± 0,7	12,4± 0,9
				2,71	11,5± 0,7	9,7± 0,7	13,3± 1,0
				3,10	11,6± 0,9	10,2± 1,0	14,8± 1,3
				2,47	15,4± 1,4	13,4± 1,1	17,0± 1,3
				2,90	20,1± 1,0	17,9± 2,2	23,8± 2,2
				40,12	294,3	0,543	5,92
				3,95	8,4± 0,7	8,5± 0,7	10,6± 0,7
				3,49	7,5± 0,4	7,1± 0,4	9,6± 0,6
				3,40	6,8± 0,1	6,3± 0,3	8,2± 0,5
				4,30	6,6± 0,2	6,5± 0,3	7,9± 0,4
45,18	292,9	0,563	9,53	2,40	9,5± 1,0	7,7± 0,1	7,6± 0,2
				2,71	4,0± 0,5	3,04± 0,02	3,14± 0,03
	293,2			2,85	2,8± 0,2	2,14± 0,01	2,36± 0,03
	50,15	294,3	0,578	14,7	4,47	9,7± 0,4	9,4± 0,7
				3,95	2,8± 0,4	2,35± 0,02	2,40± 0,02
				53,46	292,9	0,595	23,0
55,47	294,7	0,600	27,1	2,03	1,9± 0,2	1,48± 0,02	1,72± 0,03
				295,0	0,599	26,7	2,48
				2,69	3,9± 0,3	3,26± 0,09	4,5± 0,2
				57,52	292,9	0,613	39,6
				2,00	1,14± 0,10	0,89± 0,01	1,02± 0,02
				2,08	3,0± 0,4	2,29± 0,07	2,77± 0,08
60,29	295,8	0,621	51,3	1,59	1,61± 0,16	1,23± 0,02	1,47± 0,03
				1,58	1,66± 0,10	1,23± 0,02	1,54± 0,04
62,21	295,4	0,632	72,4	1,57	0,58± 0,14	0,393± 0,005	0,414± 0,002
				1,40	1,01± 0,15	0,73± 0,01	0,85± 0,02
65,46	296,0	0,650	$1,29 \cdot 10^2$	0,87	0,18± 0,07	0,15± 0,01	0,22± 0,08
66,90	295,0	0,644	$2,04 \cdot 10^2$	0,89	0,83± 0,33	0,407± 0,002	0,393± 0,004
				0,9	0,89± 0,22	0,54± 0,09	0,69± 0,11
70,23	295,8	0,682	$4,10 \cdot 10^2$	0,82	0,88± 0,33	0,57± 0,12	0,71± 0,12
				0,76	1,3± 0,5	0,504± 0,006	0,432± 0,009
				1,52	1,8± 0,8	1,1± 0,4	1,3± 0,3
				74,99	296,4	0,718	$1,59 \cdot 10^3$
80,28	296,0	0,770	$1,62 \cdot 10^4$	1,00	0,081± 0,038	0,040± 0,003	0,050± 0,012
81,73	295,8	0,786	$3,77 \cdot 10^4$	1,18	0,082± 0,053	0,022± 0,002	0,037± 0,017
85,09	295,0	0,809	$4,58 \cdot 10^5$	1,30	0,12± 0,29	0,124± 0,009	0,29± 0,55
85,46	293,6	0,818	$8,05 \cdot 10^5$	0,77	0,087± 0,072	0,059± 0,007	0,13± 0,11
90,13	294,8	0,907	$1,09 \cdot 10^8$	0,97	0,18± 0,11	0,065± 0,011	0,071± 0,025

^a método de Axelrod *et al.* (2) ; ^b estimador lineal robusto; ^c estimador no-lineal

análogas enmascare sus beneficios. Estos beneficios ya fueron evaluados en sistemas modelo en el capítulo anterior y en la Ref. [99].

La precisión en los coeficientes de difusión obtenidos por FRAP es típicamente del 30% para solvente puros en la región de líquidos normales, de acuerdo con la estimación de Axelrod *et al.*. Ediger y colaboradores [112] reportan incertezas del 20-30% para la versión de FRAP holográfica en líquidos puros y dentro del régimen sobre-enfriado. Champion *et al.* [9] obtienen desviaciones típicas del 100% en soluciones muy concentradas de sacarosa en agua, y en la representación gráfica de sus resultados, se observan dispersiones entre mediciones (para condiciones de concentración y temperatura similares) mayores a un orden de magnitud en el régimen cercano a la transición vítrea.

Las mediciones en sacarosa acuosa presentadas aquí muestran una dispersión similar a la observada en el trabajo de Champion *et al.* [9] para el régimen diluido, y son significativamente menores para el régimen sobre-enfriado (concentraciones mayores al 60% ω/ω).

Mientras que la dispersión en los datos de las soluciones diluidas (concentraciones de sacarosa menores a 40% ω/ω) es atribuible a limitaciones de tipo experimental (favorecidas por tratarse de un solvente binario, en lugar de puro), una explicación posible a la dispersión en el rango 45-50% ω/ω es su proximidad a la concentración de saturación, con viscosidades aún relativamente bajas. Esta situación favorece el proceso de nucleación en la solución.

En general, las mediciones de la Tabla 5.3 muestran que las desviaciones relativas del coeficiente D nunca excedieron el 50%, excepto por los valores medidos a 45,18% ω/ω

($K = 2, 40$) y $50,15\% \omega/\omega$ ($K = 4, 47$). Esto representa una mejora respecto de la dispersión en el trabajo de Champion *et al.* [9]. También se nota que no hay una variación sistemática debida al parámetro de foto-blanqueo K .

En la Figura 5.4 se muestran los resultados obtenidos para la difusión de fluoresceína en mezclas sacarosa-agua, en la forma de un gráfico de Stokes-Einstein, tal como se hizo en la Figura 5.1 para los datos de Champion *et al.* [9]. Sólo se incluyen los resultados del ajuste lineal robusto, porque la dispersión en los datos es suficientemente grande como para poder observar diferencias en las tendencias respecto del método de los tres puntos.

La imagen que surge de la Figura 5.4 es similar a la ya tratada en relación con los datos de la Figura 5.1. Es decir, la relación SE se mantiene para valores bajos de T_g/T , mientras que se observa un desacople entre difusión y viscosidad cuando nos aproximamos a la temperatura de transición vítrea ($T_g/T \rightarrow 1$). Sin embargo, en las mediciones realizadas para este trabajo, el desacople se observa para $T_g/T > 0,65$, mientras que en las mediciones hechas por Champion *et al.* [9] tiene lugar más cerca de la temperatura de transición vítrea.

Podríamos especular con la posibilidad de que la discrepancia se deba a diferencias del pH de la muestra. Las muestras de Figura 5.4 se prepararon agregando hidróxido de sodio para alcanzar un $\text{pH} \approx 8$, mientras que Champion *et al.* [9] prepararon muestras con agua destilada y registraron un pH de alrededor de 7. Por lo tanto, la proporción entre di-aniones y mono-aniones podría haber sido mayor en nuestras muestras. Obviamente, esta diferencia, si existe, no podría ser notada en la región diluida debido a los procedimientos de calibración empleados.

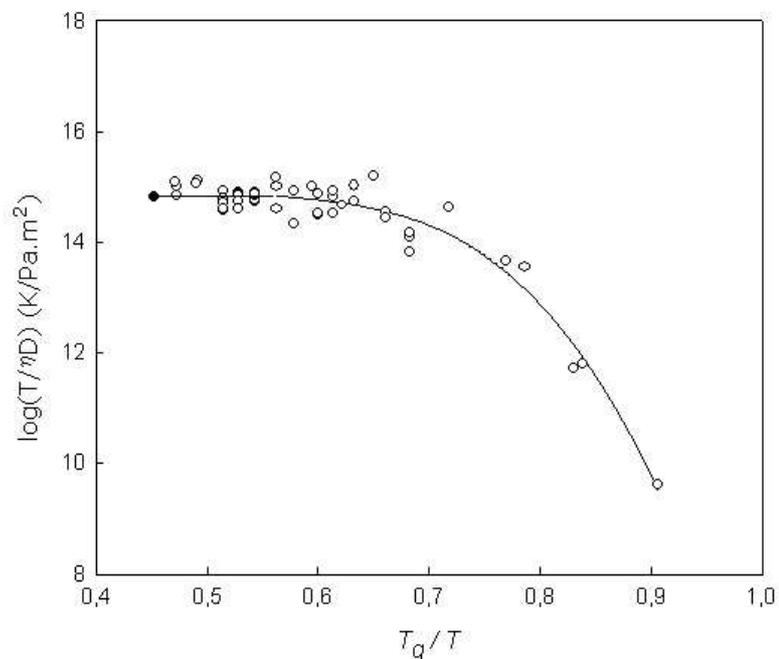


Figura 5.4: Gráfico de Stokes-Einstein para la difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa (mediciones propias) usando el ajuste lineal robusto. (○) Resultados con soluciones de sacarosa entre 10-90% ω/ω y temperaturas alrededor de los 295 K, (●) Resultados con agua pura.

Aún más importante que la preparación de las muestras es la diferencia del método FRAP empleado en ambos estudios. Champion *et al.* [9] usaron un modelo de franjas de interferencia donde el parámetro de foto-blanqueo no es considerado. Es decir, consideraron que el foto-blanqueo es uniforme sobre toda la distancia de las franjas (de alrededor de $5\ \mu\text{m}$ de ancho). Si el haz de escritura no es suficientemente intenso como para foto-blanquear uniformemente las franjas, los coeficientes de difusión medidos serían más altos que los reales, mientras que un foto-blanqueo muy intenso produciría el efecto contrario.

Por otra parte, Champion *et al.* [9] informaron que en las soluciones de sacarosa altamente concentradas solamente se pudo ajustar el 10% del total de la curva de

recuperación (supuesta exponencial). Además, el ajuste requirió de dos tiempos de relajación, cuya magnitud difirió hasta en un factor de 10. Periasamy *et al.* [113] observaron una recuperación rápida de la fluorescencia en soluciones acuosas viscosas, debida a una componente *reversible* del foto-blanqueo. Es decir, debida a una regeneración del estado no excitado del fluoróforo desde un estado de triplete. Éste proceso compite con la transición irreversible desde el triplete hacia el estado definitivamente foto-blanqueado. El tiempo de relajación del proceso reversible depende del contenido de oxígeno en la solución y de la intensidad del haz. En el caso del patrón de franjas usado por Champion *et al.* [9], los tiempos de recuperación son mucho menores que los nuestros. Por lo tanto, la relajación más rápida que observaron podría asociarse a la recuperación reversible del fluoróforo. Estos autores consideran sólo la relajación más lenta para la estimación de D .

Las representaciones del desacople, observada en la Figuras 5.1 y 5.4, en la región de alta viscosidad, indican claramente que nuestros resultados dan coeficientes de difusión más elevados que los de Champion *et al.* [9], para una misma temperatura reducida T_g/T . Por lo tanto, las causas de las discrepancias podría ser una combinación de un foto-blanqueo muy intenso en la franja de interferencia FRAP usado por esos autores, junto con la elección de menores coeficientes de difusión en el procedimiento de ajuste.

5.2 Difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de trehalosa

5.2.1 Introducción

En la sección 5.1 se estudió el desacople o violación de la relación de Stokes-Einstein (Ec. (2.2)) para soluciones de sacarosa acuosa. La difusión de fluoresceína iónica en estas mezclas se comparó con datos de literatura [9]. Las mediciones propias indicaron que el desacople aparece alrededor de $T_g/T \approx 0,65$, mientras que para los datos de Champion *et al.* ocurrió en $T_g/T \approx 0,80$. Longinotti y Corti [8] estudiaron la difusión del ferrocenometanol (soluto neutro) en estas mismas mezclas y observaron ese mismo desacople en $T_g/T \approx 0,75$. La razón de estas discrepancias no resulta clara, por la que el estudio en soluciones acuosas de trehalosa pueden ayudar a clarificar este punto.

La trehalosa es un disacárido, tal como la sacarosa y sus estructuras se muestran en la Figura 5.5. Ambas, al igual que otros polioles, son agentes vitrificantes que incrementan la temperatura de transición vítrea del agua desde 136 ± 1 K, según determinaron por Johari *et al.* [114] usando técnicas calorimétricas. Sus soluciones acuosas vítreas o sobre-enfriadas son usadas comúnmente para la estabilización de biomoléculas. En particular, las soluciones acuosas de trehalosa tienen temperaturas de transición vítreas más altas respecto de otras soluciones acuosas de azúcares [104].

Magazú *et al.* [13] estudiaron la difusión del óxido de polietileno y trehalosa en soluciones acuosas de trehalosa en el rango de temperaturas $20-85^\circ\text{C}$ usando una técnica de espectroscopía de correlación de fotones. Solamente en el caso de la difusión de trehalosa alcanzaron la región sobre-enfriada, pero el límite superior de T_g/T fue 0,57,

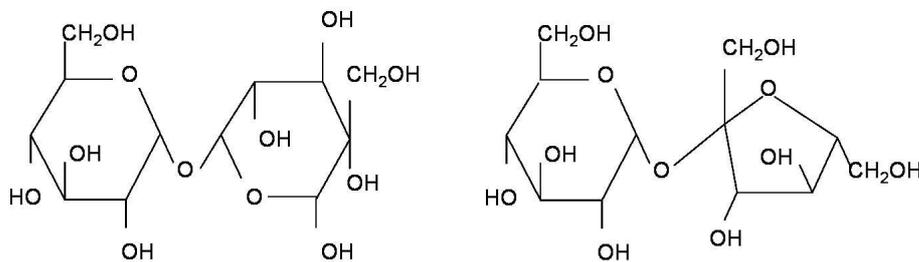


Figura 5.5: Al la izquierda, la estructura química de la α, α -trehalosa. A la derecha, la estructura química de la sacarosa.

que es muy bajo para observar el desacople entre difusión y viscosidad.

Lüdemann y colaboradores [115] estudiaron los coeficientes de intradifusión del agua (D_w) y carbohidratos (D_c) en soluciones acuosas mediante la técnica ^{13}C NMR. Sus mediciones en sacarosa y trehalosa en agua incluyeron la región sobre-enfriada hasta $T_g/T = 0,75$. Con concentraciones de azúcar mayores que $50\% \omega/\omega$ observaron un desacople de D_s y D_w de la viscosidad para ambos carbohidratos. Resultados similares fueron observados [116]-[118] para el desacople de la conductividad eléctrica molar, Λ , y la viscosidad de sales simples (NaCl , LiCl , MgCl_2) en soluciones acuosas de trehalosa. En ese caso, se basaron en la Ec. (6.1) (ley de Walden) que es equivalente a la relación de Stokes-Einstein (SE).

En esta sección se muestran los resultados obtenidos para la difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de trehalosa sobre-enfriadas, usando la técnica FRAP. El objetivo fue establecer el rango de validez del modelo clásico hidrodinámico en este importante sistema y estimar la movilidad del soluto cuando se alcanza la temperatura de transición vítrea.

El arreglo experimental es el mismo que el empleado para medir la difusión de fluo-

resceína en soluciones de sacarosa acuosa. En la sección 5.1.2 se explicó también el método de calibración usado, que permitió determinar un ancho del haz de escritura de $\omega = 70,1 \mu\text{m}$.

La concentración de fluoresceína en las mezclas de trehalosa-agua estuvo por debajo de las $15 \mu\text{M}$, la concentración de trehalosa se ubicó en el rango de 27 a 80 % ω/ω y la temperatura se varió entre 15°C y 20°C . Por lo tanto, la relación T_g/T estuvo entre 0,55 y 0,95. Aquellas soluciones cuya concentración de trehalosa superó el 40% ω/ω y $T \leq 20^\circ\text{C}$ entraron en el régimen sobre-enfriado, por lo que se prepararon inmediatamente antes de la medición y se las mantuvo por encima de la curva de solubilidad, para minimizar la posibilidad de cristalización. Los tiempos de medición para las soluciones más concentradas de trehalosa fue del orden de 2500 segundos. Sin embargo, como se verá, el coeficiente de difusión se estimó a partir del primer tramo de la curva de recuperación (usualmente por debajo de los 600 segundos), de manera de poder despreciar los efectos de la formación de núcleos de cristalización y convectivos.

El análisis del modelo continuo de la difusión hidrodinámica requiere el conocimiento del la viscosidad dinámica de las soluciones de azúcar. El cálculo de η se realizó usando ecuaciones de interpolación para los resultados experimentales en soluciones acuosas de trehalosa registrados por Miller *et al.* [118]-[20], Magazú *et al.* [13][119]-[121], Elias y Elias [122] y Rampp *et al.* [115].

Las ecuación WLF (Ec. (2.7)) y la ley de potencias (Ec. (3.6)) conducen a diferencias entre los valores calculados y los experimentales para soluciones de trehalosa de hasta 0,9 y 0,8 unidades de $\log_{10} \eta$, respectivamente. Con la ecuación polinomial [102],

Tabla 5.4: Valores estimados de T_g para soluciones acuosas de trehalosa.

c (% ω/ω)	T_g (K)	c (% ω/ω)	T_g (K)
27,20	152,5	63,07	199,0
31,72	156,4	67,84	209,6
36,29	160,7	74,67	228,4
41,18	165,9	77,26	236,9
50,85	178,1	77,31	237,0
54,48	183,5	79,54	245,2
60,52	194,0	80,35	248,3

$$\log_{10}(\eta/\text{mPa}\cdot\text{s}) = 0,40 - 8,03(T_g/T) + 15,96(T_g/T)^2 \quad (5.4)$$

la viscosidad de las soluciones de trehalosa se ajustan a una desviación estándar 0,10 unidades de $\log_{10} \eta$ en el rango de $0,390 < T_g/T < 0,901$.

Los valores de T_g para las soluciones de trehalosa fueron estimadas a partir de datos experimentales (T_g *midpoint*) por Miller *et al.* [19, 20] y Saleki-Gerhardt [123], usando la ecuación de Gordon y Taylor [103]. En la Ec. (5.2), ahora consideramos que $T_{g1} = 388$ K y $T_{g2} = 135$ K, son las temperaturas de transición vítrea del disacárido puro y del agua pura respectivamente, y $k_{GT} = 5,04 \pm 0,04$ es un parámetro de ajuste. Este valor es compatible con las conclusiones dadas en la Ref. [104]. La Tabla 5.4 resume los valores de T_g para las soluciones de trehalosa a las concentraciones estudiadas en este trabajo.

5.2.2 Resultados

En las Figuras 5.6 y 5.7 se muestran los resultados de la recuperación de fluoresceína en trehalosa para dos concentraciones diferentes. Ambas se representan transformadas

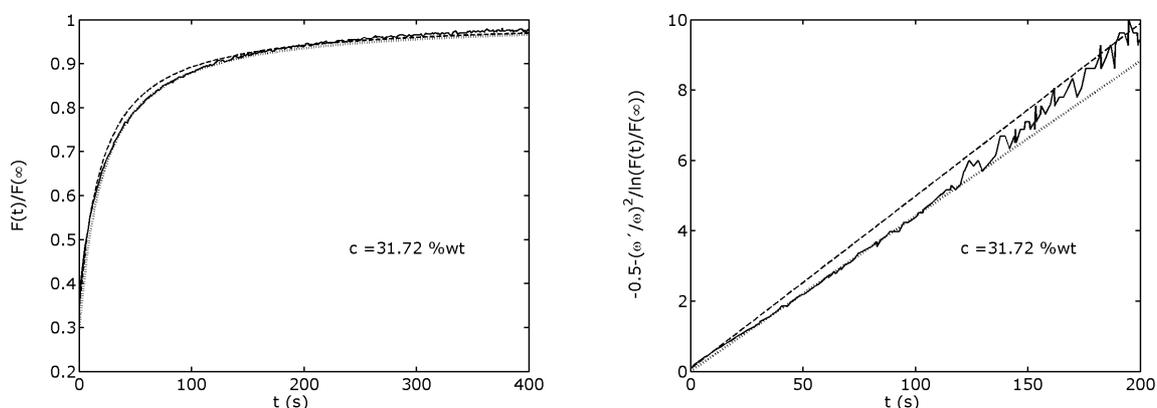


Figura 5.6: Funciones de recuperación en su forma pura (izquierda) y representadas de acuerdo con la transformación de la derecha de la Ec. (4.15), para la fluorescencia de fluoresceína en solución acuosa de 31,72 % ω/ω trehalosa. Las líneas llenas corresponden a los datos experimentales, las líneas segmentadas al método de ajuste de Axelrod *et al.* [84] y las líneas punteadas al ajuste robusto.

de acuerdo con el segundo miembro de la Ec. (4.15) y sin transformar. Se incluyen los ajustes según el método de tres puntos de Axelrod *et al.* [84] y el estimador lineal robusto. Las principales características del proceso de ajuste fueron discutidas en la sección 4.5.3.

Está claro que el ajuste lineal robusto de la Ec. (4.15) para $F(t) < 0,9$ es mejor que el ajuste correspondiente usando el método de los tres puntos [84], principalmente porque, como dijimos antes, el ajuste lineal robusto privilegia los datos en tiempo intermedio, donde los errores experimentales son minimizados.

Los resultados de la difusión de fluoresceína en mezclas de trehalosa-agua en regímenes normal y sobre-enfriado están resumidos en la Tabla 5.5. Solamente se muestran los coeficientes de difusión obtenidos mediante el método de estimación lineal robusto (Ec. (4.15)) junto con la viscosidad de las soluciones a las temperaturas de trabajo. En general la incertidumbre de los coeficientes de difusión obtenidos con el ajuste

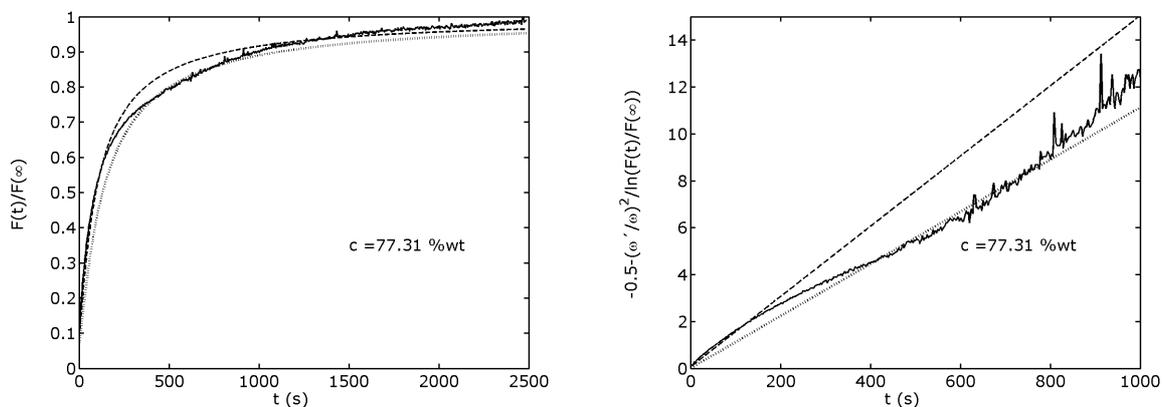


Figura 5.7: Funciones de recuperación en su forma pura (izquierda) y representadas de acuerdo con la transformación de la derecha de la Ec. (4.15), para la fluorescencia de fluoresceína en solución acuosa de 77,31 % ω/ω trehalosa. Las líneas llenas corresponden a los datos experimentales, las líneas segmentadas al método de ajuste de Axelrod *et al.* [84] y las líneas punteadas al ajuste robusto.

lineal robusto es mucho menor del obtenido usando el método de los tres puntos, particularmente para las soluciones sobre-enfriadas de trehalosa.

Resulta claro que, a una misma concentración y temperatura, la desviación de las mediciones individuales respecto de su valor medio es mayor que la desviación estándar del conjunto (ver Tabla 5.5). Esto es particularmente cierto en el caso de las soluciones sobre-enfriadas, o sea, para todas las soluciones con concentraciones de trehalosa mayores que 40 % ω/ω , tal como se puede inferir del diagrama de fases suplementario del sistema trehalosa-agua mostrado en la Figura 5.8, basado en los datos de Miller *et al.* [19]. Por lo tanto, mientras que la dispersión de los datos de difusión en soluciones estables (concentraciones de trehalosa menores que 40 % ω/ω) es una clara consecuencia de la técnica experimental, la dispersión mayor para las soluciones sobre-enfriadas sería debida al inicio de un proceso de cristalización de la trehalosa en las muestras. En el régimen sobre-enfriado, la nucleación en el disacárido podría hacer que el sistema sea nano-heterogéneo y que la migración de agua desde la matriz tenga lugar antes de

Tabla 5.5: Coeficiente de difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de trehalosa.

c (% ω/ω)	T (K)	T_g/T	η (mPa.s)	K	D ($\times 10^{11}$ m ² .s ⁻¹)
27,20	295,8	0,5154	3,24	2,40	29,2 \pm 4,7
				2,81	21,3 \pm 2,3
				2,38	28,2 \pm 3,5
31,72	295,8	0,5289	4,22	2,09	17,6 \pm 1,2
				2,61	21,4 \pm 3,2
				3,01	12,1 \pm 0,9
				2,78	12,2 \pm 1,0
				2,62	11,3 \pm 0,7
36,29	295,4	0,5440	5,82	3,72	14,5 \pm 1,3
				4,14	13,3 \pm 1,4
				3,67	12,1 \pm 1,4
				4,51	10,2 \pm 1,0
41,18*	293,2	0,5657	9,39	3,91	9,6 \pm 0,6
				4,09	3,7 \pm 0,1
50,85*	295,0	0,6037	23,4	3,68	23,9 \pm 1,6
	293,1	0,6076	25,8	4,37	17,9 \pm 1,3
	288,0	0,6184	34,2	3,45	11,6 \pm 0,5
54,48*	278,1	0,6600	109	2,97	2,84 \pm 0,07
60,52*	295,4	0,6568	99,1	3,20	4,8 \pm 0,1
63,07*	296,2	0,6720	156	2,68	5,9 \pm 0,2
67,84*	283,3	0,7400	1,47.10 ³	1,37	0,19 \pm 0,02
74,67*	296,6	0,7700	4,47.10 ³	1,18	1,92 \pm 0,09
				1,17	1,09 \pm 0,05
				1,41	0,751 \pm 0,009
77,31*	294,3	0,8055	1,85.10 ⁴	7,76	1,47 \pm 0,04
				11,76	1,37 \pm 0,01
79,54*	288,9	0,8486	1,21.10 ⁵	1,67	0,44 \pm 0,01
80,35*	291,2	0,8527	1,46.10 ⁵	1,48	0,232 \pm 0,006

* soluciones sobre-enfriadas.

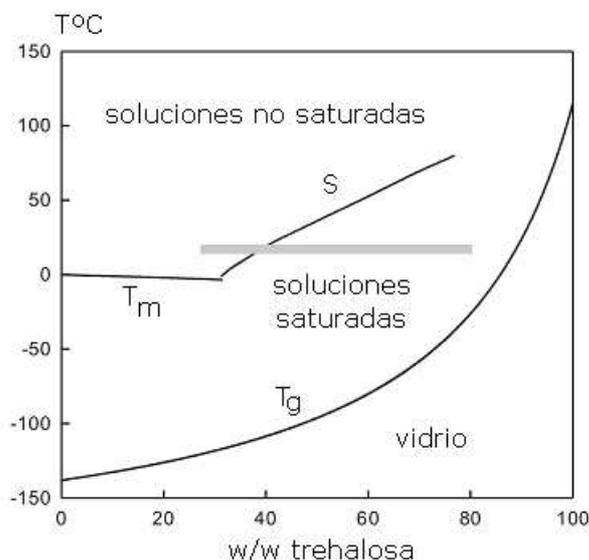


Figura 5.8: Diagrama de fase suplementario para soluciones de trehalosa acuosa. T_m corresponde a la temperatura de equilibrio de fusión del agua, S a las curvas de equilibrio de la solubilidad de la trehalosa [19] y T_g a la temperatura de transición vítrea de la trehalosa [19]. El área gris corresponde a la región donde fueron realizadas las mediciones de la difusión.

la cristalización del azúcar. La magnitud de este efecto depende de cómo la muestra alcanzó el estado sobre-enfriado y puede afectar la reproducibilidad de las mediciones de difusión. Sin embargo, no tendría un efecto notorio en la temperatura de transición vítrea, que sólo variaría si ocurre una cristalización masiva.

La desviación típica en las mediciones de trehalosa acuosa sobre-enfriada fue similar a las de sacarosa acuosa (sobre-enfriada), y menor a las reportadas por Champion *et al.* para soluciones de sacarosa altamente concentradas.

A pesar del hecho de que el comienzo de la cristalización afecta fuertemente la reproducibilidad del coeficiente de difusión en soluciones sobre-enfriadas, los resultados, analizados globalmente, nos permiten obtener conclusiones confiables respecto del fenómeno de desacople en este sistema.

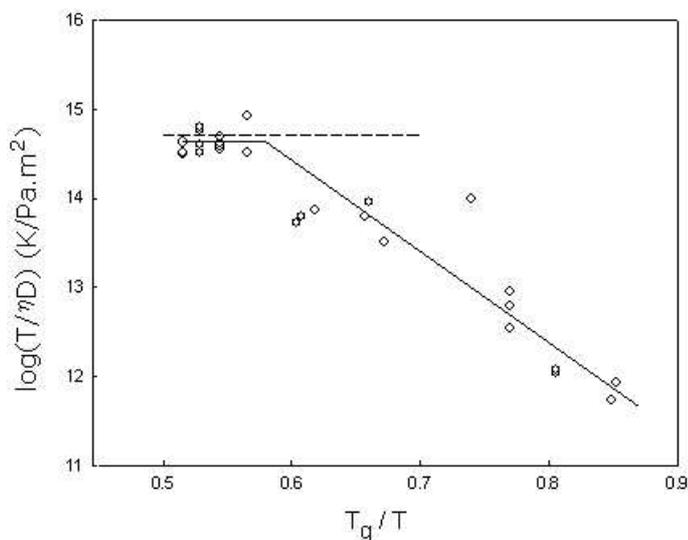


Figura 5.9: Gráfico de Stokes-Einstein para la difusión de la fluoresceína en soluciones acuosas de trehalosa. La línea segmentada representa el valor de la fluoresceína en agua. Las líneas llenas son simplemente una guía para el ojo (la línea horizontal entre $0,51 < T_g/T < 0,57$ corresponde al valor promediado en este rango).

El gráfico de SE de la Figura 5.9 muestra claramente que para soluciones de concentración moderada ($T_g/T < 0,60$), la relación SE se mantiene y el radio hidrodinámico de la fluoresceína es ligeramente menor que el determinado en agua y en soluciones acuosas diluidas de sacarosa. Probablemente la interacción de fluoresceína con la sacarosa conduce a especies de mayor tamaño que en el caso de la trehalosa.

Estudios recientes de la conductividad eléctrica de los iones de borato en soluciones de sacarosa y trehalosa [124] demuestran que la trehalosa forma ésteres de borato de tamaños hidrodinámicos menores que los de la sacarosa, aunque en este caso el soluto forma uniones covalentes con el sacárido.

Por arriba de $T_g/T \approx 0,60$ se observa un desacople difusión-viscosidad. La difusión del soluto es tres órdenes de magnitud mayor que el esperado por la relación SE para

el valor más alto de T_g/T estudiado. Comparando los gráficos SE de las Figuras 5.1 y 5.9 se puede concluir que el desacople para la difusión de fluoresceína en soluciones de sacarosa y trehalosa tiene lugar a alrededor de la misma T_g/T y su magnitud también es bastante similar. Esto es razonable, teniendo en cuenta que la estructura de ambos disacáridos es muy similar, y considerando que su interacción con la fluoresceína no debería ser muy diferente.

Como ya se mencionó, la estructura química y la carga del anión fluoresceína depende del pH (ver Figura 5.2) [109]. Recordemos que el ángulo entre el plano del grupo *xanthene* y el plano del anillo benzénico es 90° para la forma dianiónica y 70° para la forma monoaniónica.

En las muestras preparadas para este trabajo se agregó hidróxido de sodio para tener un $\text{pH} \approx 8$, de tal manera que la especie dianiónica fuera predominante. La solvatación de la fluoresceína dianiónica en el agua y en las mezclas de agua y sacarosa en la región de bajo T_g/T corresponden a espesores de alrededor de 0,14 nm y 0,29 nm respectivamente, dependiendo de las condiciones de borde adoptadas para la fricción soluto-solvente [125]. Los resultados de este trabajo indican que la solvatación del dianión en trehalosa acuosa es similar o aún menor que en soluciones de sacarosa.

5.3 Difusión de dextrano-fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa

5.3.1 Introducción

En las secciones 5.1 y 5.2 se estudió el desacople difusión-viscosidad en soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa. El soluto iónico usado fue fluoresceína. El objetivo era analizar su movilidad en un ambiente caracterizado por heterogeneidades dinámicas, en el régimen sobre-enfriado.

El objetivo planteado aquí es saber si las propiedades de movilidad de solutos pequeños (respetto del solvente) se siguen manteniendo cuando éste es mucho mayor que las moléculas de su entorno (solvente). En el régimen sobre-enfriado, el soluto debe difundir por un medio heterogéneo. Pero si las heterogeneidades dinámicas del líquido sobre-enfriado son más pequeñas que el tamaño del soluto, la difusión de este último debería seguir un comportamiento dado por la relación de Stokes-Einstein. En cambio, si observamos un desacople para solutos de gran tamaño, deberemos considerar que las heterogeneidades tienen también tamaños aún mayores a los de estos solutos.

5.3.2 Resultados

El estudio de la movilidad de solutos grandes se realizó de manera análoga a la descrita en las secciones 4.2 y 5.2.1. En este caso, se reemplazó a la fluoresceína por polímeros de glucosa (dextranos, $[C_6H_{10}O_5]_n$), donde hay en promedio, una molécula de fluoresceína-isothiocyanato (FITC, $C_{21}H_{11}NO_5S$) cada 250 monómeros (eslabones de la cadena). El

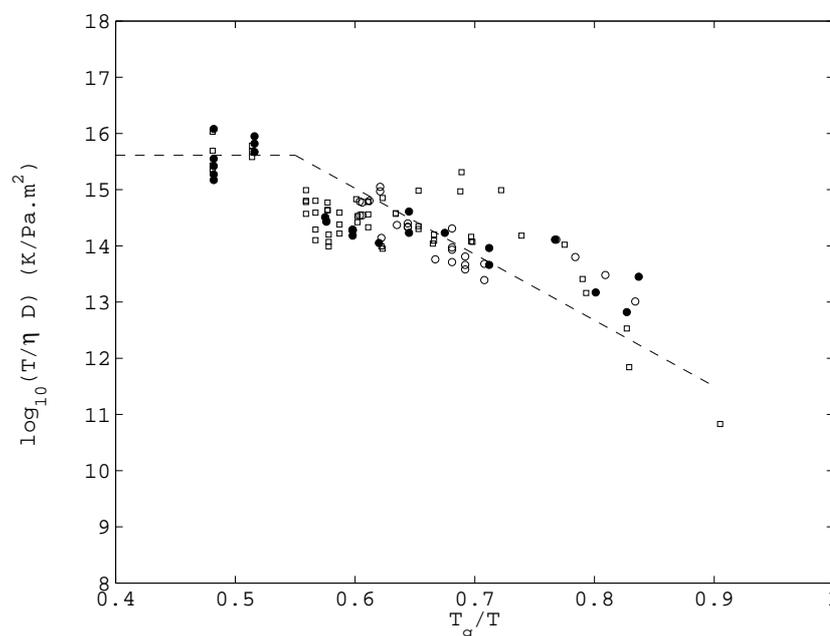


Figura 5.10: Gráfico de Stokes-Einstein para la difusión de fluoresceína-isothiocyanato-dextrano (FITC+dextrano) en soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa. (□) FITC+dextrano ($M = 70.000$ g/mol) en sacarosa acuosa. (○) FITC+dextrano ($M = 4.000$ g/mol) en trehalosa acuosa. (●) FITC+dextrano ($M = 70.000$ g/mol) en trehalosa acuosa. La línea de trazos horizontal señala el valor promedio $\log_{10}(T/\eta D) = 15,63$ para $T_g/T < 0,55$. La línea de trazos para $T_g/T > 0,55$ guía la vista en a región de desacople.

FITC+dextrano fue adquirido a la firma Sigma-Aldrich. Se usaron cadenas de peso molecular 4.000 g/mol y 70.000 g/mol. El grado de ramificación de las cadenas no superó el 5%, según informa Sigma-Aldrich. Al igual que en el caso de la fluoresceína, la concentración fue igual o inferior a $15 \mu\text{M}$.

La preparación de las muestras de sacarosa y trehalosa fue similar al caso de la fluoresceína (ver secciones 4.2 y 5.2.1). En la Figura 5.10 se muestran los resultados obtenidos.

En la Figura 5.10 se observa que, aunque hay pocos datos para FICT+dextrano 70.000 en la region donde no se espera desacople ($T_g/T < 0,55$), es claro que la relación de Stokes-Einstein se cumple para valores $\log_{10}(T/\eta D) \cong 15,65$ (sacarosa) y

Tabla 5.6: Radios hidrodinámicos de fluoresceína y FITC+dextrano 70.000 en soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa.

Soluto - Solvente	<i>stick</i> (nm)	<i>slip</i> (nm)
fluoresceína - sacarosa acuosa	0,49	0,74
fluoresceína - trehalosa acuosa	0,37	0,56
FITC+dextrano 70.000 - sacarosa acuosa	3,71	5,56
FITC+dextrano 70.000 - trehalosa acuosa	3,82	5,73

$\log_{10}(T/\eta D) \cong 15,62$ (trehalosa). Para el caso de FITC+dextrano 4.000, en trehalosa, los datos arrancan en la zona donde ya hay desacople. En la Tabla 5.6 se resumen los radios hidrodinámicos de fluoresceína y de FITC+dextrano 70.000, válidos en la región SE.

El punto de quiebre en la relación SE se produce para valores de T_g/T similares al caso de la fluoresceína. El comportamiento global de las tres soluciones es muy parecido. Sin embargo, el soluto FITC+dextrano 70.000 en sacarosa acuosa muestra una dispersión de datos mayor en la región cercana a $T_g/T \approx 0,7$. Es difícil dar una explicación a este fenómeno, pero evidentemente tiene que ver con el solvente (sacarosa acuosa) más que con el soluto. En la sección 5.1.3 se comentó que, dado que la solución alcanza la saturación y que la viscosidad no es aún muy elevada, se favorece el proceso de nucleación.

El hecho de que la difusión de solutos grandes supere las previsiones de Stokes-Einstein no era esperable. Ante la ausencia de heterogeneidades dinámicas, el solvente se comportaría como un continuo respecto del tamaño del soluto. Las heterogeneidades, sólo podrían obstruir la difusión del soluto, pero nunca favorecerla. Este punto se analizará en la sección 6.3.

Capítulo 6

Discusión de los resultados y conclusiones

6.1 Movilidad de fluoresceína y otros solutos en soluciones acuosas de sacarosa sobre-enfriadas

La diferencia más importante entre nuestros resultados para la difusión del di-anión fluoresceína en sacarosa acuosa y las de literatura [9] está en la temperatura reducida en la que se observa el desacople difusión-viscosidad (ver Figuras 5.1 y 5.4). Claramente, esto no se debe a la función de recuperación propuesta en este trabajo.

La falta de información sobre difusión de solutos en soluciones acuosas sobre-enfriadas en general, y en soluciones de sacarosa en particular, impide llegar a una conclusión definitiva respecto de las discrepancias mencionadas. Sin embargo, puede contribuir al

análisis la determinación reciente del coeficiente de difusión de un soluto neutro (ferrocenometanol) en sacarosa acuosa. Éste se obtuvo por medio de métodos electroquímicos [8].

Los coeficientes de difusión fueron determinados en un rango de concentración y temperaturas similar a los usados en este trabajo y los resultados mostraron un desacople difusión-viscosidad a partir de $T_g/T \approx 0,76$. El radio hidrodinámico del ferrocenometanol en soluciones de sacarosa, calculado usando la Ec. (2.2) de SE, fue de $0,31 \pm 0,03$ nm, ligeramente más grande que el registrado por Miao *et al.* [126] en agua ($0,275 \pm 0,04$ nm). Por consiguiente, se concluyó [8] que este soluto neutro se encuentra muy poco solvatado en mezclas sacarosa-agua. Esto es consecuencia de una interacción débil con el solvente binario.

La mayoría de los modelos teóricos que describen el desacople o violación de Stokes-Einstein en líquidos formadores de vidrios [127]-[129] consideran la existencia de regiones líquidas de alta movilidad en la cercanía de la temperatura de transición vítrea. La desviación respecto de la relación SE, medida por D/D_{SE} (donde D es el coeficiente de difusión y D_{SE} es el calculado con la Ec. (2.2)), depende de la relación entre el tamaño del soluto y el tamaño del solvente, r/R , siendo despreciable cuando $r/R > 6 - 7$ y creciente hasta un factor de 1000 cuando $r/R \rightarrow 1$ [66]. También se vuelve más grande la desviación cuando se alcanza la temperatura de transición de vítrea.

De acuerdo con los resultados teóricos, se hubiera esperado una desviación más grande para el ferrocenometanol respecto de la fluoresceína. Los resultados de este trabajo muestran lo contrario. Pero aquí, las interacciones soluto-solvente juegan un papel importante en la violación de la relación SE. Esta afirmación se apoya en mediciones de la

conductividad eléctrica de sales simples (NaCl, CsCl, MgCl₂ y bromuro de tetrabutilamonio) en mezclas de sacarosa-agua [118][116, 117]. En este caso la regla de Walden [130] es el equivalente de la Ec. (2.2) de SE para la conductividad eléctrica molar, Λ , de solutos iónicos con carga z ,

$$\Lambda = \frac{z^2 e \mathcal{F}}{A \eta r_H} \quad (6.1)$$

donde $1/r_H = 1/r_{H^+} + 1/r_{H^-}$ es la suma de la recíproca de los radios iónicos, e es la carga del electrón, \mathcal{F} es la constante de Faraday y A es una constante que depende de la condición de contorno soluto-solvente.

La conductividad eléctrica molar no decrece proporcionalmente a la inversa de la viscosidad de la solución, sino que decrece menos de lo predicho por la Ecuación (6.1). Se encontró que este efecto es similar tanto para el NaCl como para el bromuro de tetrabutilamonio, indicando que el efecto tamaño es, al menos en parte, compensado por la interacción con el solvente.

Es posible que la mayor temperatura de quiebre en la relación SE observada para la fluoresceína, respecto del ferrocenometanol, se deba a una mayor interacción de la fluoresceína iónica con las moléculas sacarosa-agua, lo que modifica localmente las regiones líquidas en el líquido sobre-enfriado. Esto es un punto muy relevante para validar las teorías del desacople en líquidos sobre-enfriados. En el apéndice D.3 se pueden ver cálculos detallados que describen el tipo de interacciones posibles.

6.2 Movilidad de fluoresceína y otros solutos en soluciones acuosas de trehalosa sobre-enfriadas

En la sección 5.2.2 se presentaron los resultados sobre la difusión de fluoresceína en trehalosa acuosa. Se construyó un gráfico $T/\eta D$ vs. T_g/T que muestra el apartamiento respecto de la relación de Stokes-Einstein. En la región de altos valores de T_g/T de la Figura 5.9, donde se observa el desacople, podemos comparar la movilidad de fluoresceína y de otros solutos iónicos en soluciones sobre-enfriadas de trehalosa y sacarosa. Para ello se grafica la inversa del radio hidrodinámico efectivo, calculado a partir de las mediciones de la difusión y conductividad eléctrica mediante el uso de las Ec. (2.2) y (6.1). El radio efectivo no es un radio verdadero del soluto porque ambas ecuaciones asumen que los solutos son esféricos y los solventes continuos, sin estructura. No obstante, estos cálculos nos dan una idea del tamaño hidrodinámico del soluto cuando se mantiene el modelo clásico hidrodinámico, y cuando se grafican en función de T_g/T , permitiendo detectar una desviación respecto de este régimen, es decir, el desacople difusión-viscosidad. En el apéndice D.1 se puede ver que las desviaciones debidas a cambios en la conformación molecular del soluto son mucho menores (y, por lo tanto, despreciables) respecto de las detectadas en la región de desacople.

La Figura 6.1 muestra la inversa del radio hidrodinámico del electrolito ($r_+^{-1} + r_-^{-1}$) en soluciones acuosas de sacarosa y de trehalosa para NaCl y para electrolitos que contienen iones más grandes que las moléculas de agua, como en los casos del bromuro y el yoduro de tetrabutilamonio. Ellos fueron calculados a partir de las mediciones de la conductividad eléctrica y de la viscosidad, usando la Ec. 6.1 en condición *stick*. Los

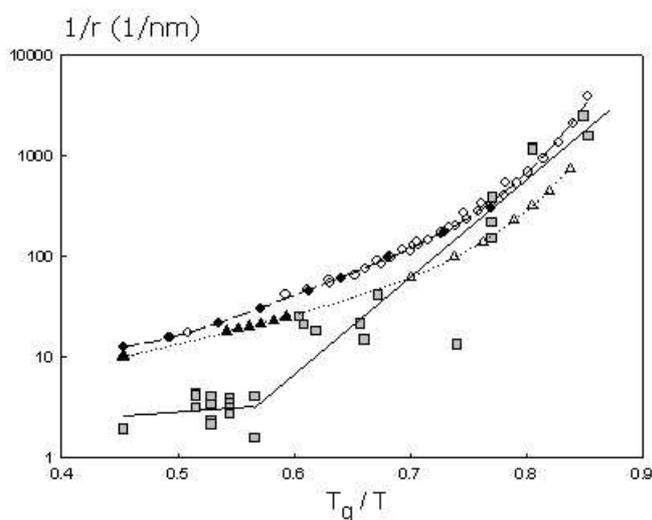


Figura 6.1: Inversa del radio hidrodinámico del NaCl en sacarosa (\circ) y en trehalosa (\bullet); $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NBr}$ en soluciones de sacarosa (\triangle); y $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NI}$ en soluciones de trehalosa (\triangle negros), calculados a partir del producto de Walden medido ($\Lambda\eta$) [116, 131], (\square gris) fluoresceína en soluciones de trehalosa (este trabajo).

resultados corresponden a NaCl en soluciones acuosas [116] para concentraciones entre 65,11 y 76,17 % ω/ω y temperaturas entre -20°C y 50°C , a NaCl en soluciones acuosas [116] de trehalosa a 68,07 % ω/ω y temperaturas entre -20°C y 45°C , a bromuro de tetrabutilamonio en soluciones acuosas [131] de sacarosa a 76,27 % ω/ω y temperaturas entre -15°C y 35°C , a yoduro de tetrabutilamonio en soluciones acuosas [131] de trehalosa a 39,13 % ω/ω y temperaturas entre -5°C y 20°C . También se grafican los valores en agua pura.

Los comportamientos del NaCl y de las sales de tetrabutilamonio en soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa son similares: todos presentan un desacople de la movilidad del ion y de la viscosidad que se extiende sobre todo el rango de T_g/T investigado. En efecto, la inversa del radio iónico hidrodinámico de esos electrolitos aumenta monótonamente con T_g/T , indicando que no se obedece la relación SE aún en agua o

en soluciones diluidas. El origen del desacople, según indican simulaciones de dinámica molecular para los sistemas NaCl-trehalosa-agua [118], está relacionado con la existencia de heterogeneidades locales, donde los iones están rodeados por agua más que por trehalosa. La misma mecánica estaría operando para iones de sales de tetrabutilamonio en solución.

En la Figura 6.1 se grafica también, para comparar, la inversa del radio hidrodinámico de fluoresceína en soluciones acuosas de trehalosa y en agua, que es similar al de soluciones sacarosa-agua donde el desacople ocurre a $T_g/T \approx 0,76$. En general, el comportamiento de este soluto iónico es similar al hallado para el NaCl y el yoduro de tetrabutilamonio en trehalosa acuosa, excepto que, dentro de la dispersión experimental típica de las mediciones FRAP, la relación SE se mantiene en la angosta región $0,45 < T_g/T < 0,60$.

Hay que notar que el radio hidrodinámico de la fluoresceína en una solución diluida de sacarosa, según las mediciones de la difusión [125] es 0,49 nm para la condición *stick* y 0,74 nm para la condición *slip*. El radio cristalográfico del dianión de fluoresceína es sólo $r_C \approx 0,35$ nm. Por consiguiente, el hecho de que la inversa de su radio hidrodinámico (en agua y en soluciones diluidas) sea menor, en comparación con la de otras sales, se puede atribuir a una combinación del efecto de tamaño y de la solvatación.

La meseta en el gráfico SE para la fluoresceína sigue un comportamiento similar al del ferrocenometanol en soluciones acuosas de sacarosa [8], donde la SE es válida hasta $T_g/T \approx 0,75$. Parece razonable racionalizar estos resultados en términos de la interacción de estos solutos con la mezcla agua-disacárido. La difusión de fluoresceína dada por FRAP es dominada por la movilidad del dianión de fluoresceína foto-blanqueada, con los aniones del sodio (fluoresceína disódica) que siguen el campo

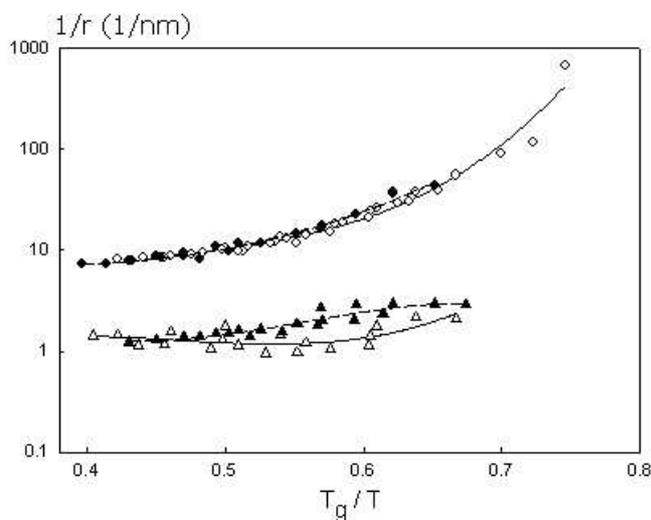


Figura 6.2: Inversa del radio hidrodinámico para la difusión del agua (círculos) y carbohidratos (triángulos) en soluciones de trehalosa (símbolos abiertas, línea llena) y sacarosa (símbolos cerrados, línea segmentada) calculado a partir de los datos de difusión [115].

de difusión creados por la difusión del dianión. Ambos, el dianión de fluoresceína y el ferrocenometanol (neutro), no son solutos esféricos (cfr. apéndice D.2) y tienen una movilidad hidrodinámica clásica (SE) lejos de la temperatura de transición vítrea (valores bajos de T_g/T). Cuando la solución se vuelve fuertemente sobre-enfriada la presencia de heterogeneidades dinámicas y/o la irrupción de solvatación preferencial (heterogeneidades estructurales) induciría el colapso de la relación SE.

Con el fin de dar soporte a este argumento es interesante comparar el comportamiento de estos solutos en mezclas de agua y agua-disacárido con los resultados de la difusión de sus componentes principales (agua y disacárido). Los datos de Lüdemann y colaboradores [115] para los sistemas agua-sacarosa y agua-trehalosa están resumidos en la Figura 6.2, que muestra cómo el coeficiente de intradifusión cambia con T_g/T . El rango graficado de los valores T_g/T en la Figura 6.2 corresponde a concentraciones de disacárido comprendidas entre 30 y 70 % ω/ω y temperaturas desde 25 °C hasta 80°C.

A pesar del hecho que la relación SE es estrictamente válida para dilución infinita del soluto en el solvente, y que las curvas mostradas en la Figura 6.2 podrían estar afectadas por interacciones entre soluto-soluto, el comportamiento del coeficiente de difusión del agua en soluciones de sacarosa y trehalosa se parece al encontrado para solutos iónicos, es decir, el desacople se observa en todo el rango de la inversa de temperaturas reducidas. Por otro lado, la difusión de los disacáridos parece seguir la relación SE independientemente del grado de sobre-enfriamiento.

La mayor movilidad en las moléculas de agua respecto de las de azúcar, en la región sobre-enfriada y cercana a la transición vítrea, ya fue sugerida por Lüdemann y colaboradores [21]. Simulaciones de dinámica molecular (*coarse grain molecular dynamics*) realizadas por Molinero *et al.* [38] en soluciones de sacarosa acuosa apoyan esta hipótesis.

Recordemos que el modelo teórico de Xia y Wolynes [66], que asume una distribución de heterogeneidades, muestra que la desviación respecto de Stokes-Einstein depende de la relación entre el radio del soluto y el de las moléculas de solvente (o sea, del entorno del soluto) r/R . Cuando $r/R > 6$ la desviación es despreciable, pero cuando $r/R \rightarrow 1$ ésta se vuelve creciente. Además, la desviación es mayor cuando nos aproximamos a la transición vítrea. Esto podría explicar las mayores desviaciones para el NaCl y $(C_4H_9)_4NBr$ en sacarosa y trehalosa acuosa respecto de la fluoresceína, y también la desviación en la difusión del agua en las soluciones agua-azúcar, no observada en la difusión del azúcar (ver Figura 6.2). Sin embargo, el modelo falla para explicar la menor desviación del ferrocenometanol respecto de la fluoresceína, observada en las soluciones de sacarosa [8, 125]. Por lo tanto, las interacciones soluto-solvente deberían afectar la distribución de heterogeneidades en el régimen sobre-enfriado y ser determinante en el

desacople difusión-viscosidad.

Es posible que la correlación entre la difusión del agua y los iones en esas soluciones sobre-enfriadas sea una consecuencia de que los iones se están moviendo en ambientes ricos de agua en esos sistemas, y por lo tanto, los flujos del ion y el agua estarían acoplados [118]. Un modelo de distribución de heterogeneidades en líquidos sobre-enfriados, aplicado a sistemas binarios azúcar-agua, debería incluir la posibilidad de que existan regiones de movilidad lenta y rápida aún lejos de la transición vítrea, como consecuencia de nano-heterogeneidades surgidas por uniones puente de hidrógeno entre el agua y el azúcar.

La presencia de solutos iónicos modifica, localmente, la estructura binaria del solvente. Es esperable que pequeños iones se solvaten preferencialmente con agua [118]. En los iones grandes, esta tendencia puede estar mitigada e, incluso, las moléculas de azúcar podrían reemplazar al agua en la capa de solvatación. Por lo tanto, la solvatación preferencial podría favorecer la formación de heterogeneidades estructurales en estos sistemas azúcar-agua.

En el apéndice E se describe un posible mecanismo general para explicar el desacople difusión-viscosidad a partir de la presencia de heterogeneidades estructurales.

Grandes solutos neutros, tales como el ferrocenometanol, y iones marcadamente no esféricos, tales como los dianiones de fluoresceína (cfr. apéndice D.2), siguen la relación SE salvo que las heterogeneidades estructurales o dinámicas induzcan al desacople (cerca de la transición vítrea). Es lógico que esto tenga lugar a menor T_g/T para la fluoresceína que para el ferrocenometanol, dado su carácter iónico.

6.3 Movilidad de dextrano-fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa sobre-enfriadas

El estudio sobre la movilidad de fluoresceína deja de ser válido al incorporarse a cadenas largas de dextrano, aunque se mantienen algunos aspectos en común. Esencialmente, ya no vemos a la cadena como un obstáculo con forma propia. No podemos hablar de una forma típica de la cadena ya que cada eslabón de glucosa podrá flexionar y torsionar con cierto grado de libertad. Consecuentemente, la longitud característica que veníamos usando y que se identificaba con alguna dimensión del soluto (por ejemplo, el radio para una molécula esférica r_H) cobra aquí otro sentido. Landau y Lifshitz [132] demostraron estadísticamente para una distancia entre extremos R de la cadena y una longitud lineal de ésta L , que $\langle R^2 \rangle / L^2 \rightarrow 0$ conforme la cadena se hace cada vez más larga ($L \rightarrow \infty$). De manera que en el equilibrio termodinámico podemos esperar plegamientos en la cadena que conduzcan a una longitud característica media $\ell \ll L$. Estas conclusiones son válidas sin interacción con las moléculas de solvente [132]. Si agregamos las interacciones puente H y las carga-dipolo, el problema se vuelve aún más complejo. Por ejemplo, Paci *et al.* [133] muestran cómo se modifica la distribución de carga de fluoresceína en presencia de una macromolécula.

Una ventaja que surge inmediatamente del análisis de la movilidad de moléculas grandes (sustituidas a ciertos intervalos con FITC) es el hecho que, bajo ciertas condiciones, pueden seguir el comportamiento de Stokes. Esto es, si los plegamientos son capaces de inmovilizar gran cantidad de moléculas de agua, el conjunto se puede ver como una esfera de radio R [134].

Senti *et al.* [135] determinaron el radio hidrodinámico de dextranos en agua como

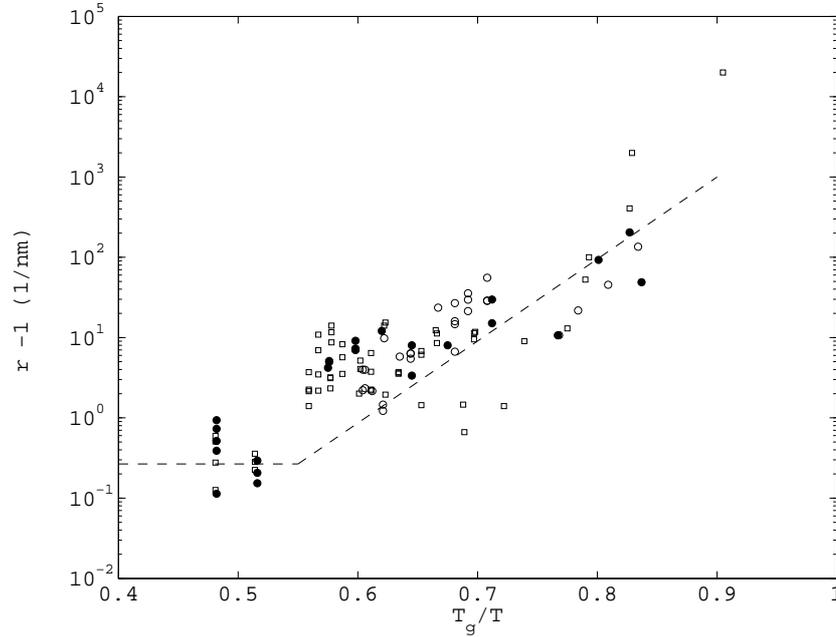


Figura 6.3: Inversa del radio hidrodinámico para la difusión de FITC+dextrano 70.000 en sacarosa acuosa (\square), FITC+dextrano 4.000 en trehalosa acuosa (\circ) y FITC+dextrano 70.000 en trehalosa acuosa (\bullet). La línea de trazos horizontal señala el valor $3,75^{-1} \text{ nm}^{-1}$. La línea de trazos con pendiente positiva guía la vista en la región del desacople difusión-viscosidad. Los radios se calcularon para la condición de adherencia (*stick*).

función de su peso molecular. Para pesos moleculares $4, 22 \cdot 10^5 \text{ g/mol} \leq M \leq 2, 7 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$ establecieron la ley de potencias,

$$R = \alpha \cdot M^\beta \quad (6.2)$$

donde $\alpha = 0,66$, $\beta = 0,43$, R está medido en \AA y M en g/mol . Ambos coeficientes, α y β , tienen una pequeña dependencia con el peso molecular. Amu [136] obtuvo los valores $\alpha = 0,449$ y $\beta = 0,43$ para el rango $2 \cdot 10^4 \text{ g/mol} \leq M \leq 1,3 \cdot 10^5 \text{ g/mol}$. Gibbon y Hardingham [137] determinaron que $\alpha = 0,904$ y $\beta = 0,37$ para el amplio rango $4 \cdot 10^3 \text{ g/mol} \leq M \leq 2 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$.

Si se aplica la Ec. (6.2) a dextranos de $M = 70.000$ g/mol resultan radios de 8 nm (Senti *et al.*), 5,4 nm (Amu) y 5,6 nm (Gribbon y Hardingham). Nuestros resultados, a pesar de presentar cierta dispersión experimental, están en relativamente buena correspondencia con los dos últimos. En la región $T_g/T < 0,55$ (ver Figuras 5.10 y 6.3) se obtuvo en promedio $R \cong 3,7$ nm para FITC+dextrano 70.000 en sacarosa acuosa y $R \cong 3,8$ nm para el mismo soluto en trehalosa acuosa. Ambos valores se calcularon en condición de adherencia (*stick*). En condición de deslizamiento (*slip*) resultan 5,6 nm y 5,8 nm, respectivamente. En la Figura 6.3 se representa la inversa del radio R^{-1} vs. T_g/T (para la condición de adherencia).

La Ec. (6.2) aplicada a FITC+dextrano 4.000 da un radio $R = 2,3$ nm. Con los coeficientes de Gribbon y Hardingham este valor apenas cambiaría a 2 nm. La magnitud en la dispersión de los datos de la Figura 6.3 no permitiría diferenciar a este soluto respecto del FITC+dextrano 70.000 para el régimen de Stokes-Einstein. Tampoco se diferencia su comportamiento respecto del desacople difusión-viscosidad. Ambos están correlacionados con la movilidad del agua en la mezcla (ver Figura 6.2). Este es un hecho sorprendente puesto la enorme diferencia de tamaños (más de un orden de magnitud) y la complejidad de las interacciones del dextrano con su entorno.

En las secciones anteriores se hizo un análisis detallado sobre la movilidad de la fluoresceína. Se comentó que ésta era capaz de trasladarse a través de las heterogeneidades por medio de regiones ricas en agua. No se pudo precisar la estructura de las heterogeneidades, pero se admitió que, al menos debían existir canales mayores al tamaño de la fluoresceína (y su capa de solvatación). El hecho de que los dextranos sigan el mismo comportamiento, induce a pensar que las heterogeneidades son suficientemente grandes como para que en estos solutos se observe la ruptura de la relación SE.

La investigación sobre la estructura de las heterogeneidades dinámicas en mezclas disacárido-agua requiere de la recolección de más datos. Pero, de acuerdo al análisis de los datos actuales, es posible decir algo más de ellas. En principio, pueden estar distribuidas en un amplio rango de tamaños, como sugieren Xia y Wolynes [65, 66]. Pero sabemos que la distribución debe ser tal que, en todo momento, haya suficientes canales o regiones de tamaño mayor a los 6 nm, ricas en agua. El valor de 6 nm es una cota inferior, surgida del hecho comprobado del desacople difusión-viscosidad para solutos del orden de los 5-6 nm.

6.4 Conclusiones finales y perspectivas

La solución propuesta para la función de recuperación FRAP (Ec. (4.15)), fue puesta a prueba respecto del método clásico de los tres puntos [84], usando la difusión de fluoresceína en soluciones acuosas de sacarosa como sistema modelo. El tratamiento de los datos con la nueva solución es mucho más simple que el método de los tres puntos y da errores menores cuando se la usa con un estimador lineal robusto.

Por otra parte, el análisis de los datos de la difusión de fluoresceína en un amplio rango de la viscosidad (o de temperaturas reducidas T_g/T) conduce a la misma conclusión que en estudios anteriores [9], salvo en la determinación de la temperatura en que se produce el quiebre en la relación de Stokes-Einstein. Las razones de esa diferencia no son del todo claras, pero es posible que en parte se deba a factores experimentales del método FRAP usado por Champion *et al.* [9]. Finalmente, el desacople entre difusión y viscosidad observado a mayores temperaturas ($T_g/T > 0,65$) para nuestro soluto iónico (fluoresceína), en comparación con uno neutro (ferrocenometanol, $T_g/T \approx 0,76$), es

atribuible a la mayor interacción soluto-solvente que compensa los efectos de su mayor tamaño.

El desacople entre difusión y viscosidad de la fluoresceína fue observado en soluciones acuosas de trehalosa sobre-enfriadas. De forma similar a los resultados reportados previamente en la sección 5.1 para soluciones acuosas de sacarosa, la relación SE no se cumple en el amplio rango de temperaturas reducidas $T_g/T > 0,6$.

La difusión de pequeños solutos en trehalosa y sacarosa a temperaturas próximas a la transición vítrea es más alta que la predicha usando la relación de Stokes-Einstein. Para $T_g/T \approx 0,85$, el coeficiente de difusión de fluoresceína es un factor 1000 veces mayor que el obtenido extrapolando el valor de alta temperatura del modelo hidrodinámico de Stokes. En consecuencia, el deterioro de las reacciones controladas difusionalmente en sistemas acuosos, en la proximidad de la temperatura de transición vítrea, sería de varios órdenes más alto que las predicciones basadas en la Ec. (2.2).

Para solutos iónicos, el desacople entre movilidad y viscosidad está relacionado no sólo con la presencia de heterogeneidades dinámicas, como sugiere el modelo teórico de Xia y Wolynes. La presencia de iones favorece la formación de otras heterogeneidades estructurales en las soluciones disacárido-agua. Los solutos iónicos, que mantienen una solvatación preferencial con el agua, pueden difundir más fácilmente a través de regiones ricas en agua, de menor viscosidad local respecto de la viscosidad media de la mezcla.

La movilidad de aniones de fluoresceína está correlacionada con la movilidad del agua en las mezclas disacárido-agua. La relación de Stokes-Einstein resulta válida en una región restringida a bajos valores de T_g/T . Además, la violación de la relación SE se produce

a mayores valores de T_g/T en solutos neutros, como se observó en el ferrocenometanol.

La correlación entre las interacciones iónicas y el desacople (violación de la relación SE) es compleja, particularmente en las mezclas disacárido-agua. Se requerirá de estudios posteriores sobre una mayor variedad de solutos (en tamaño y posibilidades de interacción) para comprender mejor la dinámica de estos sistemas.

Uno de los objetivos planteados al comienzo del trabajo fue investigar si las propiedades de transporte son las mismas en solutos grandes y pequeños, respecto del solvente. Se estudió la movilidad de largas cadenas de dextranos en las mezclas disacárido-agua como modelos de solutos grandes. Los resultados se compararon con los de la fluoresceína, de tamaño similar al disacárido.

Las estimaciones del radio hidrodinámico de FITC+dextrano (70.000 g/mol) se mostraron coincidentes con datos de literatura. Además, señalaron que estos solutos se plegaron, dando como resultado un radio hidrodinámico (efectivo) de un orden de magnitud mayor al disacárido.

No obstante la diferencia de tamaños, el comportamiento frente al desacople fue similar al de la fluoresceína. Ambos mostraron una violación de la relación de Stokes-Einstein (desacople difusión-viscosidad). Más aún, su movilidad estuvo correlacionada con la movilidad del agua en la región de desacople. Esto indujo a pensar que tanto los solutos grandes como los pequeños difundían por las mismas regiones. Es decir, por las regiones de mayor movilidad debidas a la presencia de mayor cantidad de agua, comparadas con el *bulk*. En consecuencia se pudo establecer una cota inferior para estas regiones. Según los resultados dados aquí, existirían en todo momento regiones de mayor movilidad de, al menos, un orden de magnitud mayor que el tamaño de

las moléculas de solvente (disacáridos). Se dice “en todo momento” porque hay que recordar que las heterogeneidades son dinámicas (cfr. sección 3.4), por lo que es posible que se cierren pasos, mientras se abren otros.

La determinación de cotas para las regiones de gran movilidad puede realizarse con solutos de prueba de distintos tamaños. Este procedimiento, si bien algo indirecto, puede constituir un método eficaz para *inspeccionar* la matriz en estudio. En este sentido, las posibilidades son amplias, pero requieren de un análisis previo sobre la forma de interacción esperada entre el soluto y el solvente.

Apéndice A

Datos de agua pura

Tabla A.1: Viscosidad dinámica $\eta(T, c)$ de agua pura (medido en cp (\equiv mPa.s)) a presión normal (~ 1 bar). Datos corregidos para que $\eta(293^\circ\text{K}) = 1,002$ cp .

T (K)	H ₂ O ^{a(1)}	H ₂ O ^b	H ₂ O ^c	H ₂ O ^d
238				18,7
239				16,4
240				14,3
241				12,7
242				11,3
243				10,2
244				9,2
245				8,4
246				7,7
247				7,0
248				6,45
249				5,95
250	5,20			5,45
251	4,91			5,05
252	4,60			4,67
253	4,33			4,36
254	4,07			
255	3,87			3,83
256	3,67			
257	3,50			3,42
258	3,34			3,24
259	3,17			3,10
260	3,03			
261	2,90			2,84
262	2,78			
263	2,66			2,60
264	2,55		2,546 ⁽⁶⁾	
265	2,45	2,4551 ⁽²⁾	2,456 ⁽⁷⁾	2,40
266	2,35	2,2960 ⁽³⁾	2,339 ⁽⁸⁾	
267	2,25		2,248 ⁽⁹⁾	2,22
268	2,16	2,1137 ⁽⁴⁾	2,119 ⁽¹⁰⁾	2,14
269	2,08			2,05
270	2,01			
271	1,93		1,928 ⁽¹¹⁾	1,92
272	1,86	1,8630 ⁽⁵⁾		
273	1,79	1,7919	1,796	1,80
275				
277				

Tabla A.2: Viscosidad dinámica $\eta(T, c)$ de agua pura (medido en cp (\equiv mPa.s)) a presión normal (~ 1 bar). Datos corregidos para que $\eta(293^\circ\text{K}) = 1,002$ cp . (Cont.)

T (K)	H_2O^e	H_2O^b	H_2O^g	H_2O^h	H_2O^i	H_2O^j	H_2O^k	H_2O^l
273							1,793	
278	1,53 ^{e(12)}	1,5190		1,5184				
283	1,30 ^{e(12)}	1,3067	1,3069				1,307	
288		1,1381	1,1382					
293	1,0020 ^f	1,0020	1,0020	1,0020	1,0020	1,0020	1,002	1,0020
298	0,8911 ^f	0,8902	0,8903			0,8903		0,8903
303	0,7983 ^f	0,7972	0,7975			0,7963	0,7977	0,7976
308		0,7191	0,7195					
313	0,6540 ^f	0,6527	0,6532	0,6531	0,6527	0,6532	0,6532	0,6531
318			0,5963					
323	0,5468 ^f		0,5471				0,5470	
328			0,5042					
333	0,4674 ^f		0,4666	0,4665	0,4665	0,4669	0,4665	
338			0,4334					
343			0,4039				0,4040	
348					0,3784			
353				0,3584		0,3560	0,3544	
358								
363				0,3148			0,3145	
368				0,2976				
373				0,2822	0,2820		0,2818	

- a* Referencia [138] (1) Valores interpolados entre datos cercanos.
- b* Referencia [139] (2) Medido a 264,72°K
- c* Referencia [139] y [140] (3) Medido a 266,353°K
- d* Referencia [141] (4) Medido a 268,466°K
- e* Referencia [143] (5) Medido a 271,892°K
- f* Referencia [139] y [148] (6) Medido a 263,7°K
- g* Referencia [139] y [144] (7) Medido a 264,52°K
- h* Referencia [139] y [145] (8) Medido a 265,77°K
- i* Referencia [139] y [146] (9) Medido a 266,8°K
- j* Referencia [139] y [147] (10) Medido a 268,3°K
- k* Referencia [142] (11) Medido a 270,9°K
- l* Referencia [139] y [149] (12) Valores obtenidos por ajuste de datos experimentales propios.

Apéndice B

Datos de soluciones de trehalosa

Tabla B.1: Viscosidad dinámica $\eta(T, c)$ de soluciones acuosas de trehalosa (medido en Pa.s). La concentración c está expresada en % g trehalosa/g solución.

T (K) †	3,7 ^a	4,9 ^a	6,6 ^a	8,7 ^a	10 ^b	11,2 ^a	15,9 ^a
273					0,00249		
283					0,00184		
293	0,001118	0,001160	0,001214	0,001274	0,00148	0,001391	0,001641
303					0,00115		
313	0,000700	0,000724	0,000765	0,000815		0,000885	0,001018
333	0,000507	0,000524	0,000544	0,000577		0,000617	0,000708
358	0,000379	0,000388	0,000397	0,000415		0,000435	0,000495
T (K) †	18,8 ^a	30 ^b	32,2 ^a	38,27 ^c	39,2 ^d	48,09 ^c	48,7 ^a
258					0,0900		
260							
263					0,0620		
264						0,08060 ⁽¹⁾	
268				0,01987 ⁽²⁾	0,0453	0,06418 ⁽²⁾	
273		0,00734		0,01552 ⁽⁴⁾	0,0350	0,04740 ⁽²⁾	
278				0,01260 ⁽²⁾	0,0275		
283		0,00506		0,01014 ⁽²⁾	0,0222	0,02760 ⁽²⁾	
288				0,008417 ⁽²⁾	0,0118		
293	0,001827	0,00354	0,003328	0,006887 ⁽²⁾	0,0116	0,01722 ⁽²⁾	0,010912
303		0,00267		0,005079 ⁽³⁾		0,01148 ⁽³⁾	
313	0,001121		0,001898	0,003898 ⁽²⁾		0,008130 ⁽²⁾	0,005241
323				0,003143 ⁽²⁾		0,006096 ⁽²⁾	
333	0,000770		0,001229	0,002574 ⁽²⁾		0,004690 ⁽²⁾	0,002987
343				0,002266 ⁽²⁾		0,003772 ⁽²⁾	
353				0,001988 ⁽²⁾		0,003104 ⁽²⁾	
358	0,000532		0,000807			0,002915 ⁽¹⁾	0,001754
T (K) †	50 ^b	54,85 ^c	60,60 ^c	65 ^d	72,5 ^d	74,60 ^c	
249				39,0			
250					680		
253				20,0	417	1480 ⁽²⁾	
256				12,1			
258					192	599 ⁽²⁾	
260				7,10			
263		0,3220 ⁽²⁾	1,433 ⁽¹⁾	4,58	78,0	258 ⁽²⁾	
268		0,2045 ⁽²⁾		3,03	62,0	104 ⁽²⁾	
273	0,0501	0,1473 ⁽²⁾	0,5640 ⁽¹⁾		34,0	60,0 ⁽²⁾	
278		0,1010 ⁽²⁾		1,04		37,4 ⁽²⁾	
283	0,0282	0,07272 ⁽²⁾	0,2418 ⁽¹⁾			24,5 ⁽²⁾	
288						15,4 ⁽²⁾	
293	0,0173	0,04100 ⁽²⁾	0,1208				
303	0,0112		0,0647 ⁽²⁾				
304		0,02580 ⁽⁶⁾					
313	0,00790	0,01799 ⁽²⁾	0,0389 ⁽²⁾				
323	0,00564	0,01265 ⁽²⁾	0,0246 ⁽²⁾				
333		0,009320 ⁽²⁾	0,0165 ⁽¹⁾				
343		0,007110 ⁽²⁾	0,0116 ⁽¹⁾				
353		0,005985 ⁽⁵⁾	0,00851 ⁽¹⁾				

† Velocidad de calentamiento de la muestra.
‡ Número de barrido.

a Referencia [13]
b Referencia [21]
c Referencia [20]
d Referencia [19]

- (1) Medido a la temperatura indicada +0,1 °K.
- (2) Medido a la temperatura indicada +0,2 °K.
- (3) Medido a la temperatura indicada +0,3 °K.
- (4) Medido a la temperatura indicada +0,4 °K.
- (5) Medido a la temperatura indicada +0,5 °K.
- (6) Medido a la temperatura indicada -0,2 °K.

Apéndice C

Datos de soluciones de sacarosa

Tabla C.1: Viscosidad dinámica $\eta(T, c)$ de soluciones acuosas de sacarosa^a (medido en Pa.s). La concentración c está expresada en % g sacarosa/g solución.

T (K)	20	22	24	26	28
273	0,003782	0,004187	0,004661	0,005223	0,005889
283	0,002642	0,002904	0,003208	0,003565	0,003986
293	0,001945	0,002124	0,002331	0,002573	0,002855
303	0,001493	0,001622	0,001769	0,001941	0,002140
313	0,001184	0,001281	0,00139	0,001516	0,001663
323	0,00097	0,00104	0,00113	0,00122	0,00134
333	0,00081	0,00087	0,00093	0,00101	0,00110
343	0,00068	0,00073	0,00079	0,00085	0,00092
353	0,00059	0,00063	0,00067	0,00072	0,00078
T (K)	30	32	34	36	38
271	0,00726 ^b				
273	0,006692	0,007653	0,008841	0,01031	0,01217
283	0,004487	0,005084	0,005808	0,006693	0,007791
293	0,003187	0,003581	0,004052	0,004621	0,005315
303	0,002373	0,002645	0,002967	0,003353	0,003815
313	0,001833	0,002029	0,00226	0,002532	0,002856
323	0,00147	0,00161	0,00178	0,00198	0,00221
333	0,00120	0,00131	0,00144	0,00159	0,00176
343	0,00100	0,00109	0,00119	0,00131	0,00144
353	0,00085	0,00092	0,00100	0,00110	0,00120
T (K)	40	42	44	46	48
273	0,01455	0,01767	0,02176	0,02722	0,03456
283	0,009166	0,01093	0,01318	0,01611	0,01998
293	0,006167	0,007234	0,008579	0,01030	0,01251
303	0,004375	0,005063	0,005917	0,006988	0,008350
313	0,003241	0,003706	0,004277	0,004983	0,005868
323	0,00249	0,00282	0,00322	0,00371	0,00432
333	0,00197	0,00221	0,00250	0,00285	0,00328
343	0,00160	0,00177	0,00199	0,00225	0,00256
353	0,00132	0,00146	0,00163	0,00182	0,00205
T (K)	50	52	54	56	58
267,5	0,0607 ^b				
273	0,04474	0,05911	0,07992	0,1110	0,1590
283	0,02521	0,03234	0,04238	0,05679	0,07815
293	0,01543	0,01934	0,02468	0,03212	0,04278
303	0,01011	0,01241	0,01549	0,01968	0,02551
313	0,006991	0,008439	0,01034	0,01286	0,01629
323	0,00507	0,00603	0,00727	0,00888	0,0111
333	0,00381	0,00447	0,00530	0,00638	0,0078
343	0,00294	0,00342	0,00401	0,00476	0,00572
353	0,00234	0,00269	0,00312	0,00366	0,00434

Tabla C.2: Viscosidad dinámica $\eta(T, c)$ de soluciones acuosas de sacarosa^a (medido en Pa.s). La concentración c está expresada en % g sacarosa/g solución (*Cont.*).

T (K)	60	62	64	66	68
255,7					18,995 ^b
258,3					12,534 ^b
263	0,551 ^b				5,478 ^{b(1)}
273	0,2357	0,3646	0,5915		2,040 ^{b(2)}
283	0,1109	0,1630	0,2490		
293	0,05849	0,08242	0,1201	0,1820	0,2885
303	0,03382	0,04602	0,06448	0,09345	0,1407
313	0,02104	0,02780	0,03769	0,05261	0,07597
323	0,0140	0,0179	0,0237	0,0321	0,0447
333	0,00966	0,0122	0,0157	0,0206	0,0279
343	0,00698	0,00863	0,0109	0,0141	0,0184
353	0,0052	0,00635	0,00787	0,00993	0,0128
T (K)	70	72	74	76 ^{b,c}	78 ^c
258,9				434 ^b	
263,3				189 ^b	
267,9				83,700 ^b	
273,3				36,900 ^b	
283	1,194 ^c			11,400 ^c	30,700 ^c
293	0,4816	0,8549	1,631	3,390 ^c	7,870 ^c
303	0,2216	0,3676	0,6485	1,270 ^c	2,680 ^c
313	0,1140	0,1789	0,2960	0,535 ^c	1,050 ^c
323	0,0644	0,0965	0,152	0,247 ^c	0,441 ^c
333	0,0390	0,0561	0,0841	0,131 ^c	0,221 ^c
343	0,0250	0,0349	0,0503	0,0767 ^c	0,122 ^c
353	0,0168	0,0228	0,0320	0,0459 ^c	0,0705 ^c
T (K)	80 ^{b,c}	82 ^c	84 ^c	86 ^c	
263,2	4506 ^{b(3)}				
266,8	1777 ^{b(3)}				
268,4	1323 ^{b(3)}				
270,4	845 ^{b(3)}				
273,4	485 ^{b(3)}				
278	221 ^c	916	4830	29200	
283	93,300 ^c	351	1700	9440	
293	20,700 ^c	64,600	250	1100	
303	6,280 ^c	17,100	55	206	
313	2,250 ^c	5,550	16,200	53,100	
323	0,855 ^c	1,860	4,700	13,100	
333	0,394 ^c	0,773	1,720	4,230	
343	0,203 ^c	0,373	0,773	1,710	
353	0,114 ^c	0,204	0,404	0,857	

^a Referencia [150], salvo indicación expresa.
 (1) Medido a 263,2 K

^b Referencia [151]
 (2) Medido a 272,8 K

^c Referencia [18]
 (3) Medido a 80,1% g/g

Apéndice D

Complementos sobre la fluoresceína

D.1 Coeficiente de fricción de la fluoresceína

Para caracterizar adecuadamente la fricción de Stokes es necesario recurrir a las ecuaciones hidrodinámicas. En los supuestos de Stokes, la molécula se considera como un obstáculo rígido inmerso en un campo de velocidades \mathbf{v} ¹. El fluido que lo rodea es viscoso e incompresible, y el número de Reynolds $\Re = \rho v_0 \ell / \eta$ es mucho menor que la unidad². Físicamente, $\Re \ll 1$ significa que el comportamiento está dominado por la fuerza viscosa en lugar de la inercia [152, p. 87]. En estas condiciones, la molécula cumple con la expresión de Navier-Stokes,

$$\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} \cong -\nabla P + \frac{\eta}{\rho} \nabla^2 \mathbf{v} \quad , \quad \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t'} \cong -\nabla p + \frac{1}{\Re} \nabla^2 \mathbf{u} \quad (\nabla \cdot \mathbf{u} = 0) \quad (\text{D.1})$$

donde t es el tiempo, P representa la presión y entre paréntesis se expresa el hecho de que no existen fuentes ni sumideros. En la segunda ecuación se introdujeron las variables reducidas $\mathbf{u} = \mathbf{v}/v_0$, $t' = t v_0 / \ell$ y $p = P / (\rho v_0^2)$. La condición de contorno de adherencia impone que $\mathbf{u} = 0$ en el contorno de la molécula y que $|\mathbf{u}(r \rightarrow \infty)| = |\mathbf{u}_0| = 1$. La solución de (D.1) que se busca es el campo de velocidades \mathbf{v} y el tensor de presiones \mathbf{p} para el estado estacionario ($t' \rightarrow \infty$). En ese caso el tensor de presiones se define como,

$$p_{ij} = \delta_{ij} p - \frac{1}{\Re} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x'_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x'_i} \right) \quad i = 1, 2, 3 \quad (\text{D.2})$$

donde δ_{ij} es la δ de Kronecker y $x'_i = x_i / \ell$ es la coordenada espacial reducida. La fuerza de Stokes (reducida) \mathbf{f}' que actúa sobre la molécula es la integración sobre todo el contorno del elemento de

¹A los fines de obtener la fricción de Stokes, una molécula de soluto desplazándose dentro de un fluido es equivalente a la situación de una molécula quieta inmersa en un flujo estacionario.

² ρ es la densidad del fluido, v_0 el módulo de la velocidad cuando nos alejamos del obstáculo ($r \rightarrow \infty$), ℓ es alguna longitud característica y η la viscosidad, como de costumbre.

fuerza $-\hat{\mathbf{n}} \cdot \mathbf{p} \cdot dS$, siendo $\hat{\mathbf{n}}$ el versor normal saliente del contorno y dS el diferencial de superficie. Bajo la aproximación de linealidad de la velocidad y en estado estacionario, la relación entre la fuerza y la velocidad cuando $r \rightarrow \infty$ (velocidad no perturbada) define un tensor de rango dos simétrico $f_i = a_{ik}u_k$ [50] vinculado directamente con la movilidad b . Es decir, la movilidad de Stokes viene dada en forma general por el promedio de los valores principales de a_{ik} [50],

$$b = \frac{1}{3} \left(\frac{1}{a_1} + \frac{1}{a_2} + \frac{1}{a_3} \right) \quad (\text{D.3})$$

La solución homogénea de (D.1) en el campo \mathbf{v} conduce, por el método de separación de variables, a una ecuación de Helmholtz en las variables espaciales y a una exponencial decreciente en el tiempo. Esta última es la que determina el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario. Si el obstáculo es una esfera de radio $\ell = 5 \text{ \AA}$ en cuyo contorno la velocidad se anula (condición de adherencia), resulta una constante de decaimiento,

$$\tau_l = \Re/\nu_{lm}^2, \quad j_l(\nu_{lm}) = 0 \quad (\text{D.4})$$

donde ν_{lm} son los ceros de la función esférica de Bessel de primera especie $j_l(x)$, de orden l [92]. El tiempo característico mínimo (reducido) es $\tau_0 = \Re/\pi^2 \approx \Re/10$.

No se dispone de una solución analítica de (D.1) para obstáculos más complejos que un elipsoide [57]. Por lo tanto, para determinar la movilidad de la molécula de fluoresceína se debe recurrir entonces a la solución numérica. Para ello se usó la implementación `NaSt3DGP`³. El ambiente de simulación consistió en valores típicos para fluoresceína en agua a 25°C, es decir, $\ell = 5 \text{ \AA}$, $\rho \sim 1 \text{ g/cm}^3$, $\eta \sim 1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ y $v_0 \sim D/\ell$. La difusión ronda los $5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ según la Tabla 5.2, de manera que la velocidad del fluido es $v_0 \sim 1 \text{ m/s}$ ⁴. Observamos que el número de Reynolds es $\Re = 0,005$ con lo que la aproximación $\Re \ll 1$ está plenamente justificada.

Se consideraron dos modelos de molécula de fluoresceína, uno con la simetría propia de la forma dianiónica y otra con una torsión extrema en el anillo bencénico de 90° (ver Figura D.1). Cada estructura cíclica en la molécula se modela como un elipsoide oblado de semi-eje mayor de 2 \AA ⁵. El semi-eje menor es de $0,65 \text{ \AA}$ y corresponde a la distancia radial máxima del orbital p_z [156]. Se consideró además que el sistema entraba en estado estacionario luego de $t' = \Re/10$.

La fuerza que actúa sobre el obstáculo, en unidades reducidas, es $\mathbf{f}' = \mathbf{f}/(\rho v_0^2 \ell^2)$. Es inmediato que la movilidad reducida viene dada entonces por $b' = \Re/c$. Para el caso de un obstáculo esférico $4\pi < c < 6\pi$, dependiendo de la condición de contorno (ver sección 2.1). Una simulación realizada con `NaSt3DGP` mostró un valor de $c \cong 4,27\pi$ para la condición de adherencia, un poco por debajo de

³Programa desarrollado por un grupo de investigación en la División de Computación Científica y Simulación Numérica de la Universidad de Bonn [153].

⁴Esta velocidad es mucho menor que la de un gas y se debe a la reducción del camino libre medio. Por ejemplo, la teoría cinética predice que $v_0 \sim \sqrt{3KT/m} \approx 150 \text{ m/s}$ para $m = 332 \text{ g/mol}$ (fluoresceína) y $T = 298 \text{ K}$. El camino libre medio típico para los gases es $\lambda \sim 100$ radios moleculares. En cambio, en un líquido éste se reduce a $\lambda \sim \ell$ [154, p. 855], de manera que $v_0 \sim 1 \text{ m/s}$ es un valor razonable para el cálculo.

⁵Esto surge de considerar anillos hexagonales de $\sim 1,4 \text{ \AA}$ de lado [109], más uniones C-H de $\sim 1 \text{ \AA}$ [155]. Se adicionó $0,2 \text{ \AA}$ en concepto de la distancia radial del orbital $1s$ del hidrógeno.

lo esperado, pero atribuible a efectos de discretización, dado que se usó una grilla de $0,3 \text{ \AA}$.

Los modelos de fluoresceina se simularon en las mismas condiciones que el obstáculo esférico. La inspección de la geometría de ambos (ver Figura D.1) muestra que la fricción está dominada por el elemento a_{zz} y que, por coincidir con uno de los ejes principales, es un valor principal ⁶. Si f_i y u_k se expresan en unidades reducidas, se obtiene un coeficiente $a'_{zz} \cong 2,484 \pi/\mathfrak{R}$ para la forma dianiónica y $a'_{zz} \cong 3,275 \pi/\mathfrak{R}$ para la torsionada 90° ⁷. Las movilidades respectivas son,

$$b \cong \frac{1}{2,484 \pi \eta \ell} \quad , \quad b \cong \frac{1}{3,275 \pi \eta \ell} \quad (\text{D.5})$$

siempre que no nos apartemos mucho de la situación $\mathfrak{R} = 0,005$. Podría parecer que la forma plana de la molécula (torsión a 90°) fuera más parecida a una esfera, si se las compara con los resultados obtenidos más arriba para la esfera de radio $\ell = 5 \text{ \AA}$. Sin embargo, la comparación debe realizarse respecto de una esfera del *mismo* volumen que la molécula de fluoresceina. Éste es aproximadamente cuatro veces el del elipsoide oblado que representa cada anillo. Es decir, $4 \times 4\pi \times 0,65 \times 2^2/3 \text{ \AA}^2 \cong 43,56 \text{ \AA}^3$. Por lo tanto, el radio efectivo correspondiente a este volumen es $R = 2,18 \text{ \AA}$. El cambio en la movilidad debido exclusivamente a la forma molecular es,

$$\frac{6 \pi \eta R}{2,484 \pi \eta \ell} \cong 1,05 \quad (\text{dianionica}) \quad , \quad \frac{6 \pi \eta R}{3,275 \pi \eta \ell} \cong 0,8 \quad (\text{plana}) \quad (\text{D.6})$$

para cada conformación espacial. Hay un efecto compensatorio en la conformación espacial de la forma dianiónica que conduce a una movilidad similar a la de la esfera. Debemos recordar que, en general, la fricción de una molécula no esférica es superior a la esférica [134], así que el hecho de que en (D.6) se supere la unidad es atribuible a inexactitudes propias del proceso de simulación. En la forma plana, en cambio, la variación en la fricción es del orden del 25%.

Podría cuestionarse el hecho de que estos resultados fueron obtenidos sin contemplar la rotación molecular. Al cambiar la orientación de la molécula, su movilidad cambia, de manera que a tiempos largos se obtiene un promedio de cada una de ellas. Precisamente, la relación (D.3) *asume* que todas las orientaciones son igualmente probables. Esto es razonable siempre que haya suficiente volumen libre para rotar. Para probarlo, podemos hacer algún cálculo de cuánto sería la movilidad *isotrópica promedio* para un objeto similar. Hubbard y Douglas [157] establecieron que para un elipsoide oblado de semi-eje mayor R y semi-eje menor r , ésta vale,

$$b = \frac{1}{2} \cdot \frac{\chi_0}{6\pi \eta} \quad , \quad \chi_0 = \int_0^\infty \frac{dx}{(R^2 + x)\sqrt{r^2 + x}} \quad (\text{D.7})$$

El valor de χ_0 es fácil de calcular y para relaciones $\alpha = r/R$ pequeñas se aproxima a $(\pi - 2\alpha)R^{-1}$. Si se considera que la molécula tiene un distancia máxima de 7 \AA , entonces, podemos suponer un radio $R = 3,5 \text{ \AA}$ y un espesor $r = 0,65 \text{ \AA}$ ⁸. La movilidad resultante es $1/b \cong 3,03 \pi \eta \ell$, semejante a la

⁶Esto se ve claramente en la simulación, dado que $a_{xz} \cong 0$ y $a_{yz} \cong 0$.

⁷La notación primada está significando que está expresado en unidades reducidas.

⁸Champion *et al.* [14] asignan una distancia máxima de 10 \AA a la molécula de fluoresceina (a lo largo del grupo *xanthene*). Ese valor surge de simulaciones de diseño molecular, pero no se especifican

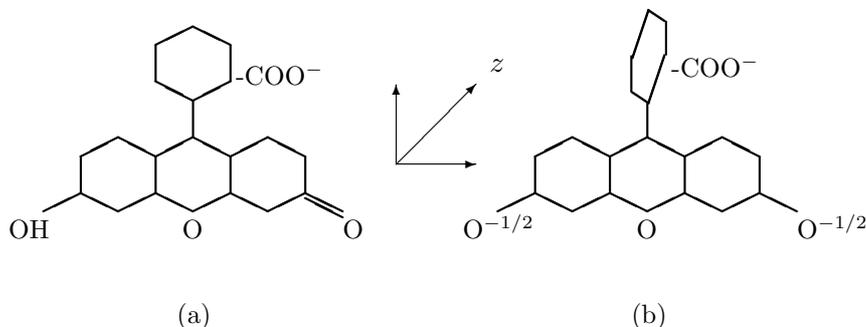


Figura D.1: Estructura de la molécula de fluoresceina en su forma (a) Forma plana del modelo de fluoresceina. La torsión en el anillo bencénico es de 90° respecto de la forma dianiónica. (b) Forma dianiónica. ($-\text{COO}^-$) representa el grupo carboxílico.

detallada para la forma plana.

D.2 Esfericidad de la fluoresceina

En la sección 5.1.1 se describió la estructura de la fluoresceina aniónica. La forma monoaniónica (ver Figura 5.2) tiene un ángulo de 70° entre el plano del anillo bencénico y el anillo fenólico y se presenta casi exclusivamente a $\text{pH} \sim 5,4$. (85% monoaniónica, 15% neutra) [109, 158]. A $\text{pH} \sim 7$ hay un 20% de monoaniones y 80% de dianiones. Ésta última predomina completamente a $\text{pH} \sim 9,1$ [109].

En la Figura D.1 se muestran dos modelos extremos de una molécula de fluoresceina. En el caso (a) se la supone completamente plana. En caso (b) es similar a la especie dianiónica. Se determinó, por medio de simulaciones numéricas, el coeficiente de fricción de Stokes para ambos casos. Los detalles del cálculo se encuentran en el apéndice D.1.

Las simulaciones muestran que la fricción de Stokes para la fluoresceina dianiónica es similar a la de una molécula esférica del mismo volumen. Si el anillo bencénico torsiona 90° (forma plana en la Figura D.1), la fricción de Stokes se incrementa alrededor del 20%.

En este trabajo se usaron muestras con $\text{pH} \approx 8$ (ver sección 5.2.2), en las que predomina la fluoresceina dianiónica. El supuesto de esfericidad de la molécula es, entonces, más justificable.

La torsión en el anillo bencénico (20° en la fluoresceina monoaniónica, según la Figura D.1) no debería influir directamente en la movilidad de la molécula.

el resto de las dimensiones, ni las condiciones. Por eso, se prefiere usar el valor calculado de 7 \AA .

D.3 Hidratación de la fluoresceína

La fluoresceína dianiónica es la que predomina para $\text{pH} > 7$ y tiene un radio hidrodinámico de 5Å , supuesta la condición de adherencia o *stick* (ver sección 5.1.1).

El volumen parcial específico a dilución infinita (\bar{v}) y $T = 298\text{K}$ es $0,6412\text{cm}^3/\text{g}$ para la fluoresceína dianiónica. Esta estimación se realizó siguiendo la metodología dada por Druchschlag y Zipper [159] y toma en cuenta el efecto de electrostricción en la fluoresceína. Para calcular la masa de agua hidratada por masa de soluto δ , usamos la expresión [134],

$$\frac{\bar{v} + \delta v_0}{\bar{v}} = \frac{\frac{4}{3}\pi r_H^3}{\frac{4}{3}\pi r_c^3} = \left(\frac{r_H}{r_c}\right)^3, \quad r_c \approx 3,5\text{Å} \quad (\text{D.8})$$

siendo r_c el radio cristalográfico (ver sección 5.1.1) y r_H el hidrodinámico. v_0 es el volumen específico del solvente ($\sim 1\text{cm}^3/\text{g}$ para agua). El número de moléculas de agua asociadas a la forma dianiónica resulta de 22. Se asume que el soluto es esférico. Esta hipótesis está justificada en la sección anterior.

La cantidad de moléculas de agua asociadas a los dianiones de fluoresceína es superior a las halladas para la hidratación de la sacarosa [24, 160], y la trehalosa (10 o más)[161].

Según Martin [162] las uniones puente H en la forma dianiónica proceden de los cinco átomos de oxígeno, actuando como *aceptores*. Klonis *et al.* [163] van más allá y afirman que los oxígenos más extremos del grupo de los tres anillos coplanares (grupo *xanthere*) son los que más interactúan en estas uniones. El grupo carboxílico (-COOH) interactúa menos, de acuerdo con los espectros de fluoresceína [163]. Pero una hidratación de 22 para la especie dianiónica supera la cantidad de oxígenos presentes en la fluoresceína. Es decir, no alcanza con las uniones puente H para explicar completamente el fenómeno de hidratación.

Vamos a explorar la posibilidad de asociación fluoresceína-solvente por interacción carga-dipolo y dipolo-dipolo. La forma dianiónica de fluoresceína, por estar cargada puede interactuar con moléculas de solvente que presentan momento dipolar permanente. Asimismo, es posible una interacción más débil entre los momentos dipolares del soluto y del solvente.

La estructura molecular de la fluoresceína sugiere que el aporte en el momento dipolar permanente viene dado por el grupo carboxílico y por el grupo *xanthere*. Minkin *et al.* [164] sostienen que el grupo carboxílico tiene el mismo momento dipolar que el ácido benzoico y vale $p \sim 1,63D$ ($1D = 1\text{Debye} \cong 3,3356 \cdot 10^{-30}\text{C.m}$). Al retirarle un átomo de hidrógeno (para llevarlo a la forma aniónica) este momento dipolar se incrementa a $\sim 2,4D$, según la metodología descrita en [164]. Por otro lado, el momento del grupo coplanar de tres anillos es más complejo de determinar. La molécula de *xanthere* tiene un momento dipolar $p \sim 1,3D$ [165] y la de *xanthone* $p \sim 3D$ [166] (ver Figura D.2). Quiere decir que el agregado de oxígenos puede hacer variar mucho el momento del conjunto. Más aún, cualquier deformación estructural puede hacerlo fluctuar [164] e incluso invertir la polaridad. En principio, consideramos el valor de $1,3D$, pero con las reservas mencionadas.

Cuando una molécula de solvente (agua o disacárido) se acerca a la fluoresceína, la energía de interacción es,

$$W_{12} \cong q_1 \Phi_2 - \mathbf{p}_1 \cdot \mathbf{E}_2 \quad (\text{D.9})$$

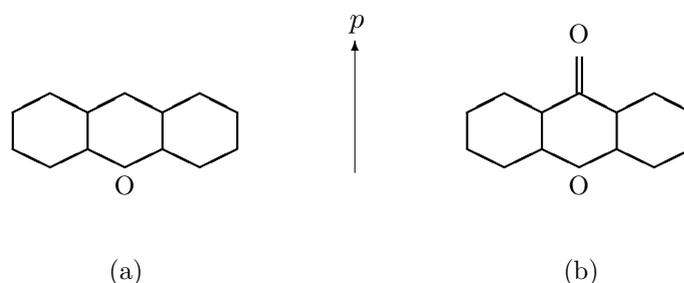


Figura D.2: Momentos dipolares permanentes de (a) la molécula de *xanthene* ($C_{13}H_{10}O$) y (b) *xanthone* ($C_{13}H_8O_2$).

donde el subíndice 1 corresponde al soluto y el 2 al solvente. La expresión (D.9) corresponde a una aproximación a orden dipolar. Si consideramos al solvente como un dipolo (ya que el agua y el disacárido tienen carga total nula), su potencial y el campo eléctrico vienen dados por,

$$\Phi_2 = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{\mathbf{p}_2 \cdot \hat{r}}{r^2} \quad , \quad \mathbf{E}_2 = \frac{3(\mathbf{p}_2 \cdot \hat{r})\hat{r} - \mathbf{p}_2}{4\pi\epsilon_0 r^3} \quad (\text{D.10})$$

r es la distancia de separación entre moléculas (soluto-solvente), \mathbf{p} el momento dipolar permanente y ϵ_0 la permitividad del vacío ⁹.

El término $q_1\Phi_2$ en (D.9) representa la interacción carga-dipolo. La carga q_1 vale $2e = 2 \times 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ para la forma dianiónica de fluoresceína. Como ejemplo, tomemos el caso en que $r \sim 4 \text{ \AA}$ (aproximadamente el radio cristalográfico) y $T = 298 \text{ K}$. La energía de interacción carga-dipolo máxima con el agua (momento permanente $p \sim 1,84 \text{ D}$) es $26,8 \text{ KT}$ y con la sacarosa (momento permanente $3,4 \text{ D}$ [168]) da $49,5 \text{ KT}$.

La conclusión que se sigue es que la interacción carga-dipolo domina sobre la energía térmica KT [164] para cualquier molécula de solvente que se considere. La interacción fluoresceína-disacárido es aproximadamente el doble de intensa que la de fluoresceína-agua. En otros términos, podemos decir que ambas son semejantes cuando la distancia fluoresceína-disacárido es $\sim \sqrt{2}$ la distancia fluoresceína-agua. Para hacernos una idea de la importancia que esto representa, llevemos adelante un ejemplo. Supongamos que una molécula de fluoresceína se puede acercar lo suficiente como para interactuar con una de sacarosa hidratada, digamos a $\sim \sqrt{2} \times r_s$ ($r_s = 4,04 \text{ \AA}$ es el radio cristalográfico de la sacarosa [24]). El volumen de la sacarosa hidratada en capacidad de interactuar con la fluoresceína será,

⁹El campo \mathbf{E} que se toma en cuenta es el campo local, por lo que no se introduce la permitividad del medio en la ecuación (D.10). Ésta es una propiedad macroscópica del campo medio [167].

$$\overbrace{m(\bar{v} + \delta v_0)}^{\text{volumen sacarosa hidratada}} = \frac{4\pi}{3} \left(\sqrt{2} \times r_s \right)^3, \quad m = \frac{342 \text{ g}}{N_A} \quad (\text{D.11})$$

siendo m la masa molecular de sacarosa y v_0 el volumen específico del agua. Si asumimos que el volumen específico para la sacarosa es $v_0 \sim 0,6 \text{ cm}^3/\text{g}$ (típico para disacáridos [24, p. 202]), obtenemos que $\delta = 0,775$, o lo que es lo mismo, un número de hidratación de 15 moléculas de agua. Quiere decir que ya a una concentración de $\sim 56 \% \omega/\omega$ (1 molécula de sacarosa por 15 de agua) en promedio todas las moléculas de fluoresceína estarían en condición de interactuar con la sacarosa. Esto se corresponde a temperatura ambiente con una viscosidad $\eta \sim 20 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ (ver Tablas de viscosidad en el Apéndice C). Concluimos que a viscosidades bajas ya es importante la interacción fluoresceína-disacárido.

El término $-\mathbf{p}_1 \cdot \mathbf{E}_2$ corresponde a la interacción dipolo-dipolo. Es una contribución más débil, pero que según (D.10) es capaz de prevalecer en situaciones en que la orientación del momento \mathbf{p}_2 es ortogonal a \hat{r} y, por lo tanto, la interacción carga-dipolo se anula. En el caso en que los momentos dipolares de soluto y solvente son paralelos y opuestos, y $r \sim 4 \text{ \AA}$ la energía de interacción resulta $0,91 \text{ } KT$ y $1,68 \text{ } KT$ ($T = 298 \text{ K}$) para el grupo *xanthene* y carboxílico respectivamente. O sea, es algo menor a la energía térmica KT para *xanthene* y al revés para el grupo carboxílico. Por lo tanto, este último está en condición de asociar dipolarmente agua, mientras que el otro sólo puede formar asociaciones transitorias, ya que compite con la agitación térmica. Es importante notar que el momento dipolar permanente de la fluoresceína no cambia mucho cuando pasa de un estado no excitado (como se viene suponiendo hasta ahora) a otro excitado [163].

Apéndice E

Complementos sobre el desacople

E.1 Viscosidad de la mezcla disacárido-agua

La relación de Einstein (Ec. 2.3) describe la evolución de la viscosidad cuando se agregan fracciones volumétricas de disacárido ϕ al agua. Esta relación puede interpretarse como una fórmula de interpolación, luego de cierta manipulación algebraica,

$$\eta = \eta_0(1 - \phi) + (1 + \gamma)\eta_0\phi \quad (\text{E.1})$$

donde η_0 es la viscosidad del agua pura y $\gamma = 2,5$. El término $\eta_0(1 - \phi)$ se interpreta como la fracción volumétrica de agua libre de interacción con el disacárido. En cambio, el término $(1 + \gamma)\eta_0\phi$ es una fracción volumétrica de una cierta viscosidad $\eta_s = \eta_0(1 + \gamma)$. Recordemos que γ representa, en la deducción de Einstein [1], a la condición de contorno que *ve* el fluido de viscosidad η_0 . Es decir, $\eta_s = \eta_0 + \gamma\eta_0$ se interpreta físicamente como la viscosidad que obtendríamos en ausencia de condiciones de contorno (η_0), más el incremento $\gamma\eta_0$ debido a la presencia de éstas.

A la fracción $1 - \phi$ la llamamos *líquida* porque se corresponde con el fluido *libre* de condiciones de contorno impuestas por el disacárido. Se trata de regiones que cumplen con las ecuaciones de Navier-Stokes. Para que ello sea posible, desde el punto de vista molecular, es necesario que el grado de empaquetamiento no sea muy elevado, de manera que encontremos suficiente volumen libre para permitir el reacomodamiento de moléculas. Esto ya no es posible en las regiones restringidas por las condiciones de contorno (ϕ), es decir, aquellas dadas por las interacciones disacárido-agua. En contraposición a la fracción líquida, a estas últimas las llamamos *sólidas*. Su grado de empaquetamiento es mayor y las interacciones puente H, carga-dipolo y dipolo-dipolo restringen la movilidad de sus moléculas.

El agregado del disacárido es posible porque el sistema presenta suficiente volumen libre (en la región *líquida*). Éste interacciona con su entorno (*i.e.* se hidrata) introduciendo condiciones de contorno a su alrededor. En el lenguaje de Kumar, pasamos de $\phi \rightarrow \phi + \delta\phi$. La región *sólida* se incrementa porque estamos restando volumen libre al sistema. Pero el efecto neto sobre la viscosidad es, en realidad, el de

desplazarla una cantidad $\lambda \delta\phi$, siendo λ un parámetro, en principio, desconocido (ver más adelante). Resulta, entonces, que la relación (E.1) se desplaza a,

$$\eta(\phi + \delta\phi) = \eta_0(1 - \lambda \delta\phi) + (1 + \gamma)\eta_0(\lambda \delta\phi) \quad (\text{E.2})$$

donde ahora $\eta_0 = \eta(\phi)$ y λ es un parámetro desconocido y vinculado con efectos de asociación molecular, pérdida de volumen libre y desestructuración local. Al igual que en la sección 3.3.2, debemos referir la cantidad añadida a la fracción volumétrica líquida $\phi_0 - \lambda\phi$, que es donde hay suficiente volumen libre para ella y donde los efectos de $\delta\phi$ tienen entidad. Esto da,

$$\eta(\phi + \delta\phi) = \eta(\phi) \left(1 + \frac{\gamma \delta\phi}{(\phi_0/\lambda) - \phi} \right) \quad , \quad \phi < \phi_c \quad , \quad \phi_c = \phi_0/\lambda \quad (\text{E.3})$$

El cociente ϕ_c/ϕ_0 debe ser menor que la unidad para que tenga significado físico. Esto conduce a que $\lambda > 1$, lo que reafirma su carácter de parámetro de asociación y desestructuración, porque hace que la cantidad $\delta\phi$ se vea mayor a lo que en realidad es. Distintas evidencias avalan esta afirmación. Por ejemplo, Molinero *et al.* [38] observaron en simulaciones de sacarosa-agua ($c = 50\% \omega/\omega$, $T = 333 \text{ K}$) fragmentos de disacárido y agua unidos por puente H. Cada fragmento contiene hasta 10 moléculas de disacárido y un promedio de 2,5. Éstos pertenecen a las llamadas regiones sólidas porque su tamaño no le permite desplazarse fácilmente por los posibles *canales* disponibles [38]. Esto ya había sido anticipado en parte por Rampp *et al.* [21, 151] cuando aseguraron que el disacárido formaba grandes redes unidas por uniones puente H para $c > 50\% \omega/\omega$.

El complejo escenario de fragmentos sólidos y líquidos muestra que λ reúne una multiplicidad de fenómenos. Pero la relación (E.3) destaca que es causa del corrimiento de la fracción volumétrica de transición $\phi_0 \rightarrow \phi_c$. En la visión de la MCT, λ es responsable de que se pierda la ergodicidad anticipadamente (no confundir este parámetro con el definido en la sección 3.1.2).

El parámetro λ marca un punto de conexión entre el comportamiento macroscópico y la interpretación molecular. Por ejemplo, si el sistema trehalosa-agua es capaz de inmovilizar mayores regiones (por mayor interacción con el agua [169], desestructuración, etc.) que la sacarosa-agua, entonces el parámetro λ de este último deberá estar más cerca de la unidad que el del primero. Se deduce inmediatamente que la trehalosa-agua alcanzará la fracción crítica ϕ_c más tempranamente que la sacarosa acuosa. Este razonamiento es verificable por medio de la relación T_g/T . En el capítulo 5 se observó que los puntos críticos para sacarosa acuosa y trehalosa acuosa son $T_g/T \approx 0,65$ y $T_g/T \approx 0,6$, respectivamente. Al igual que en el estudio de la relación entre la WLF y la MCT (sección 3.3.2), se considera una relación monótona entre $\phi \sim T_g/T$.

La MCT no establece un valor para ϕ_c y algunos autores lo buscaron por afuera de esta teoría [170]. En el actual contexto, el parámetro λ es el que determina su valor porque provoca el corrimiento $\phi_0 \rightarrow \phi_c$. La imagen que tenemos es la de aguas asociadas al disacárido y muy desestructurada. Esto significa, según la teoría de Adam y Gibbs, la pérdida de estados accesibles. Es decir que la desestructuración del agua (asociada) inhibe la cristalización y a la vez quita estados posibles al sistema (*i.e.* el estado cristalino).

En el formalismo de Kumar no se hace mención explícita al espacio configuracional. Por ese motivo y otros es que el parámetro λ no puede determinarse completamente. En la actual visión *estática* no se toma en cuenta la dinámica entre fragmentos sólidos y líquidos (fluidos). Esto no invalida el análisis

a través de λ . Sillescu [81] señala, en su revisión sobre los trabajos de Stillinger y Hodgdon [82, 83], que las heterogeneidades *espaciales* se introducen por suposiciones independientes del mecanismo de fluctuación. Por eso es que distintas teorías presentan *heterofases*, pero sus dinámicas son distintas (por ejemplo, la de Fischer y Bakai, la de Stillinger y Hodgdon, etc.).

En el caso en que $\phi \geq \phi_c$, la formación de regiones sólidas nuevas es más dificultosa porque es menor el volumen libre que se puede restar al sistema. La probabilidad de que nuevas fracciones de disacárido $\delta\phi$ se integren a dominios sólidos existentes aumenta rápidamente. Esto quiere decir que $\lambda \rightarrow 1$, porque ya no son capaces de asociar fácilmente moléculas de agua, etc. De esta manera hay un corrimiento $\phi_c \rightarrow \phi_0$. La relación (E.3) ya no es realista porque al pasar $(\phi_c - \phi) \rightarrow (\phi_0 - \phi)$ estaríamos refiriendo los agregados $\delta\phi$ a regiones líquidas más grandes. La situación es todo lo contrario. La realidad física es que sólo una fracción de $\phi_0 - \phi$ puede considerarse en condición (*i.e.* con suficiente volumen libre) de acomodar cantidades $\delta\phi$. Esa fracción p se reduce más y más conforme nos acercamos a ϕ_0 , por lo que podemos proponerla aproximación lineal,

$$p(\phi) = \begin{cases} 1 & , \phi < \phi_c \\ \frac{\phi_0 - \phi}{\phi_0 - \phi_c} & , \phi > \phi_c \end{cases}$$

siendo $\phi_c < \phi_0$. La Ec. (E.3) se modifica, resultando,

$$\frac{\eta(\phi + \delta\phi) - \eta(\phi)}{\eta(\phi)} = \frac{\gamma \delta\phi}{p(\phi) \left(\frac{\phi_0}{\lambda} - \phi \right)} \quad , \quad \lambda \rightarrow 1 \quad (\text{E.4})$$

Es inmediato que esta función conduce a la expresión WLF (3.22).

El hecho de introducir $p(\phi)$ señala que las causas que llevan a $\lambda \rightarrow 1$ no bastan para describir el comportamiento WLF del sistema. Fue necesario añadir la función de peso $p(\phi)$ que, al participar en el denominador de la Ec. (E.4), da más importancia a la región $\phi \cong \phi_0$.

E.2 Explicación complementaria sobre el *desacople*

La relación (3.8) puede escribirse en forma diferencial como,

$$\frac{\delta D}{D} = v_m \frac{\delta \langle v_f \rangle}{\langle v_f \rangle^2} = \frac{v_m}{\langle v_f \rangle} \frac{\delta \phi}{\phi - \phi_0} \quad (\text{E.5})$$

donde en la última igualdad se consideró que $\langle v_f \rangle \sim v_g \Delta\alpha (\phi - \phi_0)$ (ver sección 3.1.3). Es decir, la expresión (E.5) es consistente con las ideas de Kumar si se asocia $p \sim \langle v_f \rangle / v_m$. El cociente $\langle v_f \rangle / v_m$ estaría representando la fracción libre capaz de acomodar agregados $\delta\phi$. Efectivamente, el volumen libre *es* el espacio donde alojar agregados. Pero cabe preguntarse si el cociente $\langle v_f \rangle / v_m$ constituye una probabilidad p o requiere de constantes adicionales. Si fuese $p \approx \langle v_f \rangle / v_m$ debería

cumplirse que $\langle v_f \rangle / v_m \rightarrow 1$ cuando $\phi \rightarrow \phi_c$, porque ya se observó que $p(\phi_c) = 1$ más arriba. Es fácil ver que la condición $\langle v_f \rangle / v_m = 1$ significa que el empaquetamiento del sistema es tal que por cada molécula hay un volumen libre similar asociado. En otras palabras, el volumen específico promedio del sistema es capaz de acomodar dos moléculas (por cada v_m). Es una imagen muy razonable porque si cada molécula tiene un volumen similar a donde desplazarse, quiere decir que es posible la difusión individual. Para cualquier empaquetamiento mayor, ya no todas pueden desplazarse y se requiere de reacomodamientos cooperativos. Para empaquetamientos menores, la movilidad sería tan grande que se pierde la imagen de celdas. En definitiva $\langle v_f \rangle / v_m = 1$ corresponde aproximadamente al comienzo del régimen WLF.

Si $p \approx \langle v_f \rangle / v_m$ significa que podemos reemplazar $\langle v_f \rangle / v_m$ por $(\phi - \phi_0) / (\phi_c - \phi_0)$ en (E.5), de acuerdo con la definición de $p(\phi)$. Es inmediato entonces que,

$$\frac{\delta D}{D} \approx -\frac{1}{\gamma} \frac{\delta \eta}{\eta} \quad , \quad D \sim \eta^{-1/\gamma} \quad (\text{E.6})$$

para $\phi > \phi_c$. El exponente $a = 1/\gamma \cong 0,36$ debe ser considerado más bien como una cota inferior poco realista. La argumentación dada está bien para regiones fluidas, pero nada se dice de las zonas *sólidas*. Allí, justamente no hay volumen libre, o sea, $\langle v_f \rangle = 0$. Esto debe tomarse en cuenta en la ecuación (E.6). Si consideramos que el ingreso en el régimen WLF se da aproximadamente cuando la mitad de las moléculas pertenecen a la región *sólida* [81], entonces, la condición de ingreso debe ser $\langle v_f \rangle / v_m = 1/2$. La relación (E.6) se modifica a,

$$\frac{\delta D}{D} \approx \frac{1}{\frac{1}{2}p} \frac{\delta \phi}{\phi - \phi_0} = -\frac{2}{\gamma} \frac{\delta \eta}{\eta} \quad , \quad D \sim \eta^{-2/\gamma} \quad (\text{E.7})$$

para $\phi > \phi_c$. Ahora tenemos un exponente $a = 2/\gamma \cong 0,72$. Esto es algo mayor que $2/3$ (ver Tabla 2.1), pero constituye una buena aproximación al problema. No sólo señala la existencia de un *desacople* entre viscosidad y difusión, sino que muestra que el exponente a está formado por una contribución debida a cuestiones de asimetría molecular y otra debida al problema de la heterogeneidad espacial. Es decir, $a^{-1} = (1/2)\gamma$. El factor γ ingresó en el análisis debido a la forma elipsoidal del disacárido y que afectaba directamente la condición de contorno disacárido-agua.

El factor $1/2$ en el exponente a se debe a la distinción entre regiones *sólidas* y *líquidas*, o mejor dicho, a la proporción entre ambas. Sillescu [81] comenta que la suposición *implícita* en las teorías sobre heterogeneidades es que es posible reducir la entropía del sistema *empaquetando* una parte de éste en estructuras. Pero la consecuencia, es la reducción en el volumen libre. El efecto se vuelve visible en la ecuación (E.5) porque lleva a que $\langle v_f \rangle / v_m < 1$ alrededor de ϕ_c .

Bibliografía

- [1] Einstein A. *Investigations on the theory of the brownian movement* Dover Publications, INC. USA (1956)
- [2] Jordan J., Bauer W.E. *J. Am. Chem. Soc.* 81,3915-3919 (1959)
- [3] Hikita H., Asai S., Azuma Y. *Can. J. Chem. Eng.* 56,371-374 (1978)
- [4] Hiss T.G., Cussler E.L. *AIChE J.* 19,698-703 (1973)
- [5] Pollack G.L. *Phys. Rev. A* 23(5),2660-2663 (1981)
- [6] Frey D.D., Judson King C. *J. Chem. Eng. Data* 27(4),419-422 (1982)
- [7] Easteal A. J. *Can. J. Chem.* 68,1611-1615 (1990)
- [8] Longinotti M.P., Corti H.R. *Electrochem. Commun.* 9(7),1444-1450 (2007)
- [9] Champion D., Hervet H., Blond G., Le Meste M., Simatos D. *J. Phys. Chem. B* 101(50),10674-10679 (1997)
- [10] Angel C.A. *The Glass Transition* Pergammon Encyclopaedia of Materials, Science and Technology, vol. 4,3565-3575 (2001)
- [11] Mohanty U., Craig N., Fourkas J. *J. Chem. Phys.* 114(24),10577-10578 (2001)
- [12] Cicerone M.T., Blackburn F.R., Ediger M.D. *J. Chem. Phys.* 102(1),471-479 (1995)
- [13] Magazù S., Maisano G., Migliardo P., Villari V. *J. Chem. Phys.* 111, 9086-9092 (1999)
- [14] Champion D., Hervet H., Blond G., Simatos D. *J. Agric. Food Chem.* 43(11),2887-2891 (1995)
- [15] Chandrasekaran S.K., Judson King C. *AIChE J.* 18(3),513-520 (1972)

- [16] Covarrubias-Cervantes M., Champion D., Debeaufort F., Voilley A. *J. Agric. Food Chem.* 53(17),6771-6776 (2005)
- [17] Bates F.J., *Polarimetry, Saccharimetry and the Sugars. Circular of the National Bureau of Standards C440.* United States Government Printing Office, Washington (1942)
- [18] Schneider F., Schliephake D., Klimmek A. *Zucker* 16 (17),465-473 (1963)
- [19] Miller D., De Pablo J., Corti H. *Pharmaceutical Research.* 14(5),578-590 (1997)
- [20] Miller D., De Pablo J., Corti H. *J. Phys. Chem. B.* 103,10243-10249 (1999)
- [21] Rampp M., Buttersack Ch., Lüdemann H. *Carbohydrate Research* 328,561-572 (2000)
- [22] Karger N., Lüdemann H-D. *Z. Naturforsch. C. Biosc.* 46,313 (1991)
- [23] Ding S-P., Fan J., Green L., Lu Q., Sanchez E., Angell C.A. *J. Therm. Anal.* 47,1391-1405 (1996)
- [24] Mathlouthi M., Reiser P. *Sucrose Properties and Applications* Blackie Academic and Professional. Glasgow, UK. (1995)
- [25] Huggins M.L. *J. Am. Chem. Soc.* 65,2716-2718 (1942)
- [26] Kraemer E.O. *Ind. Engng. Chem.* 30,1200-1203 (1938)
- [27] Génotelle J. *Indust. Alim. Agric.* 95,747-755 (1978)
- [28] Angell C.A. *Relaxations in Complex Systems* Ed. Ngai K. & Wright G.B., National Technical Information Service, U.S. Department of Commerce. Springfield-USA (1985)
- [29] Angell C.A. *Chem. Rev.* 102,2627-2650 (2002)
- [30] Soesanto T., Williams M.C. *J. Phys. Chem.* 85,3338-3341 (1981)
- [31] Williams M.L., Landel R.F., Ferry J.D. *J. Am. Chem. Soc.* 77,3701-3706 (1955)
- [32] Longinotti M.P. *Movilidad molecular en soluciones acuosas sobre-enfriadas y vitrificadas de trehalosa y sacarosa* Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires - Ciencias Químicas - FCEyN (2007)
- [33] Slade L., Levine H. *Pure & Appl. Chem.* 60(12),1841-1864 (1988)

- [34] Higashiyama T. *Pure Appl. Chem.* 74,1263-1269 (2002)
- [35] Magazù S., Villari V., Migliardo P., Maisano G., Telling M. *J. Phys. Chem. B* 105(9),1851-1855 (2001)
- [36] Iannilli E., Tettamanti E., Galantini L., Magazù S. *J. Phys. Chem. B.* 105,12143-12149 (2001)
- [37] Ekdawi-Sever N., De Pablo J. *J. Phys. Chem. A.* 107(6),936-943 (2003)
- [38] Molinero V., Çağın T., Goddard W. A. III *Chem. Phys. Lett.* 377,469-474 (2003)
- [39] Donnataria M.C., Howard E.I., Grigera J.R. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 90(18),2731-2735 (1994)
- [40] Murarka R.K., Bhattacharyya S., Bagchi B. *J. Chem. Phys.* 117(23),10730-10738 (2002)
- [41] Adam G., Gibbs J.H. *J. Chem. Phys.* 43(1),139-146 (1965)
- [42] Landau L.D., Lifshitz E.M. *Theory of Elasticity* Volume 7 of Course of Theoretical Physics, Third Edition. Maxwell-MacMillan International Editors, Singapore (1989)
- [43] Reichman D.R., Charbonneau P. *J. Stat. Mech.: Theory and Experiment* P05013 (2005)
- [44] Götze W. *Aspects of structural glass transition* Les Houches- Summer School on Theoretical Physics. Editado por Hansen J.P., Levesque D., Zinn-Justin J. (1989)
- [45] Barrat J-L. *Mode Coupling Theories* Cargese Summer School: Physics of glasses: structure and dynamics. AIP Proceedings 489. Editado por Jund P. & Jullien R. (1999)
- [46] Larson R. G. *The Structure and Rheology of Complex Fluids* Oxford University Press, New York USA (1999)
- [47] Cohen M. H., Turnbull D. *J. Chem. Phys.* 31(5),1164-1169 (1959)
- [48] Turnbull D., Cohen M. H. *J. Chem. Phys.* 34(1),120 (1961)
- [49] Cohen M. H., Grest G. S. *Physical Rev. B.* 20(3),1077-1098 (1979)
- [50] Landau L. D. & Lifshitz E. M. *Mecánica de Fluidos* Versión española. Editorial Reverté, Barcelona-Espana. (1991)
- [51] Bhattacharyya S., Bagchi B. *J. Chem. Phys.* 106(5),1757-1763 (1997)

- [52] Kubo R. *Rep. Prog. Phys.* 29,255-284 (1966)
- [53] Papoulis A. *Probabilidad, variables aleatorias y procesos estocásticos* EUNIBAR Editorial Universitaria de Barcelona. España (1980).
- [54] Huang K. *Statistical Mechanics* Second Edition. John Wiley & Sons Inc. USA (1987)
- [55] Peters J.M.H. *Eur. J. Phys.* 3,19-21 (1982)
- [56] Bonn D. *J. Chem. Phys.* 118(4),2005-2009 (2003)
- [57] Lamb H. *Hydrodynamics* Sixth Edition. Dover Publications. New York, USA. (1945)
- [58] Cugliandolo L.F., Kurchan J. Peliti L. *Phys. Rev. E* 55(4),3898-3914 (1997)
- [59] Jung Y., Garrahan J.P., Chandler D. *Phys. Rev. E* 69(6),061205 (2004)
- [60] Garrahan J.P., Chandler D. *Phys. Rev. Lett.* 89(3),035704 (2002)
- [61] Binder K., Kob W. *Glassy materials and disordered solids-An introduction to their statistical mechanics* World Scientific Publishing Co., Singapore (2005)
- [62] Díaz-Sánchez A., De Candia A., Coniglio A. *J. Phys A: Math. Gen.* 35(15),3359-3368 (2002)
- [63] Cicerone M. T., Wagner P. A., Ediger M. D. *J. Phys. Chem. B* 101,8727-8734 (1997).
- [64] Tarjus G., Kivelson D. *J. Chem. Phys.* 103,3071-3073 (1995).
- [65] Xia X., Wolynes P. G. *Phys. Rev. Lett.* 86,5526-5529 (2001).
- [66] Xia X., Wolynes P. G. *J. Phys. Chem. B* 105,6570-6573 (2001).
- [67] Tsipkin A.G., Psipkin G.G. *Fórmulas Matemáticas* Editorial MIR, Moscú (1988)
- [68] Ferry J.D. *Viscoelastic properties of polymers* Third Edition. John Wiley & Sons Inc. USA (1980)
- [69] Fulcher G.S. *J. Am. Ceram. Soc.* 8(6),339-355 (1925)
- [70] Tammann G., Hesse W. *A. Anorg. u. Allg. Chem.* 156,245-257 (1926)
- [71] Miller A.A. *Macromolecules* 11(5),859-862 (1978)
- [72] Kumar N. *Current Science* 88(1),143-145 (2005)

- [73] Hynes J.T., Kapral R., Weinberg M. *J. Chem. Phys.* 70(3),1456-1466 (1979)
- [74] Keyes T., Oppenheim I. *Phys. Rev. A* 8(2),937-949 (1973)
- [75] Bagchi B., Biswas R. *Polar and nonpolar solvation dynamics, ion diffusion, and vibrational relaxation: role of biphasic solvent response in chemical dynamics* Advances in Chemical Physics, Vol. 109, Editado por Prigogine I. & Rice S.A. - John Wiley & Sons (1999)
- [76] Zwanzig R. *J. Chem. Phys.* 38(7),1603-1605 (1963)
- [77] Zwanzig R. *J. Chem. Phys.* 52(7),3625-3628 (1970)
- [78] Suggett A., Clark A.H. *J. Solution Chem.* 5(1),1-15 (1976)
- [79] Fuchs K., Kaatze U. *J. Chem. Phys.* 116(16),7137-7144 (2002)
- [80] Matsouka T., Okada T., Murai K., Koda S., Nomura H. *J. Molecular Liquids* 98-99,319-329 (2002)
- [81] Sillescu H. *J. Non Cryst. Solids* 243,81-108 (1999)
- [82] Stillinger F.H., Hodgdon J.A. *Phys. Rev. E* 50,2064 (1994)
- [83] Stillinger F.H., Hodgdon J.A. *Phys. Rev. E* 53,2995 (1996)
- [84] Axelrod D., Koppel D. E., Schlessinger J., Elson E., Webb W. W. *Biophys. J.* 16,1055-1069 (1976)
- [85] Eggeling C., Widengren J., Rigler R., Seidel C.A.M. *Anal. Chem.* 70,2651-2659 (1998)
- [86] Pringsheim P. *Fluorescence and Phosphorescence* Interscience Publishers Inc. Londres U.K. (1949)
- [87] Wells S. *Fundamentals of Fluorescence* O'Brien Workshop - Optical Microscopy in Renal Research Indiana University-School of Medicine (2003)
- [88] Song L., Hennink E.J., Young T., Tanke H. *Biophysical J.* 68,2588-2600 (1995)
- [89] Davis P.J. Gamma function and related functions. In Abramowitz M., Stegun I.A. *Handbook of Mathematical Functions* Dover Publications Inc. New York. Cuarta edición (1965)
- [90] Slater L.J. Confluent hypergeometric functions. In Abramowitz M., Stegun I.A. *Handbook of Mathematical Functions* Dover Publications Inc. New York. Cuarta edición (1965)

- [91] Box M.J. *J. Roy. Stat. Soc. B* 33,171-201 (1971)
- [92] Olver F.W.J. Bessel functions of integer order. In Abramowitz M., Stegun I.A. *Handbook of Mathematical Functions* Dover Publications Inc. New York. Cuarta edición (1965)
- [93] Luke Y.L. Integrals of Bessel functions. In Abramowitz M., Stegun I.A. *Handbook of Mathematical Functions* Dover Publications Inc. New York. Cuarta edición (1965)
- [94] Wrench J.W. *Math. Comp.* 22,617-626 (1968)
- [95] Mathews J., Fink K.D. *Métodos numéricos con Matlab* Pearson Educación S.A. Madrid. Tercera edición (2005)
- [96] Barreto H., Maharry D. *Comp. Stat. & Data Anal.* 50,1391-1397 (2006)
- [97] Saxton M. *J. Biophys. J.* 81,2226-2240 (2001)
- [98] Hubert M., Rousseeuw P.J. *J. Stat. Plan. Inf.* 57, 153-163 (1997)
- [99] Frank G. A., Marconi M. C., Corti H. R. An alternative solution of the fluorescence recovery kinetics after spot-bleaching for measuring diffusion coefficients. 1. Theory and numerical analysis. In *J. Solution Chem.*, en prensa.
- [100] Bellows R. J., King C. J. *AIChE Symp. Series* 69,33-41 (1973).
- [101] Kerr W. L., Reid D. S. *Lebensm. Wiss. Technol.* 27,225-231 (1994).
- [102] Longinotti M. P., Corti, H. R. Viscosity of concentrated trehalose and sucrose aqueous solutions including the supercooled regime. In *J. Phys. Chem. Ref. Data*, en prensa.
- [103] Gordon M., Taylor J. *J. Applied Chem.* 2,493-500 (1952)
- [104] Frank G.A. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 36(4),1279-1285 (2007)
- [105] Moore A.W. (Jr.), Jorgenson J.W. *Anal. Chem.* 65,3550-3560 (1993)
- [106] Mustafa M.B., Tipton D.L., Barkley M.D., Russo P.S., Blum F.D. *Macromolecules* 26,370-378 (1993)
- [107] Mustafa M.B., Tipton D., Russo P.S. *Macromolecules* 22 (3),1500-1504 (1989)
- [108] Mosier B.P., Molho J.I., Santiago J.G. *Experiments in fluids* 33,545-554 (2002)

- [109] Wang L., Roitberg A., Meuse C., Gaigalas A. K. *Spectrochimica Acta Part A* 57,1781-1791 (2001)
- [110] Sjöback R., Nygren J., Kubista M. *Spectrochim. Acta Part A* 51,L7-L21 (1995)
- [111] Hubbard J. B., Douglas J. F. *Phys. Rev. E* 47,R2983-R2986 (1993).
- [112] Blackurn F.R., Wang C., Ediger M.D. *J. Phys. Chem.* 100,18249-18257 (1996)
- [113] Periasamy N., Bicknese S., Verkman A.S. *Photochim. Photobiol.* 63,265-271 (1996)
- [114] Johari G. P., Hallbrucker A., Majer E. *Nature* 330,552-553 (1987)
- [115] Rampp M., Buttersack C., Lüdemann H-D. *Carbohydr. Res.* 328 ,561-572 (2000)
- [116] Longinotti M. P., Mazzobre M. F., Buera M. P., Corti H. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4,533-540 (2002).
- [117] Longinotti M. P., Corti H. R. Electrical conductivity of potassium chloride, cesium chloride and tetrabutyl ammonium bromide in unsaturated and supercooled aqueous sucrose solutions, enviado al *Phys. Chem. Chem. Phys.*
- [118] Miller D. P., Conrad P. B., Fucito S., de Pablo J. J., Corti H. R. *J. Phys. Chem. B* 104,10419-10425 (2000).
- [119] Branca C., Magaz S., Maisano G., Migliardo P., Villari V., Sokolov A. P. *J. Phys.: Condens. Matter* 11, 3823-3832 (1999)
- [120] Magazú S., Maisano G., Migliardo P., Middendorf H. D., Villari V. *J. Chem. Phys.* 109, 1170-1174 (1998)
- [121] Branca C., Magazú S., Maisano G., Migliardo P., Migliardo P., Romeo G. *J. Phys. Chem. B* 105, 10140-10145 (2001)
- [122] Elias M. E., Elias A. M. *J. Mol. Liq.* 83, 303-310 (1999)
- [123] Saleki-Gerhardt A. *Ph.D. thesis*, University of Wisconsin, Madison, (1993)
- [124] Longinotti M. P., Corti H. R. *J. Solution Chem.* 33, 1029-1038 (2004)

- [125] Corti H. R., Frank G. A., Marconi M. C. An alternative solution of the fluorescence recovery kinetics after spot-bleaching for measuring diffusion coefficients. 2. Diffusion of fluorescein in sucrose aqueous solutions. *In J. Solution Chem.*, en prensa.
- [126] Miao W., Ding Z., Bard A. J. *J. Phys. Chem.* 106,1392-1398 (2002).
- [127] Hodgdon J. A., Stillinger F. H. *Phys. Rev. E* 50,2064-2068 (1994).
- [128] Chang I., Sillescu H. *J. Phys. Chem.* 101,8794-8801 (1997).
- [129] Garrahan J. P., Chandler D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100,9710-9714 (2003).
- [130] Spiro, M. In B. W. Rossiter and J. F. Hamilton (Eds.), *Physical Methods of Chemistry*, 5th Edition, Interscience, New York, (1984).
- [131] Longinotti M. P., Corti H. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, enviado.
- [132] Landau L. D. & Lifshitz E. M. *Statistical Physics-Part 1* Third Edition, 10th Reprint. Butterworth-Heinemann (an imprint of Elsevier Science), Oxford-England. (2003)
- [133] Paci E., Cafilisch A., Plückthun A., Karplus M. *J. Mol. Biol.* 314, 589-605 (2001)
- [134] Tinoco I. (Jr.), Sauer K., Wang J.C. *Physical Chemistry* Segunda Edición, Prentice-Hall Inc. New York (1985)
- [135] Senti F.R., Hellman N.N., Ludwig N.H., Babcock G.E., Tobin R., Glass C.A., Lamberts B.L. *J. Polym. Sci.* 17,527-546 (1955)
- [136] Amu Th. C. *Biophys. Chem.* 16,269-273 (1982)
- [137] Gribbon Ph., Hardingham T.E. *Biophys. J* 75,1032-1039 (1998)
- [138] Hallett J. *Proc. Phys. Soc.* 82,1046-1050 (1963)
- [139] Eicher L.D., Zwolinski B. J. *J. Phys. Chem.* 75,13,2016-2024 (1971)
- [140] White G., Twining R. *Amer. Chem. J.* 50,380 (1913)
- [141] Osipov Y.A., Zheleznyi B.V., Bondarenko N.F. *Russian J. Phys. Chem.* 51 (5),748-749 (1977)
- [142] Sengers J.V., Watson J.T.R. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 15,1291 (1986)
- [143] DeFries T., Jonas J. *J. Chem. Phys.* 66,3,896-901 (1977)

- [144] Korson L., Dorst-Hansen W., Millero F.J. *J. Phys. Chem.* 73 (1),34-39 (1969)
- [145] Hardy R., Cottington R. *J. Res. Nat. Bur. Stand.* 42,573 RP1994 (1949)
- [146] Korosi A., Fabuss B.M. *Anal. Chem.* 40,157 (1968)
- [147] Geddes J.A. *J. Amer. Chem. Soc.* 55,4832 (1933)
- [148] Bingham E., Jackson R. *Bur. Stand. (U.S.) Bull.* 14,59 (1916)
- [149] Coe J.R., Godfrey T.B. & Jr. *J. Appl. Phys.* 15,625 (1944)
- [150] Swindells J.F., Snyder C.F., Hardy R.C., Golden P.E. *National Bureau of Standards, Suppl. to Circ. 440* Viscosities of sucrose solutions at various temperatures. Tables 132-133 (1957)
- [151] Rampp M., Buttersack Ch., Lüdemann H-D. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39(11),4400-4407 (2000)
- [152] Hughes W. F., Brighton J. A. *Schaum's Outlines Series - Fluid Dynamics* Third Edition, McGraw-Hill, New York (1999)
- [153] Griebel M., Dornseifer T., Neunhoeffler T. *Numerical Simulation in Fluid Dynamics, a Practical Introduction* SIAM, Philadelphia (1998)
- [154] Atkins P. W. *Physical Chemistry* Fifth Edition, W. H. Freeman & Company, New York (1994)
- [155] Lide D.R., ed. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 87th Edition, CRC Press, Boca Raton-USA (2006)
- [156] Slater J.C. *Phys. Rev.* 36,57-64 (1930)
- [157] Hubbard j.B., Douglas J.F. *Phys. Rev. E* 47 (5),R2983-R2986 (1993)
- [158] Tamulis A., Tamuliene J., Balevicius M. L., Rinkevicius Z., Tamulis V. *Structural Chemistry* 14 (6),643-648 (2003)
- [159] Druchschlag H., Zipper P. *J. Appl. Cryst.* 30,803-807 y suplemento X84592 (1997)
- [160] Engelsen S.B., Pérez S. *Carbohydrate Research* 292,21-38 (1996)
- [161] Magazù S., Migliardo P., Musolino A.M., Sciortino M.T. *J. Phys. Chem. B.* 101,2348-2351 (1997)
- [162] Martin M.M. *Chem. Phys. Lett.* 35 (1), 105-111 (1975)

- [163] Klonis N., Clayton A.H.A., Voss E.W. (Jr.), Sawyer W.H. *Photochemistry and Photobiology* 67 (5),500-510 (1998)
- [164] Minkin V.I., Osipov O.A., Zhdanov Y.A. *Dipole Moments in Organic Chemistry* Plenum Press, New York (1970)
- [165] McClellan A.L. *Tables of Experimental Dipole Moments*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA (1963)
- [166] Budavari S. (Ed.) *The Merck Index- An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologcals* Twelfth Edition, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station-N.J., USA (1996)
- [167] Jackson J.D. *Classical Electrodynamics* Second Edition, John Wiley & Sons, New York, USA (1975)
- [168] Landt E. *Die Naturwissenschaften* 22 (48),809 (1934)
- [169] Ekdawi-Sever N., Conrad P.B., De Pablo J.J. *J. Phys. Chem. A* 105(4),734-742 (2001)
- [170] Perez J., Cavallé J.Y. *J. Non Cryst. Solids* 172-174, 1028-1036 (1994)