



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
FACULTAD DE CIENCIAS

LA TERMODINÁMICA DE MEZCLAS DE AZÚCARES EN LA REGIÓN  
SOBRESATURADA: APLICACIONES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencia e Ingeniería de Materiales

PRESENTA:

SOLEDAD RUIZ MATUS

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. PATRICIA GOLDSTEIN MENACHE

FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR:

DR. CARLOS MENDOZA RUIZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

UNAM

DRA. KARINA MARTINEZ MAYORGA

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNIDAD MÉRIDA, UNAM.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATEMÁTICAS

APLICADAS Y EN SISTEMAS, UNIDAD MÉRIDA,

UNAM

---

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

**La termodinámica de mezclas de azúcares en la región  
sobresaturada: aplicaciones en sistemas biológicos**

que presenté para obtener el grado de ~~----~~Doctorado es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

**Atentamente**

M. en C. Soledad Ruiz Matus  
516022811

**(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)**



---

**Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales – UNAM  
Acuerdo del Comité Académico del 28 de junio de 2023**

**Declaración de Autoría**

Yo, Soledad Ruiz Matus, hago constar que esta tesis titulada, "La termodinámica de mezclas de azúcares en la región sobresaturada: aplicaciones en sistemas biológicos" y el trabajo presentado en ella son de mi autoría, asimismo,

Yo confirmo que:

Este trabajo fue hecho totalmente durante el periodo de mis estudios de Doctorado en el Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales (PCeIM) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Ninguna parte del presente trabajo ha sido usada para algún tipo de grado o certificación en la UNAM, ni en alguna otra Institución.

Cuando se ha citado el trabajo de otros autores, siempre se ha dado la fuente de origen. Con la excepción de dichas citas, la totalidad de la información contenida en el presente trabajo es de mi autoría.

He reconocido todas las fuentes de ayuda usadas en este trabajo.

Cuando el trabajo fue hecho en colaboración con otros, he especificado cuáles fueron sus contribuciones.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc., sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía.

Acepto que, en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

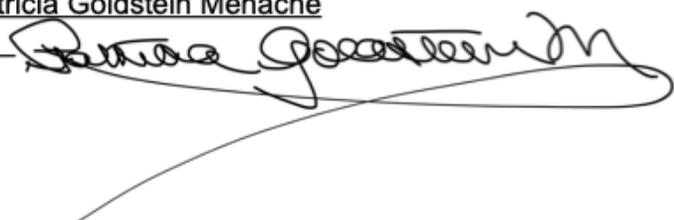
Nombre Alumno: Soledad Ruiz Matus

Firma: \_\_\_\_\_



Nombre del Tutor: Dra. Patricia Goldstein Menache

Firma: \_\_\_\_\_



Fecha: 08 de Marzo de 2024



---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Gracias a mi esposo, por su apoyo incondicional.

Gracias a mi asesora, por su guía y amistad.

Gracias a mi familia, por todo su ánimo y comprensión.

Gracias a mi comité tutor que me apoyo en todo momento.

Gracias a todos mis profesores y colegas.

Gracias a la UNAM y al PCEIM por la oportunidad de continuar mi formación académica.

Gracias a la DGAPA-UNAM por el apoyo a través del Proyecto PAPIIT IN107322.

Gracias al CONAHCYT por el apoyo económico brindado.



---

---

# ÍNDICE GENERAL

---

<b>Resumen</b> .....	<b>X</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>XIV</b>
<b>I Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
<b>Capítulo 1. Las transiciones de fase termodinámicas</b> .....	<b>5</b>
1.1. Transiciones de fase en sistemas de una componente. ....	5
1.2. Transiciones de fases en sistemas de dos componentes. ....	9
<b>Capítulo 2. Transiciones cinéticas: la transición vítrea en líquidos simples sobreenfriados</b> .....	<b>15</b>
2.1. El líquido sobreenfriado y la transición vítrea. ....	16
2.1.1. La temperatura de transición vítrea .....	17
2.1.2. La viscosidad en un líquido sobreenfriado simple .....	18
2.1.3. Universalidad de la viscosidad de los líquidos sobreenfriados simples .....	24
<b>Capítulo 3. Transiciones cinéticas: la transición vítrea en soluciones sobresaturadas</b> .....	<b>27</b>
3.1. El diagrama suplementario (SPD). ....	27
3.2. La viscosidad y la temperatura de transición vítrea en las soluciones sobresaturadas .....	31
3.2.1. La temperatura de transición vítrea en una mezcla binaria .....	32
3.2.2. La viscosidad en las mezclas binarias de azúcares .....	34
<b>II Resultados</b> .....	<b>45</b>
<b>Capítulo 4. El SPD y la temperatura de transición vítrea en las soluciones acuosas de azúcar</b> .....	<b>47</b>
4.1. El diagrama de fases suplementario SPD. ....	48

---

4.2. La temperatura de transición vítrea como función de la concentración en las mezclas binarias. . . . .	51
4.2.1. La temperatura de transición vítrea como función de la concentración en los alimentos . . . . .	53
4.3. El régimen sobresaturado en las mezclas de azúcar: estimación de una frontera . . . . .	56
<b>Capítulo 5. Universalidad en la viscosidad de las soluciones sobresaturadas de azúcares . . . . .</b>	<b>59</b>
5.1. La viscosidad en las soluciones sobresaturadas de azúcares . . . . .	61
<b>Capítulo 6. Los azúcares y sus aplicaciones biológicas . . . . .</b>	<b>67</b>
6.1. La relevancia de los azúcares en los procesos de criopreservación por vitrificación . . . . .	67
6.1.1. Los azúcares como agentes crioprotectores (CPAs) . . . . .	70
6.1.2. Evidencias de universalidad en la criopreservación celular . . . . .	74
6.2. Las partículas lipídicas nanométricas (LNPs) y las vacunas . . . . .	76
<b>III Conclusiones . . . . .</b>	<b>79</b>
<b>Capítulo 7. Conclusiones y perspectivas . . . . .</b>	<b>81</b>
<b>Capítulo A. Apéndice . . . . .</b>	<b>83</b>
A.1. Termodinámica de las soluciones. . . . .	83
A.2. Teoría física estadística de G. Adam y H. Gibbs . . . . .	88
A.3. La solubilidad en sistemas binarios . . . . .	90
<b>Bibliografía . . . . .</b>	<b>93</b>

---

## RESUMEN

---

La transición vítrea es la ruta que siguen tanto líquidos sobreenfriados como soluciones acuosas sobresaturadas al sufrir enfriamientos con altas tasas de rapidez. La descripción de esta transición cinética se realiza a través del análisis de los procesos de relajamiento resultantes de la ralentización en la dinámica de las moléculas en su interior. El más conocido es aquél que resulta al enfriar un líquido por debajo de su temperatura de fusión de manera no cuasiestática, es decir con cierta velocidad de enfriamiento. El líquido se sobreenfría manteniendo sus grados de libertad configuracionales y al alcanzar la llamada temperatura de transición vítrea, que depende fuertemente de la tasa de enfriamiento, se convierte en un vidrio. La transición vítrea es una transición cinética, no una transición de fase termodinámica ya que se realiza a través de un proceso fuera de equilibrio.

De acuerdo con los enunciados de la termodinámica irreversible, un sistema fuera de equilibrio debe relajarse hacia estados de equilibrio mediante un proceso dependiente del tiempo. En el caso del estudio de los líquidos sobreenfriados, éste se realiza a través del comportamiento térmico de su viscosidad al bajar la temperatura. Ésta alcanza valores del orden de  $10^{13}$  Poise al bajar la temperatura en una vecindad de  $T_g$ . El segundo caso se refiere al caso de la sobresaturación de mezclas acuosas con solutos polihidroxidos.

El estudio de los líquidos sobreenfriados puede considerarse aún como un problema abierto en la física. Su descripción termodinámica, se ha basado en el comportamiento de coeficientes de transporte tales como la viscosidad y el coeficiente de difusión de un trazador.

Desde los inicios del siglo XX, surgieron varios estudios acerca de la preservación de material biológico, células y tejidos, a muy bajas temperaturas. Se dieron cuenta que al agregar ciertos solutos en el agua y bajar su temperatura, era posible inhibir la formación de hielo. Este comportamiento se reportaba también dentro de la ciencia de alimentos al comenzar la industria de congelación de alimentos.

La descripción termodinámica de estas mezclas no corresponde a la de una mezcla eutéctica y existían problemas experimentales para medir la solubilidad. La viscosidad de estas soluciones acuosas, al bajar la temperatura y aumentar la concentración, se volvían sobresaturadas, adquirirían viscosidades muy altas, al igual que los sobreenfriados hasta llegar a una temperatura, ahora dependiendo de la cantidad de soluto, a partir de la cuál se formaba un vidrio. Esta ruta hacia la transición vítrea comenzó a estudiarse por sus amplias aplicaciones.

Por otra parte la descripción del comportamiento de las mezclas sobresaturadas hacia el proceso de la vitrificación es más complicado al tener una variable adicional. Como punto de partida, se ha tratado de describir el comportamiento de la viscosidad con la

---

temperatura, a una concentración dada, utilizando una fenomenología semejante a la del líquido sobreenfriado.

En este trabajo se presenta un estudio acerca del comportamiento universal de la viscosidad de varias soluciones acuosas sobresaturadas y un análisis detallado de la descripción del diagrama de fases de las mismas que incluye regiones fuera de equilibrio [1]. Se hace una descripción detallada de la utilidad de los azúcares en la criopreservación de celular y de tejidos así como en las industrias farmacéutica y de alimentos.

---

---

## OBJETIVOS

---

### Objetivo General

Analizar el alcance de la teoría que describe a los procesos de relajación en los líquidos sobreenfriados simples para el estudio de mezclas sobresaturadas de agua y azúcares a través del comportamiento de la viscosidad en dicho sistema.

### Objetivos particulares

Describir la termodinámica de los diagramas de fases suplementarios (SPD).

Probar que la viscosidad de las soluciones de agua y azúcar en el estado sobresaturadas satisface teorías desarrolladas para los líquidos sobreenfriados simples frágiles.

Establecer la universalidad para la viscosidad en dichas soluciones a distintas concentraciones y para distintas azúcares.

Mostrar evidencias de aplicabilidad de nuestra teoría y resultados en distintos sistemas biológicos.



---

## INTRODUCCIÓN

---

La transición vítrea es la ruta que siguen tanto líquidos sobreenfriados como para soluciones acuosas sobresaturadas al sufrir enfriamientos con altas tasas de rapidez. La descripción de esta transición cinética se realiza a través del análisis de los procesos de relajamiento resultantes de la ralentización en la dinámica de las moléculas en su interior. La descripción de ambos fenómenos ya no es posible dentro del marco teórico de las descripciones diagramáticas de las transiciones de fases termodinámicas.

Podemos encontrar un fenómeno especial en el caso de las soluciones de agua y compuestos polihidroxilados, como alcoholes y azúcares. Estos solutos, en soluciones acuosas, presentan una resistencia a cristalizarse a medida que se reduce la temperatura. Estas mezclas no presentan una separación de fase eutéctica y en su lugar forman soluciones sobresaturadas.

La naturaleza ha proporcionado información para encontrar soluciones que resuelvan el problema de preservar células o tejidos durante períodos prolongados en un entorno desfavorable. El almacenamiento hipo térmico, la vitrificación y la liofilización son distintos métodos de preservación que se han desarrollado con el fin de extender la vida celular más allá de las temperaturas ambientales. Excluyendo el almacenamiento hipo térmico, cuya temperatura de almacenamiento ronda los 4°C, los otros métodos tienen el inconveniente de la inclusión de hielo dado las temperaturas por bajo cero utilizadas. La formación de hielo intracelular y extracelular en los organismos vivos puede ser mortal. Las estrategias desarrolladas natural y artificialmente para minimizar la cantidad de hielo formado esencialmente se realiza por dos vías, por un lado mediante la eliminación del agua y por el otro mantener el agua líquida con la ayuda de ciertas sustancias que inhiben la formación y cantidad de hielo. Dado que el agua está presente tanto dentro como fuera de las células y constituye casi el 70 % de la masa, las dos estrategias mencionadas tienen consecuencias ya que se trata de la modificación del ambiente celular causando tensiones osmóticas, tensiones mecánicas y cambios conformacionales.

La criopreservación de sistemas biológicos fue estudiada por primera vez por Basile Luyet en la década de 1930, considerando este proceso como una forma de animación suspendida. El uso de mezclas de agua con diferentes tipos de alcoholes, como glicerol, y varios azúcares, principalmente sacarosa y trehalosa, demostró proteger la estructura de células y tejidos al enfriarlos. Estos solutos, en soluciones concentradas forman una matriz amorfa que exhibe una transición vítrea a una temperatura dependiente de la concentración por lo que los azúcares particularmente desempeñan un papel muy importante como estabilizadores debido a su renuencia a la cristalización.

Desde principios de la década de 1920, la fenomenología asociada a la transición vítrea, han sido objeto de estudio. La descripción calorimétrica como por ejemplo de los caramelos,

---

que son una mezcla acuosa azucarada sobresaturada, muestra las diferentes temperaturas de transición vítrea y su dependencia con la concentración. Se observó como estas mezclas presentan viscosidades crecientes que les permitía inhibir la separación de fase eutéctica permitiendo en su lugar una transición vítrea.

La presente tesis está dividida en siete capítulos, los tres primeros contienen los antecedentes, el cuarto y quinto corresponden a los resultados, el sexto la justificación del trabajo y el último corresponde a las conclusiones y perspectivas. A continuación se describe brevemente el contenido de cada capítulo :

- Capítulo 1: se presenta un resumen de la termodinámica de equilibrio referente a las transiciones de fases de sistemas de una y dos componentes, en particular, para una mezcla eutéctica.
- Capítulo 2: se abordan las transiciones cinéticas en sistemas simples y binarios.
- Capítulo 3: se describe una mezcla binaria acuosa con solutos polihidroxilados como los azúcares y el diagrama de fases suplementario SPD.
- Capítulo 4: se construye el SPD para las mezclas acuosas de azúcares a partir de datos experimentales reportados en diversos artículos de investigación. A partir de estos datos se propone una ecuación para la temperatura de transición vítrea en función de la concentración. Además, se discute el problema que representan las regiones fuera de equilibrio y la dificultad para determinar la curva de solubilidad en el SPD y se presenta una posible procedimiento para encontrar el lugar geométrico de dicha curva.
- Capítulo 5: se describe el comportamiento de la viscosidad de las mezclas acuosas de sacarosa, trehalosa, lactosa y fructosa. Se encuentra una universalidad para este coeficiente de transporte en la región sobresaturada.
- Capítulo 6: se presentan dos de las principales aplicaciones biológicas de nuestro trabajo: la criopreservación de células y tejidos y la preservación de las partículas nanolipídicas utilizadas en la industria farmacéutica para preservar las vacunas de ARN mensajero.
- Capítulo 7: se presentan las conclusiones y perspectivas.

Adicionalmente se incluye un apéndice, donde se expone brevemente los fundamentos teóricos necesarios para el desarrollo de este trabajo de tesis.

**Parte I**  
**Antecedentes**



---

## LAS TRANSICIONES DE FASE TERMODINÁMICAS

---

La materia puede presentarse, en general, en tres estados de agregación: sólido, líquido y gas. De estos, tenemos el caso particular en el que éstas corresponden a fases termodinámicas de equilibrio. Una sustancia pura puede transitar, cuasiestáticamente, a las tres fases. Para comprender este comportamiento podemos estudiar las tres correspondientes proyecciones en los diagramas  $pV$ ,  $pT$ , y  $VT$ .

A la presión atmosférica de 1 atm el agua hervirá 100 °C y se convertirá en hielo a 0°C, estos cambios de fase se consiguen habitualmente. Sin embargo, para otras sustancias, transitar de una fase a otra puede ser difícil debido a las condiciones de presión y temperatura necesarias para lograrlo. La manipulación de estas variables permitirá transitar entre las distintas fases y definirá el estado de equilibrio de nuestro sistema hecho que fue percibido por J. Thompson quién en 1849 demostró que la temperatura de fusión del hielo disminuye al incrementar la presión. Un año después, su hermano William Thompson (Lord Kelvin) confirmó este resultado experimentalmente [2].

A partir de la experimentación desde comienzos del siglo XIX se observó que bajo ciertas condiciones de temperatura y presión, algunas sustancias presentaban cambios en sus propiedades termodinámicas y en sus funciones de respuesta. En 1861 Thomas Andrews intentó licuar el oxígeno, hidrógeno y nitrógeno sin éxito aparente, sin embargo en sus resultados si observó lo que hoy conocemos como punto crítico [3]. Su atención se centraba en el dióxido de carbono, por lo que tras años de trabajo y mejoras en sus dispositivos experimentales fue hasta 1869 que logra licuar esta sustancia y confirmar la existencia del punto crítico [4], es cuando presenta por primera vez gráficamente las isothermas en un diagrama P-V.

Los diagramas de fase en sus distintas representaciones son utilizados para describir la fenomenología de las transiciones de fase de una o más componentes químicas, así las variables termodinámicas que se pueden controlar en nuestro sistema termodinámico son la presión, la temperatura y en el caso de sistemas multicomponente, la composición química. En este último caso, los diagramas de fase de sistemas de dos componentes son muy diversos, y en algunos casos muy complicados de representar, incluso para construir el diagrama eutéctico simple es difícil obtener las curvas de coexistencia para todas temperaturas y concertaciones [5].

### 1.1. Transiciones de fase en sistemas de una componente

Una transición de fase, ocurre en un sistema debido a las condiciones de temperatura, presión y composición impuestas. Cualquier proceso espontáneo que tenga lugar a temperatura y presión constantes conduce a una disminución del potencial químico del sistema

y alcanza su valor mínimo cuando el sistema está en equilibrio. En otras palabras, a una temperatura y presión dadas, una sustancia pura es más estable en una fase en la que tiene el mínimo potencial químico, o en sistemas compuestos, la mínima energía libre de Gibbs. Si se toma  $T$  o  $P$  constantes en un proceso termodinámico, el potencial químico se expresa como función de la variable restante. En la figura 1.1 se muestran los cambios de fase gas-líquido a la presión  $P_1$ , líquido-sólido a la presión  $P_2$  con  $T$  constante por un lado, y por otro los cambios de fase sólido-líquido a la temperatura  $T_1$  y líquido-gas a la temperatura  $T_2$  con  $P$  constante.

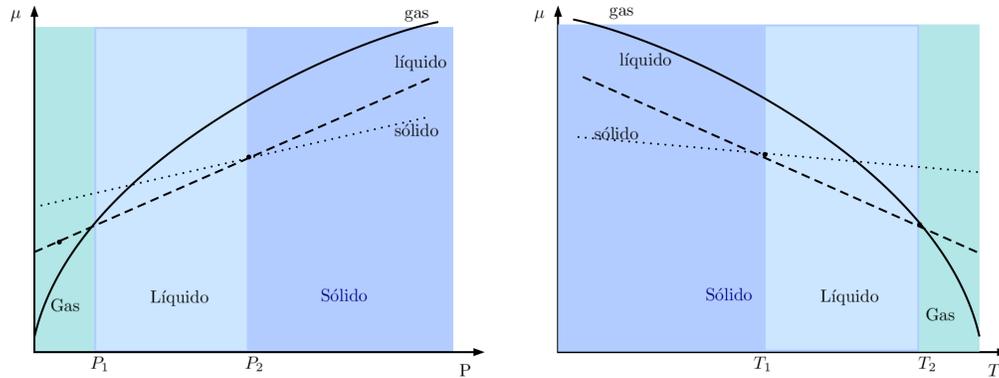


Figura 1.1: El potencial químico como función de la presión y/o la temperatura en un proceso termodinámico y los cambios de fase correspondientes [6].

En el caso de una sustancia pura donde la composición no es variable, cualquiera de los diagramas termodinámicos  $P - V$ ,  $T - V$  ó  $P - T$ , nos ayudan a describir gráficamente una transición de fase termodinámica. Estos diagramas representan una proyección de la superficie  $P - V - T$  [7]. En el diagrama  $P - V$  de la figura 1.2 se dibuja una isoterma  $T_1$  por debajo de la temperatura crítica  $T_c$  en donde se observa la transición de fase gas-líquido. En el caso de una isobara en el diagrama  $V - T$  se observa la discontinuidad en el volumen durante la transición gas-líquido y líquido-sólido. En el capítulo siguiente se retomará el diagrama  $V - T$  para contrastarlo con la fenomenología de la transición vítrea y la transición líquido-sólido.

El diagrama  $P - T$  se le denomina diagrama de fases para una sustancia pura dado que el potencial químico depende de las variables intensivas  $T$  y  $P$ ,  $\mu = \mu(T, P)$ . En la figura 1.3a se muestra el diagrama de fases del dióxido de carbono que es una sustancia que se contrae al enfriarse como se observa en la pendiente de la coexistencia sólido-líquido, caso contrario para el agua en la cual la curva de coexistencia sólido-líquido tiene una pendiente negativa lo que a su vez permite que el hielo flote y sus ya conocidas implicaciones criobiológicas.

Cualquier punto de la curva que se muestra en la figura 1.3b representa la coexistencia de las fases  $\alpha$  y  $\beta$ , donde se cumple la condición de equilibrio  $\mu^\alpha = \mu^\beta$ . Así, cuando los potenciales químicos son iguales a la misma  $T$  y  $P$ , dado que  $d\mu = -SdT + VdP$  en la curva de coexistencia de las fases  $\alpha$  y  $\beta$  se tiene que,  $d\mu^\alpha = d\mu^\beta$  así,

$$-S^\alpha dT + V^\alpha dP = -S^\beta dT + V^\beta dP \quad (1.1)$$

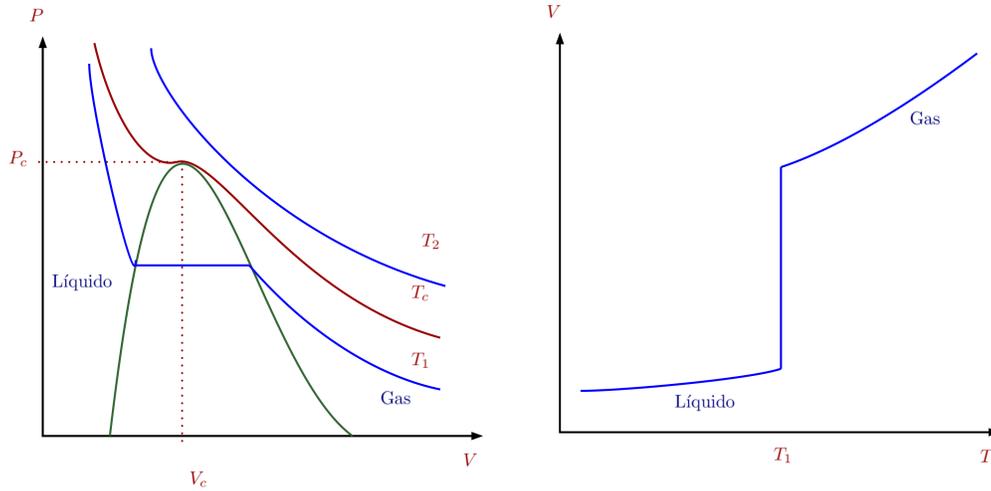


Figura 1.2: Diagramas  $P - V$  (izquierda) y  $V - T$  (derecha) que muestran el proceso de licuefacción y condensación de un gas en los respectivos procesos isotérmico e isobárico [8].

donde  $dT$  y  $dP$  son los cambios infinitesimales en la temperatura y la presión. Así, de la relación 1.1,

$$(V^\alpha - V^\beta)dP = (S^\beta - S^\alpha)dT \quad (1.2)$$

$$\frac{dP}{dT} = \frac{(S^\beta - S^\alpha)}{(V^\alpha - V^\beta)} = \frac{\Delta S}{\Delta V} \quad (1.3)$$

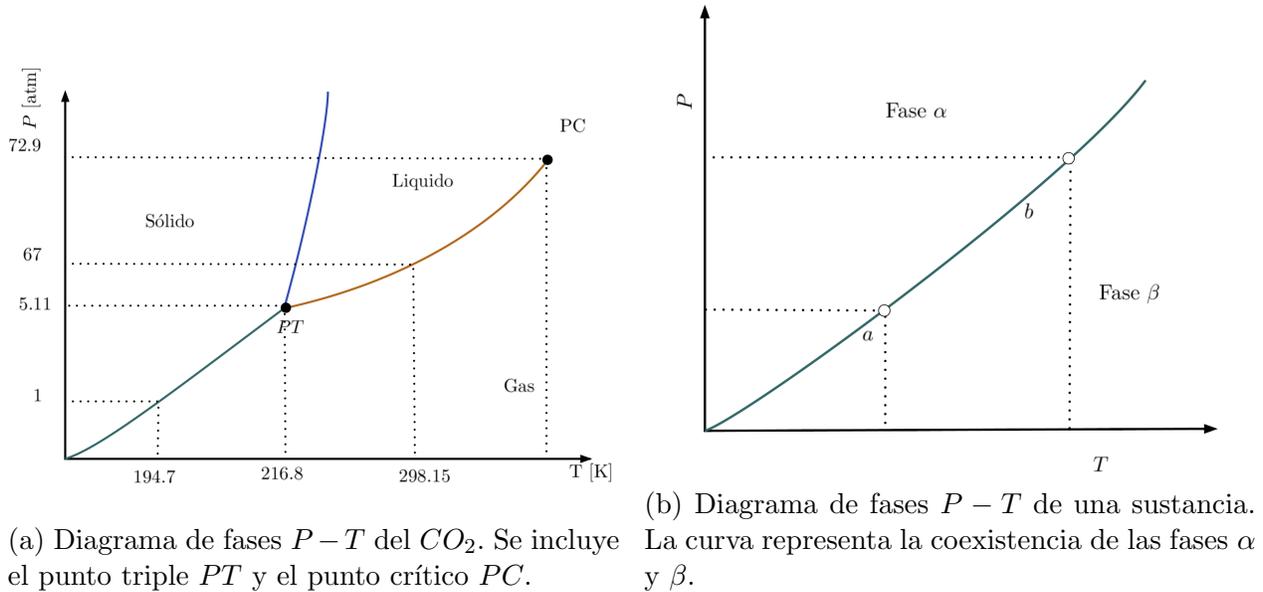
donde  $\Delta S$  y  $\Delta V$  son los cambios de entropía y volumen respectivamente en la transición de fase  $\beta \rightarrow \alpha$ , a esta expresión se le conoce como la ecuación de Clapeyron. Esta ecuación se puede expresar en términos de la entalpía dado que  $\Delta\mu = \Delta H - T\Delta S = 0$  para un cambio de fase de primer orden, para un proceso isotérmico reversible por tanto  $\Delta S = \Delta H/T$ , de donde se obtiene la conocida ecuación de Clausius-Clapeyron,

$$\frac{dP}{dT} = \frac{\Delta H}{T\Delta V} \quad (1.4)$$

Esta expresión describe las condiciones de presión y temperatura de la coexistencia de las fases líquido-gas, gas-sólido, líquido-sólido [6].

El equilibrio de fases entre un gas y un líquido o un sólido, el volumen del gas es mucho mayor que el de cualquiera de las dos fases condensadas a temperaturas menores que la crítica, por lo que para resolver la ecuación de 1.4 se considera que  $V_{gas} - V_{l,s} \approx V_{gas}$  además si se considera que es un gas ideal, se puede obtener explícitamente la ecuación de la curva de coexistencia. La ecuación 1.4 también se puede resolver para los casos reales en los que se considera la no idealidad del gas [9]. En el caso de la curva de equilibrio sólido-líquido se puede hacer una aproximación, dado que el cambio de volumen, entalpía y entropía asociado es muy pequeño comparado con el intervalo de presiones empleado, por tanto el cociente entre estas cantidades se puede aproximar como constante y sólo se tendrá como resultado un cambio en la temperatura.

Así como el agua la podemos encontrar en la naturaleza ya sea en su fase vapor, líquida o como hielo en una de sus fases cristalinas, dadas las condiciones de presión y temperatura,


 Figura 1.3: Diagrama de fases  $P - T$  de una sustancia pura.

todas estas fases son estados de equilibrio de un sistema macroscópico, que tienen la característica de ser homogéneas en sus propiedades físicas y en su composición química. En un sistema termodinámico compuesto de un número  $k$  de especies químicas que lo conforman, se puede determinar el número de fases en equilibrio  $p$  que pueden existir en el sistema a partir de la llamada regla de fases de Gibbs [10],

$$p + f = k + 2 \quad (1.5)$$

donde  $f$  son los grados de libertad del sistema, el número de variables intensivas independientes del sistema. Cuando un sistema se encuentra en un estado de equilibrio termodinámico, la fase también se encuentra en equilibrio. En el caso de sistemas con una sola componente,  $k = 1$ , entonces de acuerdo a la regla de fases,  $p + f = 2$ , así  $p = 2 - f$ ; por tanto, si tenemos dos grados de libertad para un sistema simple podremos tener una sola fase para distintas  $T$  y  $P$ ; si quitamos un grado de libertad tendremos coexistencia de dos fases para distintas presiones  $P$  dada una temperatura, al igual que tendremos coexistencia de dos fases a distintas temperaturas  $T$  a una presión dada. Por último, si quitamos dos grados de libertad tendremos coexistencia de un máximo de tres fases a una cierta temperatura y presión.

En el caso de sistemas binarios, el número de variables intensivas se incrementa, por tanto, si  $k = 2$ , el número de fases en coexistencia está determinado por  $p = 3 - f$ . Dado el número de variables independientes o grados de libertad, para estudiar estos sistemas se suele trabajar en los diagramas  $T - x$  a presión constante o en algunos casos en el diagrama  $P - x$  con  $T$  constante, donde  $x$  es la fracción molar de una de las componentes y  $1 - x$  la fracción molar del compuesto restante [11]. En la siguiente sección se tratará con este tipo de sistemas binarios, en particular las soluciones líquido-sólido eutécticas y no eutécticas.

## 1.2. Transiciones de fases en sistemas de dos componentes

Para describir a las mezclas, es importante determinar la cantidad de las sustancias presentes, ya que todas las propiedades termodinámicas que se deriven dependerá del número de moles de cada especie química en el sistema. Así, la composición de cada una de las especies químicas presentes, puede estar dada por la fracción molar, la concentración molar, la molaridad, la molalidad o en porcentaje en masa [12]. El porcentaje en masa de una especie química  $i$  en la mezcla se expresa como  $(w_i/w_{tot}) \times 100\%$ , donde  $w_i$  es la masa del componente  $i$  y  $w_{tot}$  es la masa total. En este trabajo la composición en las soluciones se expresan como porcentaje en masa pues.

En el marco teórico de la termodinámica la descripción de un sistema multicomponente se estudia mediante el potencial químico, mediante el cálculo de las diferencias entre los potenciales químicos de las sustancias puras y en la mezcla; para lo cual, se elige un estado estándar especificando valores de temperatura y presión, con respecto al cual se calcula la diferencia ante un cambio de estado. A partir de este potencial es posible determinar las demás variables termodinámicas ya que las ecuaciones de estado no son independientes [13]. En el apéndice A.1 se presenta un breve resumen de la teoría de soluciones.

Suponga que un sistema de dos fases  $\alpha$  y  $\beta$  en cierto momento se encuentra fuera de equilibrio, a una cierta temperatura y presión, de la expresión A.23 (ver apéndice A.1), para una sustancia  $i$  se tiene que  $\mu_i^\alpha dn_i^\alpha + \mu_i^\beta dn_i^\beta < 0$  si se supone que para alcanzar el equilibrio  $dn_i$  moles de la sustancia  $i$  fluyen de la fase  $\alpha$  a la fase  $\beta$ ,  $(\mu_i^\beta - \mu_i^\alpha)dn_i < 0$  dado que  $dn_i > 0$ , entonces  $(\mu_i^\beta - \mu_i^\alpha) < 0$ , por tanto  $\mu_i^\beta < \mu_i^\alpha$ , hay un desbalance en el potencial químico, por tanto la sustancia fluirá de la fase  $\alpha$  (con mayor potencial químico) a la fase  $\beta$  hasta que se cumpla con la condición de equilibrio químico A.22,  $\mu_i^\alpha dn_i^\alpha + \mu_i^\beta dn_i^\beta = 0$  pero dado que  $dn_i^\alpha = -dn_i$  y  $dn_i^\beta = dn_i$ , la condición de equilibrio químico será cuando  $\mu_i^\alpha = \mu_i^\beta$ . La materia fluye de manera espontánea de la fase con un potencial químico mayor a uno menor para lograr el equilibrio químico. El potencial químico menor tendrá que incrementarse debido únicamente al flujo de materia de aquella fase con potencial químico mayor dado que  $T$  y  $P$  se encuentran fijas, por tanto el estado de equilibrio se alcanzará debido a los procesos de difusión impulsados por la diferencia de potencial [14]. En cuanto más de aleje el sistema de su equilibrio estable, esto provoca procesos internos que tienden a restaurar a dicho sistema a su estado de equilibrio [15].

La adición de un soluto al solvente a una cierta temperatura y presión disminuye el potencial químico del solvente en la solución, y este cambio en el potencial químico del solvente tiene como consecuencia un cambio en la presión de vapor, la temperatura de ebullición, la congelación así como la presión osmótica, las conocidas propiedades coligativas [11, 15–18]. Dado que el potencial químico es una medida de la tendencia de escape de la sustancia  $i$  de la solución, la disminución de  $\mu_i$  significa que la temperatura de fusión de la solución (curva A de la figura 1.4) es menor que la de la sustancia pura  $i$ . Lo mismo sucede en el caso de la llamada solubilidad <sup>1</sup> (curva B de la figura 1.4). El químico físico

<sup>1</sup>La solubilidad se define como la máxima cantidad de soluto que puede ser disuelta en un solvente, cuando dadas una cierta presión, temperatura y concentración se cumplen las condiciones de equilibrio y estabilidad termodinámicas.

holandés J. H. van't Hoff a finales de la década de 1880 describió el efecto de la variación de la concentración del soluto en una solución diluida, como por ejemplo la presión de vapor, el descenso del punto de congelación, la elevación del punto de ebullición y la presión osmótica.

De todas las variedades de mezclas acuosas binarias inertes se encuentran las soluciones acuosas homogéneas cuyo punto de fusión es inferior al correspondiente a cada uno de sus componentes formando una mezcla binaria eutéctica. Esta definición fue proporcionada por Guthrie a través de la palabra griega “eutaxia” que significa “fácil fusión” [19].

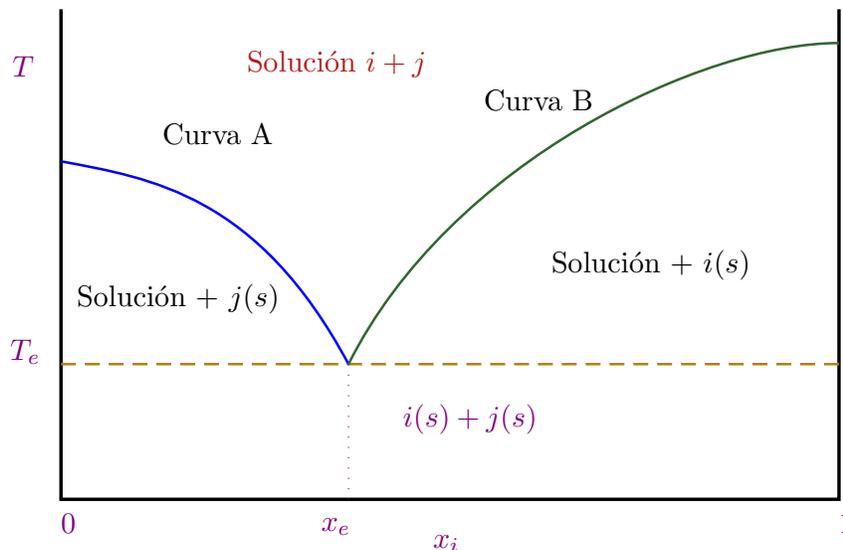


Figura 1.4: Diagrama eutéctico simple. Las curvas A y B se encuentran en el punto eutéctico  $(T_e, x_e)$ . Por debajo de estas curvas se tendrá coexistencia de dos fases la solución líquida  $i + j$  y el soluto  $i$  o  $j$  dependiendo de la composición ya sea para composiciones menores o mayores a  $x_e$ . Por debajo de la  $T_e$  para toda composición sólo se tendrá la mezcla sólida  $i + j$ .

En los sistemas binarios sólido-líquido dentro de todas las combinaciones posibles, se tendrá el caso donde tanto la fase líquida como la sólida son miscibles<sup>ii</sup> y el caso donde sólo la fase líquida es miscible y la sólida inmisible. El conocido diagrama eutéctico simple pertenece al segundo caso. Como se observa en la figura 1.4 donde dadas las sustancias  $i$  y  $j$  son miscibles en la fase líquida  $i + j$  pero son inmiscibles en la fase sólida a cierta  $T$  y  $x_i$  a  $P$  constante. Por tanto, al enfriar una solución líquida de  $i + j$  se producirá ya sea  $i$  o  $j$  puro que se precipita de la solución, y sólo a  $T, x_i, P$  se precipitarán conjuntamente las fases sólidas  $i$  y  $j$  [6]. Una solución de naftaleno y benceno es un ejemplo de este tipo de diagrama eutéctico simple sin formación de compuestos en todo el intervalo de concentraciones [5].

En la figura 1.5 se presenta el diagrama de fases del agua y  $NaCl$  que cuenta con un punto eutéctico a una concentración del 23.3% y a una temperatura de  $252.05K$ , a mayores concentraciones este diagrama muestra formación de compuestos y situaciones más complejas que no abordaremos en este trabajo. Cuando se añaden cristales de  $NaCl$  al agua

<sup>ii</sup>La miscibilidad es la propiedad de que dos sustancias al mezclarse en todas las proporciones, forman una mezcla homogénea. En caso contrario, se dice que las sustancias son inmiscibles.

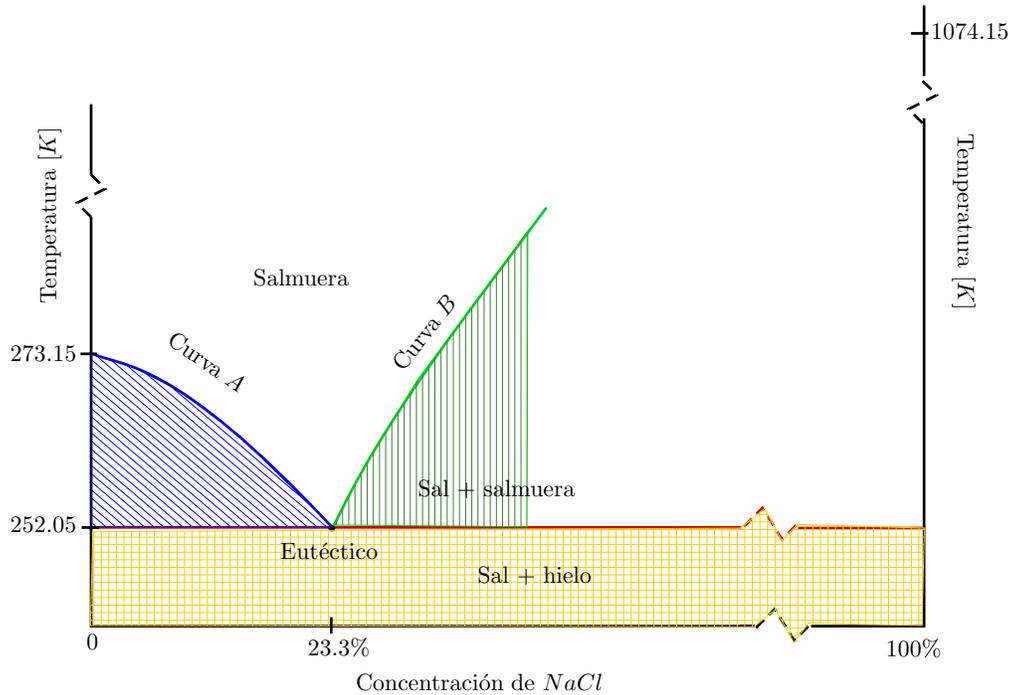


Figura 1.5: Diagrama de fases eutéctico de la mezcla  $NaCl - H_2O$ . Este diagrama de fases muestra la composición y las temperaturas cercanas al punto eutéctico donde coexisten la solución líquida y la sólida [20]

y el sistema permanece a una cierta temperatura y presión el sistema buscará el equilibrio químico entre las fases cumpliendo con los criterios de equilibrio y estabilidad; por tanto los cristales de sal se disolverán en el agua pasando de un potencial químico mayor en su estado sólido a uno menor en solución acuosa, de esta manera conforme los cristales de sal se disuelven en el agua el potencial químico de la solución acuosa aumenta hasta que alcanza el equilibrio químico cuando  $\mu_{NaCl}^{sólida} = \mu_{NaCl}^{acuosa}$ . Cuando se cumpla esta condición, ya no se disolverá más sal en el agua y la solución se encuentra saturada. Desde hace más de un siglo, se han desarrollado modelos matemáticos y técnicas computacionales para predecir la descripción de equilibrio termodinámico de los diagramas eutécticos. Uno de los más estudiados es el de la mezcla acuosa de cloruro de sodio debido a sus múltiples aplicaciones, en particular a sus aplicaciones geofísicas en diferentes cuerpos de agua tales como el agua de mar.

La curva de solubilidad, definida mediante una sucesión de estados de equilibrio puede describirse en función de la temperatura y presión, pero generalmente se suele considerar el efecto de la presión como despreciable para la mayoría de los casos de interés. Experimentalmente esta curva puede determinarse por calorimetría ya que el sistema absorbe o libera calor llegado el estado de saturación, sea el caso en el que el soluto se precipita o se disuelva [21]. Teóricamente una de las expresiones más utilizadas para determinar la curva de solubilidad es mediante un ajuste polinomial  $c = A + BT + CT^2 + \dots$ , donde  $A$ ,  $B$  y  $C$  son los coeficientes del polinomio cuadrático y donde la composición de la solución  $c$  es función de la temperatura  $T$ . Además de esta, se han propuesto otras expresiones logarítmicas semi empíricas basadas en termodinámica de equilibrio de fases. En el caso de las soluciones ideales, la curva de

solubilidad se puede predecir por la ecuación de van't Hoff

$$\ln(x) = \frac{\Delta H_f}{R} \left[ \frac{1}{T_f} - \frac{1}{T} \right] \quad (1.6)$$

donde  $x$  es la fracción molar del soluto en la solución,  $T$  es la temperatura,  $T_f$  y  $\Delta H_f$  son la temperatura de fusión y la entalpía de fusión del soluto respectivamente. Sin embargo, la mayoría de las soluciones no se comportan idealmente, por lo que esta expresión no es válida.

Las soluciones no ideales, son aquellas que no se describen por las ecuaciones ideales y que se demarcan por una notable desviación del comportamiento ideal debido a las interacciones entre las moléculas. Los coeficientes de actividad se introducen para cuantificar las desviaciones del comportamiento ideal. Existen métodos teóricos y experimentales para determinar las actividades y los coeficientes de actividad en los sistemas no ideales lo que permite determinar las demás propiedades termodinámicas de la solución así como describir las transiciones de fase. Una manera de determinar los coeficientes de actividad es a partir del equilibrio de fases, generalmente a partir de mediciones experimentales de la presión de vapor de los componentes en la solución. La condición para el equilibrio de fases entre una solución y su vapor es cuando para cada especie  $i$ , el potencial químico en la solución debe ser igual al potencial químico  $i$  en la fase de vapor, es decir cuando  $\mu_i^{sol} = \mu_i^{vap}$ . Se asume que el vapor está en equilibrio con la solución y se comporta como una mezcla de gases ideales. En el caso de la solución de un sólido en un líquido, la presión parcial de vapor del soluto sobre la solución es difícil de medir debido a que es muy pequeña, por lo que no es útil para determinar el coeficiente de actividad y se determina de forma indirecta mediante la relación termodinámica de Gibbs-Duhem y la presión parcial del solvente.

En la tabla 1.1 se muestran algunos coeficientes de actividad para soluciones acuosas de sacarosa a una temperatura de 25°C que son calculados indirectamente. Debido al gran tamaño de las moléculas de sacarosa comparadas con las de agua, a pesar de que podría considerarse bastante diluida la solución con una concentración de solo 0.1 de  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , hay una cercanía entre las moléculas del soluto, por lo que la desviación de la idealidad donde  $\gamma = 1$  es considerable. A partir de los valores mostrados en la tabla  $\gamma^{H_2O} < 1$  y  $\gamma^{C_{12}H_{22}O_{11}} > 1$ , se infiere que las interacciones entre agua y sacarosa son más favorables que sacarosa-sacarosa a la temperatura y concentraciones dadas.

$x (H_2O)$	0.999	0.995	0.980	0.960	0.930	0.900
$\gamma (H_2O)$	1.000	0.999	0.999	0.990	0.968	0.939
$\gamma (C_{12}H_{22}O_{11})$	1.009	1.047	1.231	1.580	2.310	3.230

Cuadro 1.1: Coeficientes de actividad para soluciones acuosas de sacarosa a una temperatura de 25C. [22]

Otros métodos utilizados para determinar los coeficientes de actividad son otras propiedades de equilibrio como los puntos de congelación. En muchos casos este coeficiente puede ser aproximado por ajustes polinomiales de los datos experimentales y también mediante modelos físico estadísticos. A partir de analizar los coeficientes de los polinomios

para distintas soluciones binarias. En 1920, J. Hildebrand propuso expresiones empíricas dependiente de la temperatura [23].

Se han desarrollado otros modelos de correlación entre las propiedades termodinámicas considerando a una molécula como un agregado de grupos funcionales<sup>III</sup>, y en particular se han utilizado para determinar los coeficientes de actividad de las mezclas no ideales para las cuales los datos experimentales son escasos o inexistentes, estos métodos llamados de 'contribución de grupos' se introdujeron a inicios de los 60's [24, 25]. Cualquier método de contribución de grupos, se basa en que de los tantos compuestos químicos de interés, el número de grupos funcionales que constituyen estos compuestos es mucho menor. Por lo que, si se asume que las propiedades de los sistemas es la suma de las contribuciones realizadas por los grupos funcionales de la molécula, es posible estimar algunas propiedades del sistema a partir de un número reducido de parámetros (funcionales), que si se considera todas las contribuciones de grupos individuales. Cualquier método de contribución de grupos es una aproximación.

Durante la segunda década del siglo XX, Pitzer y varios colaboradores [26–32] desarrollaron varios estudios para cada una de las regiones del diagrama a partir de desarrollos en términos de coeficientes del virial para la ecuación de estado de la mezcla a través de la cuál calcularon diferentes funciones termodinámicas y compararon sus resultados con datos experimentales.

---

<sup>III</sup>Los grupos funcionales son agrupaciones específicas de átomos dentro de las moléculas. Algunos ejemplos de grupos funcionales son los alcoholes, alquenos, alquinos, aminas, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, ésteres y éteres, entre otros.



---

## TRANSICIONES CINÉTICAS: LA TRANSICIÓN VÍTREA EN LÍQUIDOS SIMPLES SOBREENFRIADOS

---

Uno de los retos más importantes dentro del estudio de la materia condensada blanda se refiere a la fundamentación física del fenómeno de la transición vítrea. Desde hace más de un siglo se ha tratado de establecer la descripción de esta transición cinética a través de los procesos de relajamiento que se llevan a cabo dentro de un líquido sobre enfriado en su ruta hacia la formación de un vidrio. Cabe resaltar que, a diferencia de las transiciones de fase termodinámicas que sufre un líquido a través de una sucesión de estados de equilibrio, una transición cinética es aquella para la cual los cambios temporales de las variables medibles son comparables con los tiempos de relajación del sistema, en este caso en el líquido sobre enfriado.

El siglo XVII fue reconocido como el comienzo del desarrollo moderno de la cristalografía. Se descubrieron cristales con diferentes formas de diferentes sustancias como sales y azúcares, incluido el descubrimiento de la característica forma hexagonal de los copos de hielo [33]. Son muchas las variables asociadas al proceso de nucleación y crecimiento de los cristales a partir del líquido, como la preparación y el tamaño de la muestra así como la velocidad de enfriamiento entre otras [12]. El grado o la capacidad de cristalización de una sustancia está asociada con el grado de sobreenfriamiento, esto es, cuanto más se logre mantener la fase líquida de una sustancia por debajo de su temperatura de fusión significa que su grado de sobreenfriamiento es más grande y por tanto tanto su grado de cristalización es bajo. El caso contrario, un grado de cristalización alto, significa que el líquido no permanecerá por mucho tiempo sobreenfriado, promoviendo la cristalización rápidamente como sucede para el agua.

Las mediciones de las presiones de vapor del agua y el comportamiento de la densidad y el coeficiente de expansión térmico a bajas temperaturas incluídas aquellas por debajo de su temperatura de cristalización a principios del siglo XIX ampliaron los estudios de los líquidos sobreenfriados incluyendo el el agua [34]. Fue a finales del siglo XIX cuando G. Tammann escribió sobre la posibilidad de evitar la cristalización de distintas sustancias mediante un proceso de enfriamiento rápido [35], obteniendo en su lugar un vidrio. En casos extremos, este enfriamiento debe ser tan grande del orden de  $10^6$  K/s (caso del agua) [36]. Se ha estimado en simulaciones computacionales que líquidos como el argón necesitarían un enfriamiento de  $10^{12}$  K/s [37]

Los primeros estudios realizados sobre esta dependencia fue realizado por G. Tammann, quien investigo hasta 140 sustancias diferentes [35]. También formuló los criterios a tomar en cuenta en los que el enfriamiento de un fluido conduce a un vidrio o a un cristal. Tammann, también realizó estudios sobre las características del proceso de cristalización como lo son la nucleación y el crecimiento de los cristales del líquido enfriando. De acuerdo a sus conclusiones estos procesos están determinados por la viscosidad del fluido.

Para el estudio de este capítulo, se definen distintos conceptos como el líquido sobreenfriado y el vidrio, así como su caracterización por medio de la viscosidad con el fin de exponer la transición vítrea que toma lugar en el proceso de enfriamiento. Se explica su carácter cinético a diferencia de las transiciones de fase termodinámicas expuestas en el capítulo anterior.

## 2.1. El líquido sobreenfriado y la transición vítrea

Cuando un líquido se enfría por debajo de su temperatura de fusión  $T_m$ , en el caso de una sustancia pura si este proceso se realiza de forma cuasiestática, de la fase líquida se formará un sólido cristalino pasando así por una transición de fase termodinámica líquida  $\leftarrow$  sólida descrita en la sección 1. Sin embargo, cuando el proceso de enfriamiento es lo suficientemente 'rápido', no cuasiestático es posible inhibir el proceso de cristalización en  $T_m$  y mantener la fase líquida por debajo de esta temperatura. Los líquidos que pueden enfriarse por debajo de su temperatura de fusión se les conoce como líquidos sobreenfriados ya que se encuentra en un estado fuera de equilibrio termodinámico.

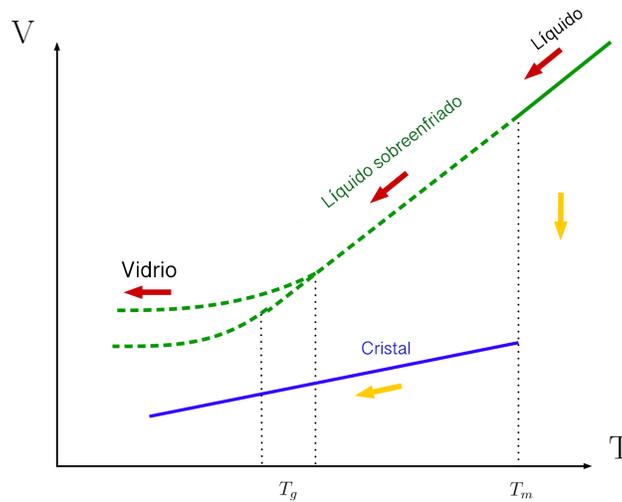


Figura 2.1: Diagrama  $V - T$  que muestra el cambio de volumen durante el enfriamiento de un líquido.

Si la temperatura del líquido sobreenfriado continúa disminuyendo, la viscosidad de este líquido sobreenfriado aumentará de tal forma que a una cierta temperatura  $T_g$ , este coeficiente alcanzará un valor de  $\sim 10^{13}$  Poise, donde dicho líquido queda atrapado en una configuración determinada, es decir, forma un vidrio. A esta temperatura donde sucede esta 'transición cinética' se le conoce como la temperatura de transición vítrea  $T_g$  la temperatura de transición vítrea  $T_g$  no es única ya que depende de la razón de enfriamiento [38, 39], sin embargo, este intervalo de temperaturas está muy bien caracterizado y definido [40]. En la figura 2.1 se describe gráficamente el comportamiento del volumen como función de la temperatura para los dos procesos de enfriamiento mencionados.

### 2.1.1. La temperatura de transición vítrea

Una de las técnicas experimentales más utilizadas para determinar  $T_g$  es mediante calorimetría diferencial de barrido o DSC como se observa en la figura 1.1, usualmente la razón de enfriamiento experimental es dentro de un intervalo de 1 – 10 K/s. A pesar de que teóricamente cualquier sustancia puede vitrificarse, tanto sustancias puras como mezclas [41], un buen líquido formador de vidrio es aquel que se sobreenfría fácilmente dentro de este intervalo de velocidades de enfriamiento [42]. Los polímeros, azúcares y en general los llamados polihidroxicompuestos son buenos formadores de vidrio que se relaciona con su estructura molecular compleja. La tendencia de una sustancia a cristalizar está relacionada con una alta simetría molecular y grandes momentos dipolares [43]. Los azúcares son buenos formadores de vidrio porque tienen características opuestas.

A lo largo de los años, se han estudiado experimentalmente diferentes tipos de vidrios. Dependiendo del área de interés, se ha investigado materiales metálicos, principalmente silicatos de sosa y óxidos de boro, así como orgánicos, incluyendo diferentes tipos de carbohidratos y polímeros [44–46]. Muchos de estos materiales se han empleado en distintas industrias como la farmacéutica en el desarrollo de medicamentos como por ejemplo la aspirina [47] y el llamado bioglass [48].

En 1912 gracias a las tecnologías de enfriamiento el intervalo de temperatura del agua sobreenfriada disminuyó de los 273K hasta los 260K, es decir, hasta 13 grados por debajo del congelamiento [49] sin embargo el estudio de las propiedades del agua sobreenfriada son muy difíciles dado que el agua cristaliza fácilmente ante una fluctuación muy pequeña [50]. Para vitrificar el agua se requieren velocidades de enfriamiento extremadamente grandes [36], lo que se conoce en inglés como 'hyperquench', y aún así sólo sería posible obtener agua vítrea en porciones muy pequeñas, gotas micrométricas de agua dado su gran momento dipolar y su alta simetría molecular haciendo casi imposible la cristalización [51], en años recientes este procedimiento ha tenido mejoras considerables. Actualmente existen varios procedimientos para la obtención de agua vítrea en laboratorios [52]. Sin embargo, la discusión en torno a la temperatura de transición vítrea del agua sigue abierta debido a las dificultades de su medición.

Posiblemente, la primera observación de agua sobreenfriada fue realizada en 1724 por D. Fahrenheit [53]. Quién en sus muy extendidas bitácoras de trabajo, reportó después de dudar un poco sobre los resultados, lo que parecía a simple vista un tono opaco en sus muestras, lo que significaría la nula formación de hielo en las condiciones que él ya había reconocido debería hacerlo, pero no se aventuró como él lo describe, a sacar una conclusión sobre sus observaciones. La primera vez que se obtuvo agua vítrea en el laboratorio fue mediante la deposición de vapor; método propuesto en 1933 E. W. Wasburn y obtenido experimentalmente dos años después por Burton y Oliver [54,55]. En este trabajo observaron la existencia de un temperatura por debajo de la cual el agua permanece vítrea, el valor estimado fue de 163K. En 1987, casi cincuenta años después de este hecho, el valor reportado por calorimetría fue de 136K [56]. En 2001 V. Velikov et al reportaron una temperatura de 165 K [57]. En un trabajo de investigación muy reciente de P. Lucas et al después de un análisis exhaustivo sugiere que  $T_g$  del agua debe ser superior al valor generalmente tomada de 136K [58].

Otra manera de obtener agua vítrea es de forma indirecta, esto es utilizando una solución vitrificadora y estimar mediante algún ajuste el valor de la transición vítrea del agua, este procedimiento lo implementó A. Angell en 1995 [42] con la ayuda de una mezcla acuosa de nitrato de calcio usando la ecuación de E. Jenckel y H. Heusch (JH) propuesta en 1953 [59]. En los capítulos subsiguientes se explora la temperatura de transición vítrea de las mezclas y la dependencia con la concentración.

### 2.1.2. La viscosidad en un líquido sobreenfriado simple

El proceso de vitrificación un líquido se caracteriza por una disminución simultánea de la entropía, la capacidad calorífica y por el gran aumento de la viscosidad conforme se aproxima a  $T_g$ . El análisis de los procesos de relajación La descripción física de los procesos de relajación, introducidos por Glasstone, Laidler y Eyring [60] como rate processes” (procesos de tasa de cambio), incluyen a la electroquímica, la descripción temporal de las reacciones químicas y a los fluidos viscosos centrados dentro de la termodinámica fuera de equilibrio. Una de las propiedades más importantes utilizadas para describir la fenomenología hacia la transición vítrea es el comportamiento de la viscosidad de un líquidos sobreenfriado a acercarse a la región de la transición vítrea [61–63].

Un tiempo de relajación es aquella escala de tiempo característica, en la que un sistema se relaja o regresa desde un estado perturbado hasta llegar a un estado de equilibrio. Este tiempo de restauración, representa el tiempo que tardan ciertas propiedades o procesos dentro del sistema en alcanzar un estado estable o regresar a su estado de equilibrio del cual fueron apartados. Por tanto la relajación depende de la temperatura, presión y las características propias del sistema.

La relajación de un parámetro físico  $\sigma$ , puede describirse como

$$\sigma(t) = \sigma_\infty + \sigma_0\phi(t) \tag{2.1}$$

donde  $\sigma_\infty$  y  $\sigma_0$  son constantes y  $\phi(t)$  es la función de relajación normalizada [64]. Una función de relajación  $\phi(t)$  es aquella que describe el comportamiento de un sistema cuando vuelve al equilibrio después de haber sido perturbado o sometido a un estímulo externo [65]. En

muchos casos, la función de relajación puede seguir un comportamiento Arrhenius<sup>iv</sup> [68],

$$\sigma(t) = A \exp\left(-\frac{t}{\mathcal{T}}\right) \quad (2.3)$$

donde  $A$  es una constante y  $\mathcal{T}$  es el tiempo de relajación. Este parámetro determina la razón de decaimiento o incremento de la función de relajación,

$$\frac{d\sigma}{dt} = -\frac{1}{\mathcal{T}}(\sigma(t) - \sigma_\infty) \quad (2.4)$$

Existen diferentes pruebas dieléctricas o calorimétricas, para estudiar el comportamiento dinámico experimental de diferentes tipos de líquidos. Dentro de las muchas técnicas experimentales para medir el tiempo de relajación en los líquidos sobreenfriados las más comunes son: el Análisis Mecánico Dinámico (DMA) mediante una deformación oscilatoria, la espectroscopia dieléctrica que mide la respuesta eléctrica de un material a un campo eléctrico aplicado a diferentes frecuencias, la Resonancia magnética nuclear (NMR) mediante el comportamiento de los espines nucleares, la espectroscopia de fluorescencia mediante el monitoreo de la disminución de la intensidad de la fluorescencia o por reología mediante el estudio de flujos y deformaciones del material. La técnica experimental a utilizar dependerá del sistema bajo estudio y su sensibilidad ante perturbaciones externas.

Los líquidos sobreenfriados se caracterizan por responder ante diversas perturbaciones de manera no exponencial [69]. En estos casos, se utiliza una función denominada *función de autocorrelación temporal normalizada* para describir la relación entre dos variables fluctuantes. Esta función se conoce como función exponencial extendida de Kohlrausch-Williams-Watts (KWW) [70, 71],

$$\phi(t) = \exp\left[-\left(\frac{t}{\mathcal{T}}\right)^\beta\right] \quad (2.5)$$

donde  $\phi(t = 0) = \phi_1$  y  $0 < \beta \leq 1$ . Esta función empírica fue aplicada inicialmente por R. Kohlrausch [70] y posteriormente por su hijo [72] en problemas en sistemas diferentes. Williams y Watts ampliaron su aplicabilidad en polímeros [71, 73]. Esta relación es muy utilizada debido a que en el dominio temporal, solo hay dos parámetros de ajuste: el exponente  $\beta$  y el tiempo de relajación  $\mathcal{T}$ . Para tiempos cortos ( $t < \mathcal{T}$ ) y o largos ( $t > \mathcal{T}$ ), más allá de del intervalo de estudio se tendrán desviaciones de la forma KWW [74].

En el caso de los líquidos sobreenfriados simples, los resultados experimentales determinan

---

<sup>iv</sup>S. Arrhenius, en 1889 presentó una relación entre la velocidad de reacción como función de la temperatura, para la conversión química de la sacarosa en solución de fructosa y glucosa por medio de ácidos [66],  $\ln[k(T)] = \ln A - (E_a/RT)$ , donde la constante  $E_a$  la energía requerida para convertir la sustancia reactiva en la forma activa. La ecuación de Arrhenius fue reescrita en su forma equivalente como [67],

$$k(T) = A \exp(-E_a/RT) \quad (2.2)$$

esta expresión describe la dependencia de las rapidezces de reacción con la temperatura de distintas reacciones químicas así como la dependencia con la temperatura de ciertos procesos de transporte como se muestra en la figura 2.2, en algunos casos en un intervalo no muy grande de temperaturas,  $A$  y  $E_a$  pueden tomarse como constantes por lo que estos casos la representación gráfica exponencial tipo Arrhenius  $\ln(k)$  vs  $(1/T)$  es usada ampliamente [10].

que el tiempo de relajación depende de la temperatura y puede estar relacionado con la viscosidad de corte del sistema [75],

$$\eta \sim G\mathcal{T} \quad (2.6)$$

donde  $G$  es el módulo de corte. Así, cuando el tiempo de relajación, se ralentiza con la disminución de la temperatura tal que supera la escala de tiempo experimental más larga, típicamente de  $\sim 100s$ , es cuando se forma un sólido no cristalino fuera de equilibrio termodinámico: un vidrio [43]. Este incremento en el tiempo de relajación corresponde a un aumento en la viscosidad  $\eta$  que en la transición vítrea corresponde a una viscosidad de  $10^{12}$  *Pas*.

Para estudiar las propiedades físicas de los coeficientes de transporte, será mediante el Factor de Desplazamiento Logarítmico (LSF) [76],

$$LSF = \log(a_T) = \log \frac{\eta(T)}{\eta(T_s)} = \log \frac{\mathcal{T}(T)}{\mathcal{T}(T_s)} \quad (2.7)$$

con  $T_s$  una temperatura de referencia.

La descripción de los procesos de relajación en líquidos sobreenfriados simples comenzó a ser formulada desde la década de los años veinte del siglo pasado para diversas sustancias. Una de las primeras expresiones para expresar al el tiempo de relajación como función de la temperatura para este tipo de líquidos en la vecindad de  $T_g$ , fue formulada empíricamente por H. Vogel en 1921 [77], esta relación matemática tiempo después fue empleada por G. Tammann y G. Hesse [78, 79]. G. S. Fulcher presentó esta ecuación empírica para silicatos de forma independiente, en este trabajo analizó la expresión cambiando el porcentaje de  $NaO_2$  [80]. A esta expresión se le conoce como la ecuación de Vogel-Fulcher-Tammann (VFT),

$$\log(a_T) = A - \frac{B}{T - T_0} \quad (2.8)$$

con  $T_0$  una temperatura de referencia, denominada isentrópica, término que retomaremos más adelante,  $A$  y  $B$  parámetros constantes ajustables [81].

En 1955, por su parte, M.L. Williams, R.F. Landel y J.D. Ferry [76] presentaron una ecuación alternativa para el LSF de un líquido sobreenfriado frágil. La ecuación WLF considera una temperatura de refencia  $T_s$ , y dos parámetros  $C_1$  y  $C_2$ ,

$$LSF = \log \left( \frac{\eta(T)}{\eta(T_s)} \right) = \frac{-C_1(T - T_s)}{C_2 + T - T_s} \quad (2.9)$$

Los parámetros,  $C_1$  y  $C_2$  inicialmente fueron considerados como valores constantes para distintos formadores de vidrios, sin embargo, conforme esta ecuación se estudió en otras sustancias se determinó que es realidad son parámetros variables ajustables para cada sustancia. las dos expresiones descritas previamente 2.9 y 2.8 son válidas en el regimen sobreenfriado y predicen para la viscosidad en la vecindad de  $T_g$  un valor de  $10^{13}$  Poise.

A. Angell, uno de los más destacados investigadores de tiempos recientes en los procesos de relajación y transición vítrea, propuso una clasificación de los líquidos sobreenfriados en términos del comportamiento de su viscosidad con la temperatura, en fuertes y frágiles [84].

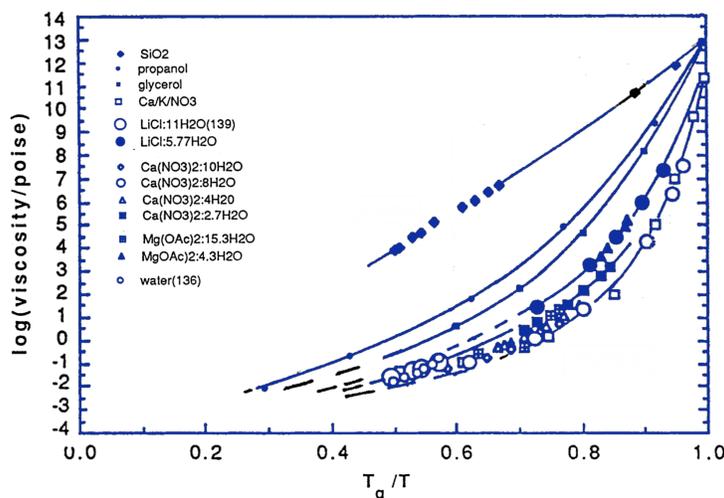


Figura 2.2: Clasificación de vidrios fuertes y frágiles [82, 83].

Una anécdota de C. Alba-Simionesco [85] cuenta como en el laboratorio de A. Angell ubicado en el sótano del Edificio de Química de la Universidad de Purdue en Arizona, un gran equipo de estudiantes y posdoctorados proporcionó de información experimental para que Angell formulara el concepto de fragilidad en 1985 [86]. El concepto de fragilidad fue un intento de describir la dinámica involucrada en líquidos sobreenfriados y caracterizar la razón de cambio de los coeficientes de transporte hacia la temperatura de transición vítrea. Años después este concepto fue formalmente propuesto [87, 88]. En la figura 2.2 se muestra esta clasificación [82], los vidrios fuertes son aquellos cuya viscosidad  $\eta(T)$  exhibe una dependencia exponencial tipo Arrhenius. Por su parte los líquidos sobreenfriados frágiles no se describen mediante una relación tipo Arrhenius, por lo que se han formulado distintas teorías y formulaciones matemáticas que describan este comportamiento.

El primer modelo físico estadístico para un líquido sobreenfriado fue propuesto por Walter Kauzmann en 1948 en el cuál asocia el aumento de la viscosidad y de los tiempos de relajamiento del mismo con las propiedades calorimétricas del sistema, esencialmente de la entropía, y propone que los únicos grados de libertad que contribuyen son los configuracionales. Para evitar que la entropía del líquido sea mayor que la del cristal a temperaturas cada vez más bajas, propuso una temperatura, la temperatura de Kauzmann  $T_K$  para la cuál la entropía configuracional se hace cero.

A partir de la evidencias acerca del aumento en la viscosidad del líquido al ir disminuyendo la temperatura, los movimientos moleculares deben tornarse cada vez más lentos, en 1965 G. Adam y J. H Gibbs [89] presentaron un nuevo modelo físico estadístico para un líquido sobreenfriado, suponiendo que solamente mantiene grados de libertad configuracionales, a través del cuál establecen una relación matemática entre el tiempo de relajamiento y la entropía configuracional del sistema. Es importante subrayar que el modelo de Adam Gibbs (AG) permanece como el modelo físico estadístico para la descripción de formadores de vidrio referente a partir del cuál se han propuesto algunos cambios sin perder sus consideraciones

físicas básicas.

A partir del conjunto representativo isobárico isotérmico, dividen al líquido en  $N$  subsistemas integrados por  $z$  moléculas que cuentan exclusivamente con grados de libertad configuracionales. Para algunos de estos conjuntos,  $n$ , las moléculas que los forman pueden rearrreglarse generando una nueva configuración si reciben una fluctuación de energía suficiente. Estos conjuntos se conocen como regiones de rearrreglos cooperativos (CRR). AG propone que los tiempos de relajamiento de las moléculas están relacionados con la probabilidad de que existan estos rearrreglos cooperativos. En el apéndice A.2 se desarrolla brevemente este modelo teórico.

Utilizando el modelo de Adam-Gibbs y el trabajo de Di Marzio y Dowell [89] basado en el modelo de Gibbs-Di Marzio [90] para la transición vítrea de sustancias poliméricas, con

$$\Delta C_P = A \frac{1}{T^2} + BT - CT^2 \quad (2.10)$$

donde  $A$ ,  $B$  y  $C$  son constantes que dependen del líquido, P. Goldstein y colaboradores en 1993 [91] encontraron una forma lineal teórica para el factor logarítmico  $LSF$  dada en términos de la variable reducida  $\left(\frac{T_s}{T}\right)^2$  dada por,

$$LSF = m \left(\frac{T_s}{T}\right)^2 + b(T_s) \quad (2.11)$$

donde  $T_s$  es un valor de referencia, con  $m$  la pendiente de una recta y  $b$  la ordenada al origen, ambas constantes dependen de la naturaleza de la sustancia. Esta expresión es equivalente a las ecuaciones WLF y VFT. Después de emplear esta expresión en distintos líquidos sobreenfriados frágiles, incluyendo polímeros, polioles y varias mieles de diferentes zonas geográficas considerando la temperatura de referencia  $T_s = T_g$ , y usando gráficos maestros se mostró que la ecuación 2.11 describe una ley de estados correspondientes que representa un comportamiento universal para describir la viscosidad de todas estas sustancias [92, 93] como se observa en la figura 2.3. De este modo dada la temperatura de transición vítrea  $T_g$  para cada sustancia descrita, la viscosidad en el líquido sobreenfriado simple se expresa como

$$LSF = \log \left(\frac{\eta(T)}{\eta(T_g)}\right) = m \left(\frac{T_g}{T}\right)^2 + b(T_g) \quad (2.12)$$

Al dibujar la gráfica de la ecuación 2.12 para diferentes líquidos sobreenfriados se obtienen rectas que comparten el mismo valor en la pendiente  $m$ , solo separadas por un factor  $c$ . Por esta razón se introduce una nueva temperatura de referencia  $T_b$ , así

$$\log \left(\frac{\eta(T)}{\eta(T_b)}\right) = LSF + c = \log \left(\frac{\eta(T)}{\eta(T_g)}\right) + c = m \left(\frac{T_g}{T}\right)^2 + b(T_g) + c \quad (2.13)$$

dado que

$$\log \left(\frac{\eta(T)}{\eta(T_g)}\right) = \log \eta(T) - \log \eta(T_g) + \log \eta(T_g) - \log \eta(T_b) \quad (2.14)$$

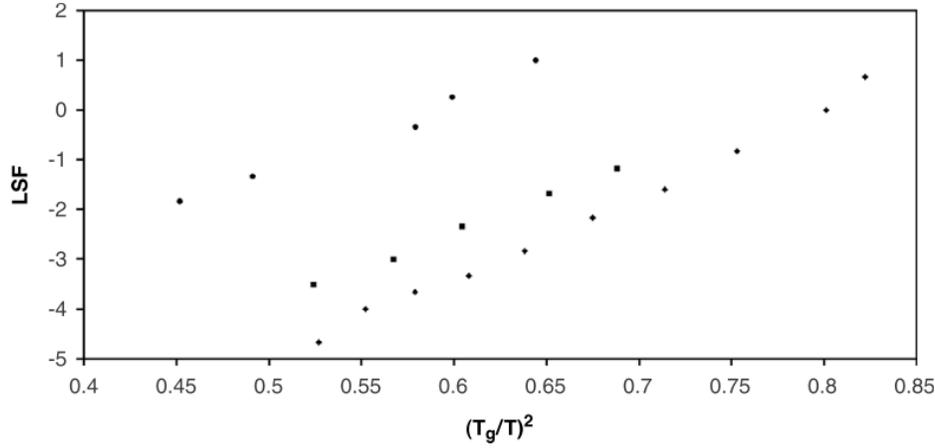


Figura 2.3: Gráfica de LSF vs.  $(T_g/T)^2$  para los líquidos sobreenfriados: PIB( $\circ$ ), PVAc( $\blacksquare$ ) y PS ( $\blacklozenge$ ) para temperaturas dentro del intervalo  $T_m < T < T_c$  donde  $T_m$  y  $T_c$  son la temperatura de fusión y de entrecruzamiento respectivamente. Figura tomada de [93].

se tiene que el factor  $c$  está dado por,

$$c = \log \frac{\eta(T_g)}{\eta(T_b)} \quad (2.15)$$

entonces,

$$\log \left( \frac{\eta(T_b)}{\eta(T_g)} \right) = m \left( \frac{T_g}{T_b} \right)^2 + b(T_g) = -c \quad (2.16)$$

finalmente mediante las ecuaciones 2.15 y 2.16, se puede determinar la temperatura de referencia  $T_b$  en términos de la temperatura de transición vítrea del líquido  $T_g$ ,

$$T_b = T_g \left( \sqrt{\frac{-c + b(T_g)}{m}} \right)^{-1} = f T_g \quad (2.17)$$

Al evaluar este factor  $f$  con los ajustes para cada líquido sobreenfriado, A. Andraca y colaboradores determinaron además que  $T_b = f T_g \sim T_c$ . Mediante un escalamiento con la variable  $(T_g/T)^2$  se establece una curva maestra como se observa en la figura 2.4. El análisis de la viscosidad por medio de  $T_g$  como la temperatura de referencia, permite a los investigadores establecer una ley de estados correspondientes [94], como se mostró en el trabajo descrito, así el comportamiento de las viscosidades de distintas sustancias sobreenfriadas pueden ser descritas en un gráfico único (*master plot*).

El principio de los estados correspondientes fue propuesto por Van der Waals en 1873 y permite establecer una única expresión matemática que describa la dependencia entre las variables de sistemas termodinámicos de distinta índole por medio de variables reducidas [95], lo cual resulta útil ya que permite predecir una fenomenología generalizada y particularizar para un sistema de interés cuando se requiera partiendo de una base común [96]. Este principio se aplica para describir a sistemas que se encuentren tanto en

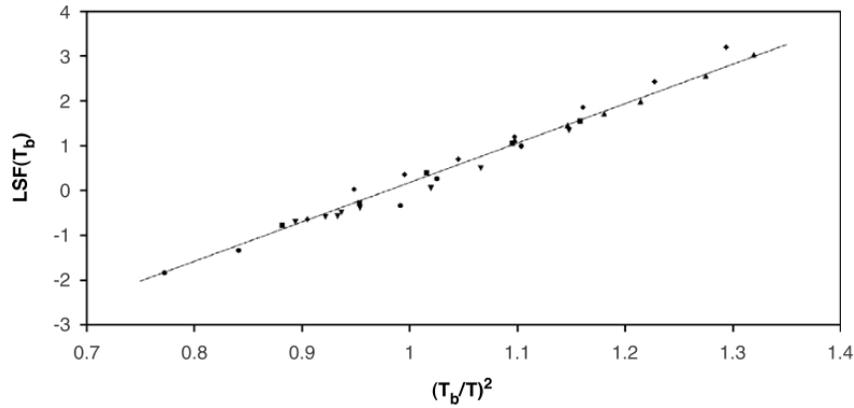


Figura 2.4: Curva maestra de LSF vs.  $(T_b/T)^2$  para líquidos sobreenfriados simples frágiles para temperaturas dentro del intervalo  $T_m < T < T_c$  donde  $T_m$  y  $T_c$  son la temperatura de fusión y de entrecruzamiento respectivamente. Los líquidos sobreenfriados aquí mostrados corresponden a PDE ( $\blacktriangle$ ), TNB ( $\blacktriangle$ ), OTP ( $\star$ ), PIB( $\circ$ ),  $PVAc$ ( $\blacksquare$ ) y PS ( $\blacklozenge$ ). Figura tomada de [93].

equilibrio termodinámico<sup>v</sup> como fuera de este, como lo es el caso de los coeficientes de transporte [98] [96].

### 2.1.3. Universalidad de la viscosidad de los líquidos sobreenfriados simples

A inicios de los 90 Rossler et al [99] analizaron las viscosidades de distintos líquidos sobreenfriados orgánicos utilizando distintas temperaturas de referencia con el fin establecer una ley de estados correspondientes, es decir, una relación que describa las viscosidades de distintas sustancias y reducir el comportamiento en un gráfico único (*master plot*). Sin embargo, se mostró que para distintas temperaturas de referencia  $T_r$  se infiere un comportamiento distinto por arriba y por abajo de una cierta temperatura  $T_c$  comprendida entre  $T_m$  y  $T_g$ . Esta temperatura  $T_c$  demarca el comportamiento universal y el individual para los líquidos sobreenfriados ya que ocurre la ruptura de la relación de Stokes-Einstein lo cuál es un indicador de un cambio en la difusión en el líquido sobreenfriado por arriba y por debajo de esta temperatura [94].

Se determinó que  $T_c = 1.2T_g$  como aquella temperatura a la cuál existe un cambio de régimen, donde la relación de Stokes-Einstein cambia y por tanto el proceso de difusión. El origen de un segundo proceso de difusión no fue muy claro hasta entonces, ya que al contrario del relajamiento  $\alpha$  el  $\beta$  persiste debajo de  $T_g$ . Por tanto un líquido sobreenfriado pasa de un mecanismo de difusión traslacional  $\alpha$  a un rotacional  $\beta$  en  $T_c$  [100].

La viscosidad  $\eta$  está relacionada inversamente con el coeficiente de difusión traslacional

<sup>v</sup>En un trabajo titulado 'corresponding states for perfect liquids' K.S. Pitzer en 1939, partiendo de ciertas suposiciones y haciendo uso de física estadística deduce la teoría de los estados correspondientes de van der Waals, sus resultados los analiza para argón, criptón y xenón, y de hecho al usarlos como referencia los denomina líquidos perfectos [97]

$D$ , de acuerdo con la relación de Stokes-Einstein (SE):

$$D = k_B T / (6\pi\eta r) \quad (2.18)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura, y  $r$  es el radio de la partícula difusiva. La relación de SE describe la autodifusión de una partícula de prueba esférica en un fluido viscoso. Esta ecuación se basa en la hidrodinámica clásica y teoría cinética [101]. Los líquidos que se encuentran por arriba de la temperatura de fusión ( $T_m$ ), la relación 2.18 generalmente es válida para cuando la partícula de prueba es muy pequeña. Sin embargo, en un líquido sobreenfriado ( $T < T_m$ ) conforme disminuye la temperatura y se aproxima a la temperatura de transición vítrea a una cierta temperatura  $T_c$ , la temperatura de entrecruzamiento, la relación SE generalmente subestima al coeficiente de difusión  $D$  en relación a la viscosidad  $\eta$  en varios órdenes de magnitud, así cuando se rompe la relación de SE ya no se cumple la relación  $D \sim \eta^{-1}$ . Cuando ocurre este rompimiento habrá una dependencia de  $\eta$  con un exponente  $\xi$

$$D \sim \eta^{-\xi} \quad (2.19)$$

donde  $\chi$  es un exponente cuyos valores en los líquidos sobreenfriados normalmente se encuentran en el rango de 0.6 – 0.9, además, se ha observado una dependencia significativa con el tamaño de la partícula de prueba en la difusión traslacional, donde la desviación del comportamiento SE es más pronunciada para aquellas más pequeñas. Sin embargo, se ha podido establecer universalidad para temperaturas menores que la de entrecruzamiento [93].



---

## TRANSICIONES CINÉTICAS: LA TRANSICIÓN VÍTREA EN SOLUCIONES SOBRESATURADAS

---

La fragilidad de un líquido sobreenfriado es uno de los factores a tomar en cuenta en los líquidos formadores de vidrios tanto en sustancias puras como en mezclas. Es fundamental comprender el fenómeno de la cristalización, ya que los procesos de nucleación y crecimiento de cristales determinará si el líquido se convertirá en vidrio o no durante el enfriamiento. Optimizar el proceso de vitrificación tiene implicaciones importantes en diversas aplicaciones tecnológicas.

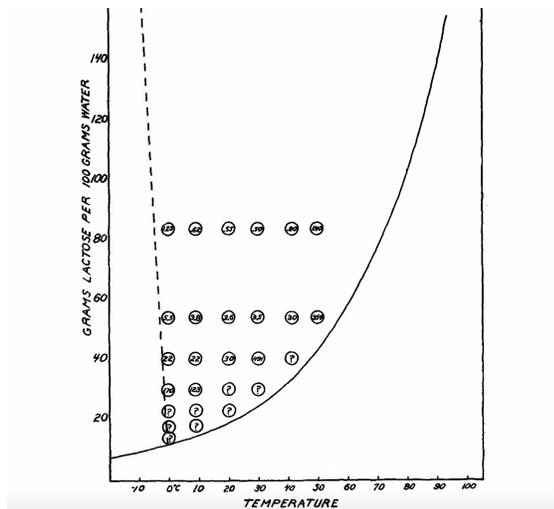
Fue hasta finales del siglo XIX cuando se planteó la posibilidad de inhibir la cristalización mediante un proceso de enfriamiento rápido [35]. En el caso del agua, se necesita una velocidad de enfriamiento enorme [36] y sólo para obtener pequeñas gotas [51] vítreas. Sin embargo, años posteriores se descubrió otra forma de obtener agua vítrea interrumpiendo el proceso de nucleación mediante la adición de sustancias externas y vitrificando en la solución como fue descrito para el caso de sustancias coloidales en 1926 por Moran [102], quien descubrió que si hay menos del 35% de agua en una mezcla de agua y gelatina, la cuál según su reporte no se congela y queda atrapada en el gel, abriendo la posibilidad de obtener sustancias vítreas en solución, teniendo a la concentración como variable ya no a la temperatura. Este fenómeno fue observado en la naturaleza como un mecanismo para evitar la muerte celular en las plantas de hoja perenne en la temporada de invierno por medio de la acumulación de azúcares en un clima desfavorable [103].

Existen evidencias que en ciertas mezclas el incremento de la viscosidad al aumentar la cantidad de soluto es tal que este comportamiento inhibe la precipitación del soluto más allá de la sobresaturación por lo que la curva de solubilidad no puede ser definida a partir del equilibrio de las fases porque dicho equilibrio no llega a establecerse dentro de un tiempo experimental medible. Para describir esta fenomenología es necesario otro tipo de diagrama que incluya estados fuera de equilibrio termodinámico. En el apéndice A.3 se describe brevemente la solubilidad y la sobresaturación en sistemas binarios.

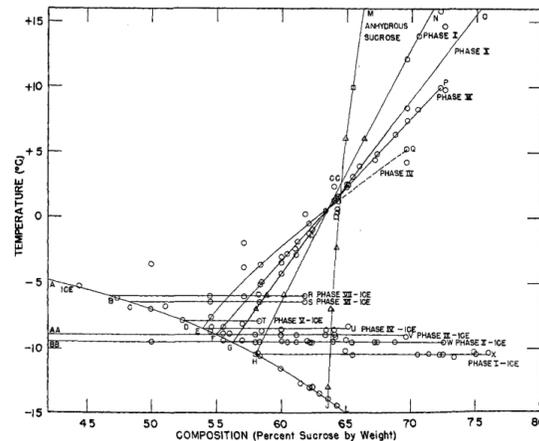
### 3.1. El diagrama suplementario (SPD)

El azúcar es bastante soluble en agua bajo las condiciones de temperatura y presión ambientales. El problema surge al aumentar la concentración y bajar la temperatura ya que diversas investigaciones reportan dificultades experimentales para determinar la solubilidad en las soluciones de azúcar, mostrando una tendencia a la sobresaturación evitando la cristalización espontánea [104]. De hecho, desde comienzos del siglo XX experimentando con sales de agua marina Van't Hoff se percató que ésta no se precipitaba aún forzando la

cristalización mediante la siembra de cristales de sal. Por lo que después de varias décadas de estudio condujo al llamado diagrama de fases dinámico [105] para describir este tipo de soluciones.



(a) Diagrama de fases de la solución acuosa de lactosa reportada por Herrington [106].



(b) Diagrama de fases de la mezcla de sacarosa y agua reportada por F. Young y F. Jones [107].

Figura 3.1: Diagramas de fases de soluciones de agua y azúcares.

Los primeros reportes experimentales sobre la dificultad de los azúcares para precipitar en la solución se deben al trabajo de B. Herrington en 1934 [106] en las soluciones de lactosa (ver figura 3.1a), motivado principalmente por resolver problemas en la industria alimentaria. Aunque, ya desde el siglo XVII se descubrió que la forma de obtener cristales de azúcar es posible con la ayuda de impurezas u otras fuerzas impulsoras adicionales [33]. De hecho, Herrington en su trabajo reportó la obtención de cristales de lactosa por medio de siembra y la adición de alcohol [108].

A inicios de los 50's la investigación experimental de F. Young y F. Jones para lactosa, sacarosa y fructosa [107, 110, 111] dio cuenta de las dificultades del crecimiento de cristales para altas concentraciones por el aumento de la viscosidad en las soluciones retrasando la aparición de la fase sólida del soluto. En los experimentos observados por F. Young y F. Jones no fue posible determinar con claridad la curva de solubilidad de este tipo de soluciones, en la figura 3.1b se observa los datos obtenidos para el caso de agua ya sacarosa donde como se puede observar, el diagrama de fases en equilibrio no se puede determinar dado la variabilidad de los datos obtenidos.

De los muchos trabajos presentados por Basile Luyet desde inicios de su carrera científica, uno de sus objetivos fue el estudio de las transiciones de fase que tienen lugar durante el proceso de enfriamiento de soluciones acuosas a diferentes temperaturas y concentraciones [112, 113], fue así que en 1960 presentó un diagrama para la solución acuosa de glicerina [114] donde además de las curvas de cristalización y solubilidad, agregó la temperatura de transición vítrea de la solución. Posiblemente, de los estudios presentados en este tipo de soluciones que se remontan a finales del siglo diecinueve y principios del

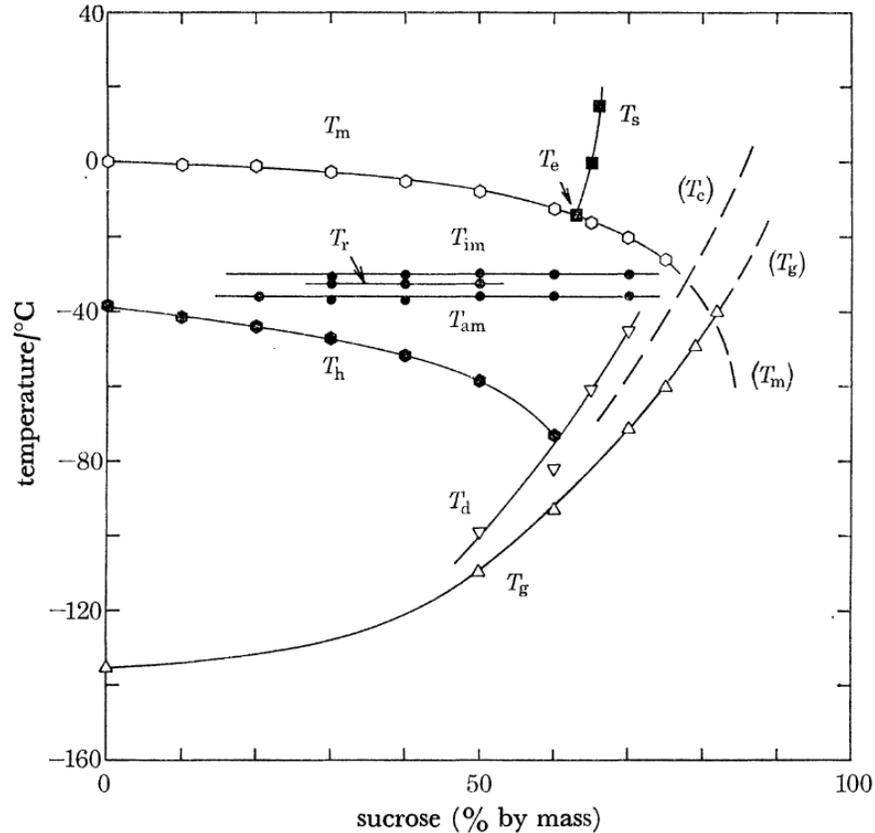


Figura 3.2: Diagrama de fases complementario propuesto por Mackenzie [109] que describe el comportamiento del sistema: agua-sacarosa.

siglo XX tiempo en que W. Ostwald y G. Tammann [35] presenta su investigación sobre los líquidos sobreenfriados y la sobresaturación motivaron a B. Luyet a incluir esta curva de transición vítrea al diagrama de fases para completar la fenomenología observada. En 1968, en colaboración con Rasmussen, Luyet presentó un diagrama de fases de sacarosa acuosa y glucosa [115]. El mismo año, Rasmussen y MacKenzie presentaron el mismo diagrama para agua y dimetilsulfóxido [116]. Diez años más tarde, MacKenzie cambió el nombre de este diagrama de fases a diagrama de fases suplementario (SPD) (Supplemented Phase Diagram) porque implica no sólo estados de equilibrio sino también estados de no equilibrio [109].

En la figura 3.2, se muestra el SPD propuesto por MacKenzie. En este diagrama además de las curvas de coexistencia características y de la temperatura de transición vítrea se muestran algunas otras temperaturas características que describen distintos eventos ocurridos en el proceso de calentamiento o enfriamiento y explicados ampliamente por las curvas calorimétricas asociadas en este y subsecuentes trabajos de investigación.

Para una mezcla de agua y sacarosa la temperatura eutéctica teórica se alcanzará en aproximadamente  $-14^{\circ}\text{C}$ , pero la sacarosa no cristaliza a partir de la solución, por lo que el diagrama de fases no muestra un punto eutéctico, y la curva liquidus se extiende más allá de este punto. Cuando la nucleación del soluto es muy lenta como en este caso, la sobresaturación puede persistir durante mucho tiempo, tiempos de relajación grandes [117].

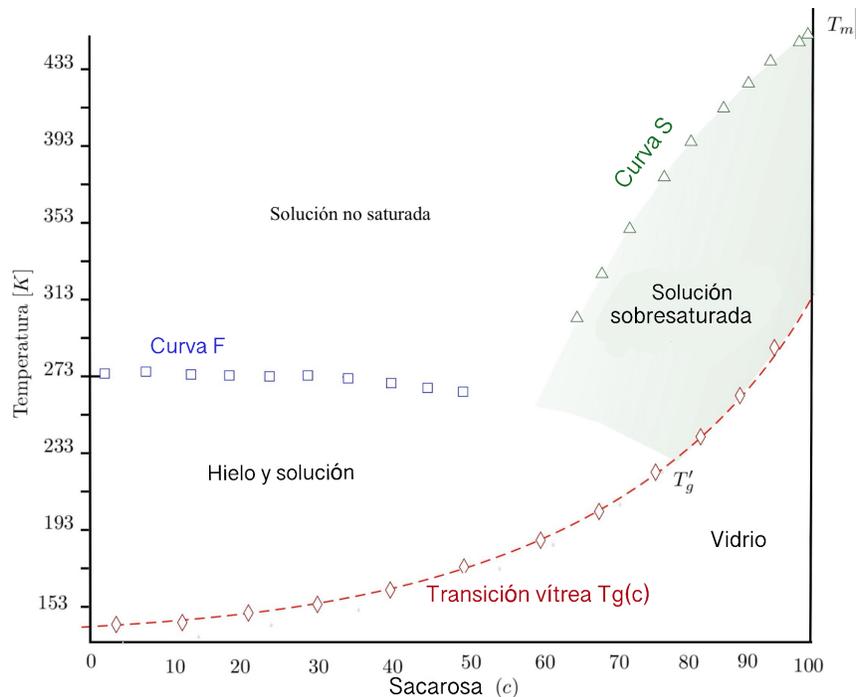


Figura 3.3: Diagrama de fases complementario (SPD) para una solución acuosa de sacarosa. La curva  $F$  representa la curva de congelación de la solución y la curva  $S$  es la curva hipotética de solubilidad. La transición vítrea  $T_g(c)$  se estima mediante datos experimentales.

Las soluciones de agua y azúcares presentan esta anomalía, por lo que es necesario utilizar un SPD para describir estos sistemas, dado que este diagrama incluye las transiciones termodinámicas y la cinéticas.

La curva de equilibrio entre la solución y el hielo, la curva  $F$  del diagrama de la figura 3.3 puede determinarse teóricamente o experimentalmente. Experimentalmente se puede determinar el equilibrio de fases en un intervalo de concentraciones de sacarosa muy bajas, no más allá del 40%. Sin embargo, fuera de ese intervalo la medición experimental se dificulta, sobre todo a concentraciones mayores dado que para este tipo de soluciones la sobresaturación impide la formación de hielo formando un vidrio en su lugar.

Diversos autores han determinado la curva de solubilidad de mezclas azucaradas y se han propuesto funciones de correlación [104, 118–120]. Tomando el mismo intervalo de temperaturas, la fructosa tiene la solubilidad más alta en comparación con la sacarosa, la glucosa, la trehalosa, la maltosa y la lactosa en ese orden. Propuestas teóricas desde el punto de vista termodinámico y molecular intentan explicar este comportamiento. Algunas conclusiones cuantifican a las interacciones entre las moléculas de la solución como un factor clave aunque hay evidencia de algunas desviaciones en modelos generalizados. Investigaciones recientes en soluciones acuosas de trehalosa por ejemplo han vinculado las características moleculares de la solución acuosa con su capacidad crioprotectora debido principalmente al aumento su viscosidad por sobresaturación y la formación vítrea. Dado el incremento de la viscosidad en la región sobresaturada de esta y otras soluciones similares, proponemos determinar una posible región donde la curva de solubilidad podría delimitarse en términos

del cambio de la viscosidad, del régimen saturada al sobresaturada.

Se han desarrollado otros modelos de correlación entre las propiedades termodinámicas para este tipo de sistemas mediante grupos funcionales. El método de solución analítica de grupos (ASOG) fue propuesto por G. M. Wilson et al [121], donde el coeficiente de actividad se obtiene como la contribución debidas a las diferencias de tamaño molecular así como la interacción entre las componente de la mezcla. Años más tarde, en 1975 J. M. Prausnitz y D-S. Abrams propusieron dos modelos físicos estadísticos para describir una solución no eutéctica. El primero es el modelo (UNIQUAC) Universal quasichemical model el modelo cuasiquímico universal (UNIQUAC/Functional group activity coefficients model) [122] para describir una mezcla no electrolítica de dos líquidos. Este modelo es utilizado principalmente en la descripción del equilibrio líquido-vapor y líquido-líquido. El modelo UNIQUAC [123] es una combinación de contribuciones debida a diferencias en tamaño y forma de las moléculas en la mezcla y de grupos funcionales, además de una parte residual debida a las interacciones [6,23].

Posteriormente diferentes autores modificaron estos modelos introduciendo diferentes condiciones termodinámicas [124], en particular para el caso de mezclas binarias acuosas con azúcares [125–128]. Se puede encontrar un resumen de las distintas teorías en dos artículos de revisión publicados como reportes de la IUPAC [129, 130] donde los autores reconstruyen un diagrama SPD utilizando los resultados matemáticos para los lugares geométricos de ambas curvas de liquidus y el perfil de la temperatura de transición utilizando la ecuación de Gordon-Taylor.

La posibilidad de encontrar este comportamiento en mezclas sobresaturadas sigue siendo una tarea pendiente. Recientemente un modelo utilizado para calcular propiedades termodinámicas de diferentes mezclas acuosas de azúcares, sin tener suficiente precisión en la región sobresaturada es el llamado SAFT (Statistical Association Fluid Theory). Este modelo considera al fluido formado por esferas duras, al cuál se le asigna un potencial para tener en cuenta la interacción entre las esferas de pozo cuadrado o Lennard-Jones. Además se les permite la formación de cadenas y la unión de estas últimas. Asimismo, se han propuesto distintas variaciones de este modelo [131].

Más recientemente el models COSMO-SAC (COnductor-like Screening MOdel-Segment Activity Coefficient), basado en cálculos de química cuántica, predice propiedades de la mezcla con resultados no muy adecuados en la región de la posible curva de saturación [132, 133].

Cabe resaltar que todos estos modelos mencionados son sustentados en la hipótesis que el SPD satisface condiciones de equilibrio termodinámico.

### 3.2. La viscosidad y la temperatura de transición vítrea en las soluciones sobresaturadas

A diferencia de los líquidos simples sobreenfriados, la viscosidad de una mezcla binaria acuosa es una función tanto de la temperatura como de la concentración del soluto a una presión dada. Al reducir su temperatura en las cercanías del régimen sobresaturado,

la viscosidad se incrementa dependiendo de ambas variables del orden de  $\sim 10^{13}$  hasta vitrificar. El estudio de este coeficiente de transporte es importante en la ciencia de alimentos, [44,46,134–138,138–140,140–149], criopreservación de tejidos biológicos, [150–154] y el almacenamiento farmacéutico de medicamentos así como las vacunas de ARN [155–162].

### 3.2.1. La temperatura de transición vítrea en una mezcla binaria

Las sustancias químicas pueden existir como un vidrio ya sea de forma natural o artificial mediante diferentes técnicas. Como sabemos, la vía más habitual para formar un vidrio es a través de un enfriamiento rápido desde el líquido evitando la cristalización. Como se describió para una sustancia pura,  $T_g$  depende además de la velocidad de enfriamiento también de la composición química de la sustancia, así como las propiedades físico-químicas que la describen debido a las interacciones moleculares. En una mezcla esta interacción entre moléculas de dos o más sustancias provoca cambios importantes en las llamadas propiedades coligativas como se describió en el capítulo 2. Por tanto es de esperarse que la temperatura de transición vítrea de una sustancia pura se vea influenciada por la adición de otra sustancia [163]. Esta influencia fue observada por B. Luyet para el caso de la solución de agua y glicerina en 1960 [114].

Los estudios de la temperatura de transición vítrea y su dependencia con la composición en una mezcla fue motivada por distintas áreas de investigación. Por un lado, para evitar la formación de hielo en la criopreservación, como una manera de obtener agua vítrea [?]. Por otro lado, desde la ciencia de polímeros se desarrollo la mayor investigación teórica, al igual que para las sustancias puras poliméricas. Cuando esta teoría fue llevada a la ciencia de alimentos permitió igualmente un amplio desarrollo de ambas áreas .

La temperatura de transición vítrea en función de la concentración en una solución acuosa de azúcar se mostró por primera vez en un diagrama de fase en 1968 [115], aunque la influencia de la cantidad de soluto en la solución y el incremento o decremento de  $T_g$  de la solución fue estudiado para una solución acuosa de glicerina [114,164].

Se han propuesto varias ecuaciones para determinar la temperatura de transición vítrea de una solución a partir de estudios teóricos y experimentales [165,166]. Algunas expresiones son propuestas empíricas, semi empíricas y las ecuaciones teóricas se corroboran para las regiones de aplicación mediante la experimentación. Las investigaciones se han visto motivadas por resolver distintos problemas. Sin embargo, en la ciencia de polímeros, dado que ya se sabía que estas sustancias son sustancias que vitrifican fácilmente, se esperaba algo similar para las mezclas de los mismos, es así que en esta área se presenta por primera vez casi al mismo tiempo una una ecuación empírica por E. Jenckel y R. Heusch en 1953 [59] y una ecuación teórica por M. Gordon y J. Taylor [167]. Esta ultima, es una de las ecuaciones más famosas de  $T_g$  como función de la concentración  $c$  desarrollada para una solución de copolímeros ideal. La ecuación de Gordon-Taylor (GT) se basó en la aditividad de volumen de los dos componentes poliméricos, y asumió una temperatura de transición de segundo orden donde el volumen es continuo en la temperatura de transición  $T_g$ , la transición vítrea de la mezcla

en función de la concentración propuesta es,

$$T_g = \frac{w_1 T_{g1} + w_2 k T_{g2}}{w_1 + w_2 k} \quad (3.1)$$

con  $w_1$  y  $w_2$  son las concentraciones de los componentes.  $T_{g1}$  y  $T_{g2}$  son las temperaturas de transición vítrea de las sustancias puras,  $k$  es un parámetro ajustable. El parámetro de ajuste  $k$  se estimó con la ayuda de mediciones experimentales asumiendo un comportamiento ideal. En 1977, varios años después de presentar la ecuación GT, J.M. Gordon, G.B. Rouse, J.H. Gibbs, y W.M. Risen [168], presentaron un análisis cuantitativo sobre la constante  $k$  de esta ecuación mediante la entropía configuracional, concepto desarrollado años antes precisamente por J.H. Gibbs y EA Dimarzio en 1959 [169]. Desde la termodinámica clásica, la temperatura de transición vítrea no es una transición de fase, sin embargo, de acuerdo con la ecuación GT,  $T_g$  podría clasificarse como una transición de segundo orden ya que la entropía es continua en  $T_g$ . Alternativamente, el carácter no ideal de una solución podría incluirse en la ecuación GT a través de un parámetro de interacción [170]. Entonces, la ecuación GT describe la temperatura de transición vítrea de varias mezclas ideales y no ideales debido al parámetro de ajuste  $k$ .

Otra de las tantas ecuaciones basadas en la ecuación de GT es la propuesta por Couchmann y Karasz [171] propusieron una ecuación a partir de información calorimétrica de los componentes, ya que al tratarse de una transición cinética, se puede determinar el calor liberado absorbido en dicha transición vítrea [172].

Una ecuación muy interesante para describir la  $T_g$  de varias soluciones no poliméricas es la misma propuesta para polímeros en el artículo publicado por E. Jenckel y H. Heusch (JH) en 1953 [59]. La expresión matemática desarrollada es simple pero bastante útil, pues describe la temperatura de transición vítrea de soluciones de distinta composición química, esto debido al término  $\alpha$ , un parámetro de ajuste, así la ecuación JH está dada por

$$T_g = T_{g_a} w_a + T_{g_b} w_b + \alpha w_a w_b \quad (3.2)$$

esta expresión está dada en términos de la  $T_g$  de las sustancias puras ( $T_{g_a}$  y  $T_{g_b}$ ) y de la concentración de las sustancias  $w_a$  y  $w_b$  al igual que la ecuación GT. Con la introducción de este parámetro de ajuste  $\alpha$ , se probó esta ecuación para varias mezclas incluidos algunos alcoholes polihidroxilados o polioles. Estos autores, también incluyeron en su análisis el efecto de los diluyentes sobre los polímeros, donde el diluyente generalmente es aquel compuesto de menor tamaño y tiene un efecto plastificante para la solución. Los plastificantes se agregan comúnmente a polímeros como plásticos y caucho, ya sea para facilitar el manejo de la materia prima durante la fabricación o para satisfacer las demandas de la aplicación del producto final.

La adición de un plastificador a la solución, o si alguno de los compuestos es una sustancia plastificante, la cantidad de esta sustancia modificará la temperatura de transición vítrea de la mezcla, cuanto mayor sea el plastificante menor será la  $T_g$  de dicha mezcla. Es muy complicado obtener agua vítrea en laboratorio al igual que la medición de su temperatura de transición, por esto, en los años 70's las incertidumbres en las posibles mediciones eran

mayores dada la instrumentación de aquel tiempo. Una alternativa para estimar la  $T_g$  del agua indirectamente es por medio de la ecuación de JH, dado el efecto plastificante del agua en algunas soluciones. Así la temperatura de transición vítrea del agua la determinó A. Angell en 1967 con la ayuda de una mezcla acuosa de nitrato de calcio [173] y una mezcla acuosa de glicerina [174]. Varios años después, en 1971 H. Rasmussen y A.P. MacKenzie [175], inspirados en el trabajo de Angell, utilizaron la ecuación de JH para ampliar el estudio de la  $T_g$  de soluciones acuosas de etilenglicol y metanol para resolver problemas derivados de la criobiología reportados experimentalmente por B. Luyet para una solución acuosa de glicerol [114, 176]. En los años ochenta se establecieron las bases del agua como plastificante en soluciones acuosas de azúcares y otros compuestos orgánicos como principal diluyente en la industria alimentaria y muestras biológicas [177, 178]. Así, varios trabajos propusieron la aplicabilidad con gran éxito de las ecuaciones desarrolladas previamente para mezclas de polímeros [163, 172, 179] (Levine y Slade 1986; Ollett y Parker 1990; Roos y Karel 1991; Roos y Karel 1991; Roos 1993).

En 1979, J.M. Pochan [180] propuso una relación empírica en la que no se necesita ningún parámetro de ajuste, por lo que la  $T_g$  de la mezcla está dada únicamente en términos de las fracciones en masa  $m_1$  y  $m_2$  así como las temperaturas de transición  $T_{g1}$  y  $T_{g2}$  de los componentes,

$$\ln(T_a) = m_1 \ln(T_{g1}) + m_2 \ln(T_{g2}) \quad (3.3)$$

esta ecuación se implementó en soluciones de múltiples componentes, incluidos polímeros y alcoholes.

Recientemente J.E.K. Schawe [181] presentó un enfoque termodinámico para describir temperatura de transición vítrea de soluciones binarias de agua-azúcar y azúcar-azúcar. Su análisis se basó en la entalpía de exceso de la solución binaria y un parámetro molecular relacionado con enlaces de hidrógeno para plantear una ecuación de GT generalizada.

### 3.2.2. La viscosidad en las mezclas binarias de azúcares

Para la segunda mitad del siglo XX se propusieron un número considerable de ecuaciones para describir el comportamiento de la viscosidad con la temperatura para muchos compuestos en distintos intervalos de temperatura y presión. Para el caso de los líquidos sobreenfriados simples, las dos expresiones equivalentes VFT y WLF, probaron ser las dos ecuaciones válidas tanto para sustancias poliméricas como para otros líquidos formadores de vidrios como los polihidroxilados.

Los primeros estudios de la viscosidad y su dependencia con la temperatura y la concentración en las mezclas se comenzaron hacia finales del siglo XVIII. Una de las primeras publicaciones documentadas de este coeficiente de transporte fue realizado por S. Arrhenius en 1887 para sustancias puras y para soluciones acuosas diluidas [182], así observando sus resultados en soluciones no electrolíticas y algunas sales, se dio cuenta que en la mayoría de los casos de estudio la viscosidad relativa se puede representar mediante la relación,

$$\eta = A^x B^y \quad (3.4)$$

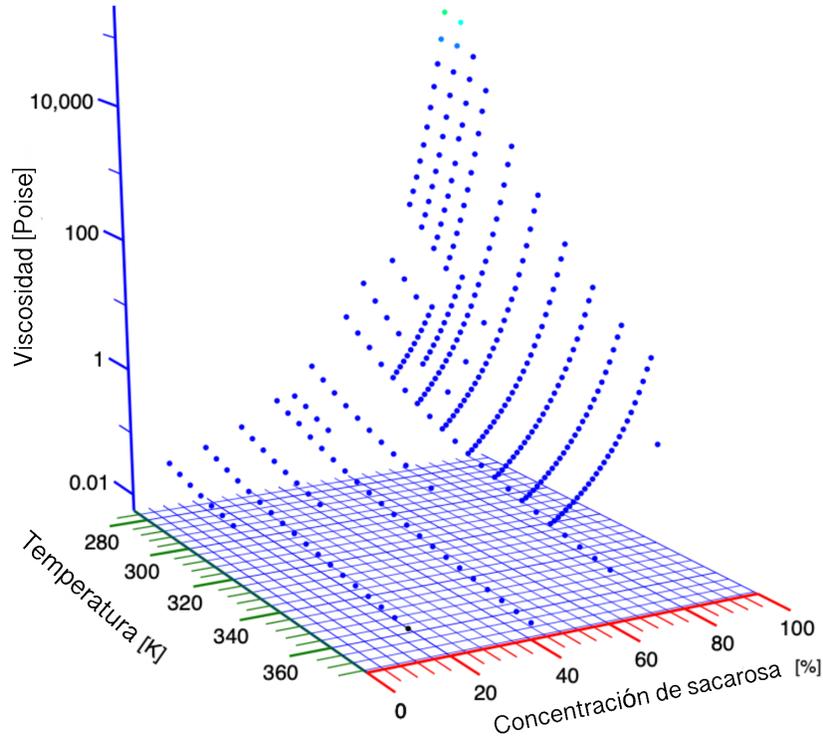


Figura 3.4: Viscosidad de la solución de agua y sacarosa como función de la temperatura y la concentración.

en esta ecuación empírica  $A$  y  $A$  son constantes características de las dos sustancias a una temperatura constante,  $x$  y  $y$  el volumen porcentual de las sustancias.

Así a principios del siglo XX se propusieron varias ecuaciones empíricas y semi empíricas para muchas soluciones. Los esfuerzos fueron en la dirección de relacionar la viscosidad de la solución con la viscosidad de sus constituyentes a cierta temperatura y concentración bajo la hipótesis de aditividad, hecho que fue muy criticado por EC Bingham [183]. Algunos trabajos más antiguos muestran una expresión empírica de la viscosidad para distintas soluciones propuesta por C. H. Lees en 1901 [184],

$$\left(\frac{1}{\eta}\right)^m = v_1 \left(\frac{1}{\eta_1}\right)^m + v_2 \left(\frac{1}{\eta_2}\right)^m \quad (3.5)$$

con  $m$  un parámetro de ajuste,  $\eta_1$  y  $\eta_2$  las viscosidades de los constituyentes con  $v_1$  y  $v_2$  sus volúmenes molares respectivamente. Esta ecuación se analizó para mezclas de glicerina con agua, agua salada y para soluciones de azúcar de 0 a 40 % sacarosa y para temperaturas de 0, 40 y 80°C. Esta ecuación se ajustó con precisión a los resultados experimentales.

Por su parte, en 1906 A. Einstein [185], dedujo un expresión teórica para la viscosidad de una solución diluida, considerando que las sustancias no se disocian en la solución, además consideró a las moléculas como esferas rígidas y la molécula de la sustancia disuelta es mucho más grande que la molécula del solvente. En 1911, A. Einstein [186] retomó su trabajo de 1906

y corrigió un error en la deducción de este primer artículo y obtuvo la conocida expresión,

$$\eta = \eta_0(1 + 2.5\phi) \quad (3.6)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad de la solución,  $\phi$  la fracción de volumen de la sustancia disuelta en un solvente de volumen unitario cuya viscosidad es  $\eta_0$ . Esta expresión solo es válida para soluciones muy diluidas donde las moléculas de soluto son muy grandes en comparación con las del solvente bajo la suposición esférica de las dos moléculas. Aunque las suposiciones no aplican para soluciones muy diluidas de agua y azúcar dada la forma de las moléculas y la interacción entre éstas obtuvo una buena aproximación comparando resultados experimentales para una concentración del 1% a 40°C. La mayoría de las ecuaciones utilizadas para soluciones de polímeros infinitamente diluidas son comparables a la relación de Einstein 3.6, por lo que como se verá más adelante las ecuaciones desarrolladas para estas soluciones poliméricas son la base de las relaciones empíricas utilizadas en las soluciones de azúcares y otros compuestos similares.

En 1917 S. Arrhenius [187] presentó un análisis exhaustivo de la ecuación de 3.6 y comparó el intervalo de validez con su ecuación propuesta en 1887, al final de su estudio concluyó que en todo caso, la expresión de Einstein es una aproximación límite para distintas soluciones muy diluidas, debido a la innegable interacción molecular de las distintas especies químicas involucradas cuando la concentración aumenta. Debido a las limitaciones de la ecuación de Einstein, varios años después S. P. Moulik presentó una expresión modificada de la relación 3.6 para distintas soluciones acuosas válida para mayores concentraciones de soluto [188]. A comienzos de este siglo K. Toda y H. Furuse (2006) [189] derivaron una ecuación para la viscosidad de soluciones acuosas concentradas de glucosa y sacarosa a partir de la teoría hidrodinámica de Einstein de 1906, la expresión modificada esta dada por,

$$\eta_r = \frac{1 - 0.5\phi}{(1 - \phi)^3} \quad (3.7)$$

con  $\eta_r$  es la viscosidad relativa de la solución y  $\phi$  la fracción volumétrica de las moléculas de soluto. Aparentemente obtiene resultados similares para las dos soluciones pero no menciona la temperatura de comparación utilizada.

En 1917 Kendall y Monroe [190], alumnos de S. Arrhenius notaron que la ecuación propuesta en 1887 [182] seguía siendo la base de otras ecuaciones publicadas para distintas soluciones no consideradas en aquel momento como la de Dustan y Thole [191]. Después de analizar la viscosidad de mezclas de compuestos aromáticos, mostraron que de las muchas ecuaciones propuestas en ese momento no se ajustaron a los datos experimentales sólo la propuesta por Lees con  $m = 1/3$ . En ese mismo año E. C. Bingham y R. F. Jackson [192] publicaron mediciones experimentales de la viscosidad de soluciones acuosas de sacarosa a diferentes temperaturas (0-100°C) y para concentraciones de 20 y 40 % en peso. De hecho, la finalidad del trabajo era la calibración de los viscosímetros y la necesidad de utilizar otras sustancias aparte del agua. También presentan una discusión sobre la ventaja de expresar la viscosidad en centipoise, así el valor reportado para el agua a 20°C fue de  $1.0005cP$ .

En 1948 V. Vand publica una serie de trabajos titulados 'La viscosidad de soluciones y

suspensiones' [193,194] en los que teniendo en cuenta la interacción molecular de suspensiones de esferas rígidas con una concentración volumétrica deriva una ecuación teórica generalizada para la viscosidad relativa de la solución dada por,

$$\ln(\eta_r) = \frac{a\phi}{1 - Q\phi} \quad (3.8)$$

con  $a$  una constante,  $Q$  un factor de interacción y  $\phi$  la fracción volumétrica del soluto. Esta ecuación también puede ser expresada en términos de el volumen molar del soluto hidratado  $V_h$  y la concentración molar del soluto  $c$ ,  $\ln\eta_r = V_h c / (1 - QV_h c)$ . En un caso muy particular si no toma en cuenta la interacción molecular recupera la ecuación de Arrhenius (3.4). En un tercer trabajo de 1947 [195] con el fin de proporcionar un ejemplo práctico los resultados teóricos obtenidos previamente, discute el caso de las soluciones acuosas de sacarosa, ya que la viscosidad y densidad eran bastante conocidas en ciertos intervalos de temperatura y concentración. El intervalo de temperaturas considerado fue de 0-100°C. Años más tarde S. P. Moulik y D.P. Khan retoman estos trabajos de Vand y los combinan con su teoría de la viscosidad y con la de Thomas en una expresión general, que aproximó a los valores experimentales reportados en soluciones concentradas de electrolitos y en soluciones de glucosa, sacarosa, manitol y sorbitol [196]. En sus resultados reportan una correlación universal para las soluciones de compuestos polihidroxilados como función de la concentración a temperatura constante.

Un modelo semi empírico que describe la viscosidad de distintas azúcares y sus soluciones a concentraciones (de hasta 80 %) mucho más altas de las que hasta el momento habían sido estudiadas fue publicado por J. Chirife y M.P. Buera en junio de 1977 [197]. Su modelo se basó en una teoría originalmente desarrollada para predecir la viscosidad de soluciones concentradas de electrolitos, así la expresión propuesta esta dada como,

$$\mu_r = \exp(XE) \quad (3.9)$$

con  $\mu_r$  la viscosidad relativa,  $a$  y  $E$  parámetros de ajuste, la concentración está dada por la fracción molar  $X$ . Esta ecuación se utilizó para describir la dependencia de la viscosidad con la concentración de soluciones de sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa, lactosa y jarabe de maíz. De acuerdo a sus análisis de datos, el peso molecular del azúcar fue un factor importante en la determinación del valor del parámetro  $E$ , que teóricamente podría estar relacionado con la energía libre de activación para el flujo viscoso.

El trabajo de tesis de J. L. Flores de 1979 fue la conexión entre las teorías desarrolladas sobre la viscosidad en los líquidos sobreenfriados simples, la transición vítrea en una solución y la viscosidad dependiente de la concentración. en su trabajo experimental preparó soluciones acuosas de fructosa y sacarosa a concentraciones superiores al 80 % y un intervalo de temperaturas de 0-80°C, llegando a tener valores de la viscosidades de hasta  $10^{10} \text{ mPa.s(cP)}$ , de hecho muy próximas a la transición vítrea. Este hecho aunado a los trabajos de H.H. Meyer y J.D. Ferry en la glucosa [198] y los trabajos de J.H. Hildrebrand [199,200] sobre el volumen libre para líquidos puros motivó a T. Soesanto y M. C. Williams [201] a estudiar estas soluciones desde la transición vítrea desarrollada principalmente para la ciencia de polímeros y para distintas concentraciones empleo las ecuaciones de WLF y VFT

con muy buenas aproximaciones.

En la década de los 80's Slade y Levine, en el marco de la ciencia de alimentos, publicaron diversos estudios sobre la aplicabilidad y efectividad de la ecuación WLF para describir los coeficientes de transporte en soluciones de azúcares debido al efecto plastificante del agua en la mezcla, al igual que los solventes poliméricos [202]. De hecho, debido a esta similitud en el comportamiento plastificante del agua al igual que los solventes desarrollaron toda una escuela en lo que ellos llamaron 'food polymer science'. Un plastificante es una sustancia que se agrega a un material, generalmente un polímero o plástico, para aumentar su flexibilidad y maleabilidad por tanto esto disminuye la temperatura de transición vítrea de la mezcla. El agua se considera un plastificante de los azúcares porque tiene la capacidad de reducir la temperatura de transición vítrea de los azúcares.

Estudios posteriores con distintos tipos de azúcares han demostrado la aplicabilidad de la ecuación WLF en la ciencia de los alimentos [140, 203]. Sin embargo fue necesario establecer un intervalo determinado de validez, pues al igual que lo descrito por Soesanto, en el caso de soluciones diluidas, una forma exponencial tipo Arrhenius describe a la viscosidad. Así, dado que la temperatura de transición vítrea aumenta con el contenido de soluto, se estimó que aproximadamente por debajo de  $T_g$  y por encima de  $T_g + 100C$  es aplicable una dependencia tipo Arrhenius y dentro del intervalo se espera un comportamiento no Arrhenius, como una expresión WLF [137]. Al igual que para los líquidos simples, varios experimentos demostraron que los parámetros de ajuste de la ecuación WLF dependen de las sustancias en estudio como concluye M Peleg después de su exhaustivo análisis en mezclas de polímeros y soluciones de azúcar [204]. Como WLF y VFT son modelos equivalentes, ambos se utilizan para describir la viscosidad en soluciones de azúcar, por ejemplo, en soluciones acuosas de maltosa y sacarosa [205, 206] y soluciones de fructosa y glucosa [179].

El estudio de la viscosidad y los procesos de transporte en general en las distintas soluciones es de gran interés en las ciencias biológicas, pues el agua es esencial para todas las formas de vida y la gran mayoría de las interacciones moleculares en los sistemas vivos ocurren en un entorno acuoso. Por tanto, las propiedades fisicoquímicas del medio en que las muestras biológicas son manipuladas determinarán el resultado final ya sea de crecimiento, supervivencia o viabilidad después de un cierto proceso. Por tanto, desde que accidentalmente se añadió glicerina a una muestra ([150]) y se observó como consecuencia un mayor porcentaje de supervivencia de las células, el estudio de la viscosidad de este tipo de soluciones y muchas otras incluyendo las azúcares fue factor clave para el mejoramiento de los procesos de criopreservación celular desde inicios del siglo pasado ya que la viscosidad está directamente relacionada con el proceso de cristalización y que determinará la cantidad y tamaño de hielo formado al bajar la temperatura.

Con el objeto de esclarecer las razones que hacen de la trehalosa el agente criopreservador más efectiva en comparación con otras azúcares como sacarosa y maltosa debido a la 'protección' que brinda a los organismos contra la deshidratación y la congelación en 1999 S. Magazú et al (1999) [207] investigaron los la viscosidad y la difusión en soluciones acuosas de trehalosa, sacarosa y maltosa. Dado el comportamiento de sus resultados experimentales, el concepto de fragilidad definido por A. Angell 1994 para las soluciones acuosas [82, 84]

como se observa en la figura 3.5. Así, calcula la fragilidad para las distintas soluciones y dado el grado de fragilidad del sistema estas soluciones resultan claramente no Arrhenius y aproxima la ecuación VFT para todas las concentraciones. De las tres azúcares la trehalosa tiene una mayor fragilidad dándole este carácter de agente crioprotector resultado de una temperatura de transición vítrea más alta que otras azúcares como se verá mas adelante.

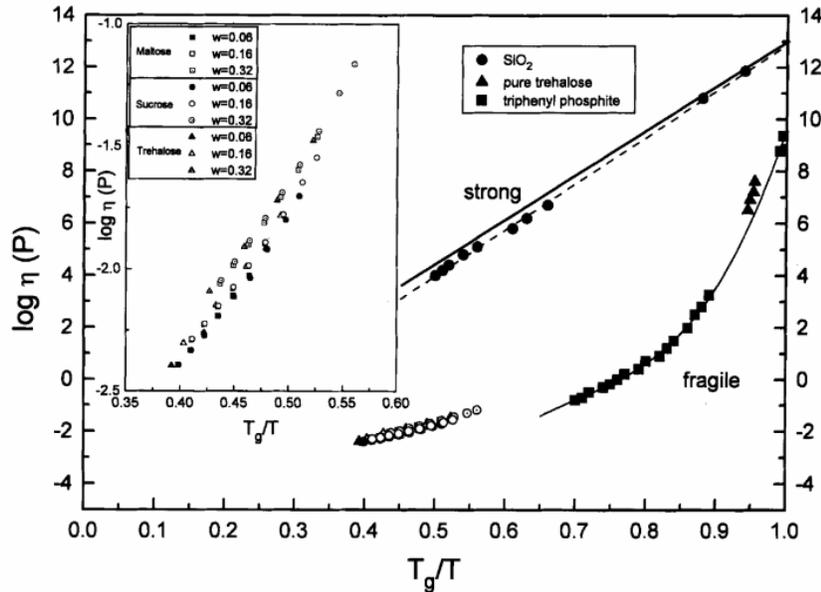


Figura 3.5: Representación de Angell de la viscosidad para soluciones acuosas de maltosa, sacarosa y trehalosa presentada por S. Magazú et al. (1999) [207].

En las soluciones acuosas de azúcar, la cristalización del soluto a alta concentración o baja temperatura puede ser inhibida debido a un aumento en la viscosidad y una disminución asociada en la tasa de difusión dentro de la solución a medida que se incrementa la sobresaturación.

En el año 2000 M. Rampp et al [208], presenta sus resultados experimentales de soluciones acuosas de azúcares incluyendo la leucrosa, sus mediciones incluyeron la viscosidad y la difusión. Sus estudios en el caso de la fructosa los realizó a altas concentraciones del 30 hasta el 85 %, dado que se encuentran en el estado sobresaturado, estos fueron los valores que se tomaron para su estudio en este trabajo. En este trabajo se toma nuevamente el concepto de fragilidad y calcula este parámetro para todas sus soluciones y de este análisis es claro que todas las mezclas estudiadas son frágiles, por lo que VFT describe a la viscosidad. En sus conclusiones de este trabajo determinan que para concentraciones menores al 50 % en peso de las azúcares estudiadas, la difusión es normal, pero a concentraciones más altas, donde las moléculas de los carbohidratos se encuentran en contacto directo entre sí, se observan diferencias significativas en los procesos de difusión, por lo que para  $c > 50\%$  en peso y temperaturas  $T > 300K$ , la ecuación de Stokes-Einstein muestra un desacoplamiento lo cuál se hace más evidente conforme se baja la temperatura. La superdifusión de las moléculas de agua según su análisis se podría explicar por la formación de una red tridimensional rígida y abierta de los azúcares los que se encuentran unidos por enlaces de hidrógeno, a través de

la cual las moléculas de agua se pueden difundir en el régimen sobresaturado.

Al estudiar las soluciones en concentraciones muy altas ya se había notado un comportamiento anómalo en la difusión, sin embargo a comienzos de este siglo con el trabajo de Rampp fue que se consideró un rompimiento de la relación de Stokes-Einstein al igual que para una sustancia pura sobreenfriada muy cercano a su temperatura de transición vítrea. En esta dirección D. Champion et al (1997) en su trabajo de la difusión translacional en soluciones de sacarosa en las cercanías de su temperatura de transición vítrea, reportaron un aparente cambio de difusión para concentraciones de sacarosa por encima del 65 % para  $T_g/T \sim 0.86$  [209] pero dado que  $T_g$  depende de la concentración no resulta ser un parametro generalizado el que se propone. A mediados del año 2016 H. C. Price [210] estudió la difusión para este tipo de soluciones para concentraciones más altas que en el trabajo de Champion, comparó la difusión de las dos moléculas, tomando un valor aproximado del 90 % de sacarosa, las desviaciones del comportamiento de Stokes-Einstein reportados son para cuando  $T/T_g < 1.5$ , pero de acuerdo a sus análisis ocurre cerca de la transición vítrea tanto para la difusión de sacarosa como para la difusión del agua, siendo mayor para esta última.

Recientemente, Longinotti y Corti [211] estudiaron la difusión en soluciones acuosas de sacarosa. Las concentraciones de sacarosa estudiadas son desde un 20 % hasta un 80wt %, sin embargo, a diferencia de otros trabajos previos, las temperaturas consideradas se encuentran en la región de sobresaturación en la solución que va desde 278 a 298 K. Esto llevó a que se observara un desacoplamiento de la viscosidad y el coeficiente de difusión en  $T_g/T^* \approx 0.75$  [212].

Usando soluciones de sacarosa del 70 al 85 % de porcentaje en peso y con un intervalo de temperaturas de 0-100°C, M. Quintas et al. (2006) [213] determinaron que el modelo de Arrhenius es capaz de describir la dependencia de la viscosidad con la temperatura para concentraciones menores a la de saturación y en cambio para concentraciones por encima de la saturación, la expresión tipo WLF describe la dependencia de la viscosidad con la temperatura. Para otras azúcares diferentes a la muy estudiada sacarosa se publicaron resultados similares para la glucosa y la fructosa [214]. En este trabajo del 2006 se hace referencia por primera vez a la saturación o solubilidad como la posible región que separa dos regímenes. Faltaban por transcurrir dos años más para que se estableciera el diagrama de fases complementario y se determinara claramente la frontera entre un régimen y otro.

Además de definir la región de saturación de las soluciones, para así definir que tipo de relajación se tiene en el sistema binario, hacía falta además clasificar esta relajación al igual que para los líquidos sobreenfriados simples, en comportamiento Arrhenius o no Arrhenius, es así que en 2008 MP Loginotti y H Corti [215], mediante el diagrama de estado (SPD) y un escalamiento Arrhenius de la viscosidad dada la fragilidad de las soluciones como lo demostró A. Angell y el trabajo de S. Magazú de 1999, en la región delimitada sobreenfriada propusieron una ecuación polinomial de la variable  $T_g/T$  dada por,

$$\log_{10} \frac{\eta}{\eta^*} = a + b \left( \frac{T_g}{T} \right) + c \left( \frac{T_g}{T} \right)^2 + d \left( \frac{T_g}{T} \right)^3 \quad (3.10)$$

con  $a, b, c$  y  $d$  parámetros ajustables y  $\eta^*$  un valor de referencia. Esta ecuación se describe dentro del intervalo de concentraciones que van desde el 20 al 86 % de azúcares. El

escalamiento con  $T_g$  de la solución lo realizaron con la ecuación de Gordon-Taylor [].

Al analizar el escalamiento Arrhenius de los datos de viscosidad para soluciones acuosas de sacarosa y trehalosa observaron que ambas curvas tienden a fusionarse en la región líquida normal, diluida, pero se separan en el régimen sobreenfriado  $T_g/T > 0.65$ , donde se hace evidente la diferencia en la fragilidad de las soluciones acuosas de azúcar. Un punto importante en esta descripción es la temperatura de transición vítrea con la que escalaron la variable ya que depende tanto de la temperatura como de la concentración, para lo cuál hicieron uso de la ecuación de Gordon-Taylor con parámetros de  $T_g = 336K$  para la sacarosa y  $T_g = 388K$  para la trehalosa con el parámetro de ajuste  $k = 4.74$  y  $k = 5.04$  respectivamente, en el caso de la temperatura de transición vítrea del agua el valor tomado fue de  $135K$ .

Al tener en cuenta que las soluciones de azúcares son frágiles, y que toda la evidencia indica sin duda que a concentraciones moderadas la relajación no es Arrhenius, los esfuerzos se centran en encontrar una expresión generalizada para los azúcares, como la ecuación WLF generalizada presentada por J. Ubbink y M. Dupas-Langlet (2020) [216].

Recientemente, I. Gazi y colaboradores [217] realizaron mediciones de la viscosidad para soluciones de  $\alpha$ -lactosa en concentraciones de 10, 15, 20, 30, 40 y 50 gramos de lactosa por 100g de solución, para temperaturas que van desde los  $80C$  hasta la mínima de  $20C$ , después de analizar el comportamiento exponencial de la viscosidad con la concentración y con la temperatura, propusieron una ecuación en términos del grado de sobresaturación de la solución dado por  $SS = glactosa/100gagua$  así,

$$\eta(ss) = a_1 e^{a_2 SS} + a_3 e^{a_4 SS} \quad (3.11)$$

donde  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$  y  $a_4$  son parámetros de ajuste, que al implementar dicha ecuación con los datos experimentales obtuvieron,

$$\eta(ss) = 1.8411e^{0.055SS} + 6.2263 \times 10^{-8} e^{0.6594SS} \quad (3.12)$$

en su trabajo comentan que esta función exponencial propuesta se ajusta mejor que una función exponencial simple ya que como observaron existen dos mecanismos que afectan la viscosidad de las soluciones. Dado el valor de los parámetros de ajuste; para concentraciones más bajas de lactosa, el efecto de la temperatura predomina, y a medida que aumenta la concentración, las moléculas de lactosa comienza a interactuar y el el efecto de la concentración predomina, para valores de sobresaturacion (SS) más altas, lo que se refleja en el segundo término exponencial. En la figura 3.6 se muestra la gráfica de su ecuación propuesta y la correlación con la información experimental.

### La viscosidad de una solución como función conjunta de la temperatura y la concentración

Los esfuerzos por encontrar una expresión de la viscosidad de una solución como función de dos variables independientes como temperatura y la concentración se remonta a K. Wagnerowski en 1976 [215, 218] quién propone una expresión empírica para las soluciones de

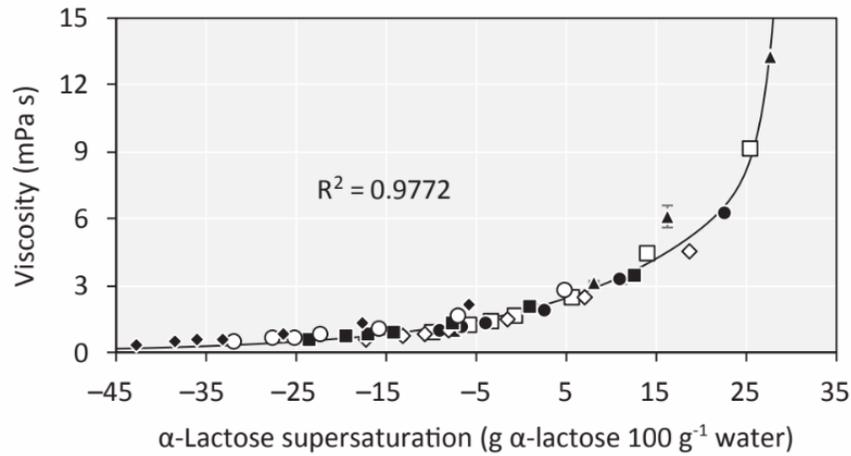


Figura 3.6: Viscosidad de soluciones acuosas de lactosa como función de la sobresaturación  $SS$  a distintas temperaturas: ▲ 20°C, ◻ 30°C ●40°C, ◊ 50°C, ■ 60°C, ○ 70°C y ◆ 80°C . Figura tomada del trabajo de I. Gazi et al. [217].

azúcar dada por,

$$\log \frac{\eta}{\eta_0} = x \left( \frac{a}{T + b} - c \right) - d \quad (3.13)$$

con  $x$  la fracción molar de azúcar,  $T$  la temperatura,  $\eta_0$  un valor de referencia para la viscosidad y  $a = 4120$ ,  $b = 91$ ,  $c = 11.75$ ,  $d = 2.10$  parámetros de ajuste para los datos experimentales.

Dos años más tarde, J. Genotelle [219] mediante un análisis de los resultados de la viscosidad publicados por F. Schneider [219, 220] en el National Bureau of Standards y de J.F. Swindells [221] implementó una ecuación empírica con muy buena aproximación,

$$\log \eta = 22.46x - 0.114 + \phi(1.1 + 43.1x^{1.25}) \quad (3.14)$$

esta expresión está dada en términos de la fracción molar de sacarosa  $x$ , aunque también puede escribirse en términos de los grados *Brix* (escala utilizada comunmente en el área de ciencia de alimentos) mediante la conversión  $x = (B/1900 - 18B)$ ,  $\phi$  es una función de la temperatura  $T$  dada por  $\phi = (30 - T)/(91 + T)$ .

A comienzos de este siglo, M. Migliori y colaboradores en 2007 [222] proponen una descripción para la viscosidad tipo Arrhenius modificada ya que para todas las soluciones estudiadas se reporta un comportamiento Newtoniano al ser soluciones con bajo porcentaje de soluto,

$$\eta(x, T) = \eta_0(x) \exp \left( \frac{E_a(x)}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right) \quad (3.15)$$

con  $T_0 = 293K$ ,  $\eta_0(x)$  y  $E_a(x)$  son funciones de la concentración molar de azúcar  $x$  dadas por  $\ln(\eta_0(x)) = (a + bx)/(1 + cx)$  y  $E_a(x) = (\alpha + \beta x^2)R$ . Las concentraciones utilizadas en este trabajo no son muy altas (10, 20 y 30%) pero debido a las bajas temperaturas en un intervalo de  $(-5, 20)C$  las viscosidades reportadas son bastante altas. Este modelo propuesto

también fue implementado para soluciones terciarias.



# Parte II

## Resultados



---

## EL SPD Y LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA EN LAS SOLUCIONES ACUOSAS DE AZÚCAR

---

Con el objetivo de describir la viscosidad de las soluciones de azúcar en el régimen sobresaturado, los resultados se presentan en el capítulo 4 y 5. A continuación se resume brevemente la metodología implementada:

- (1) Se construye el diagrama de fases de suplementario (SPD) para cada solución estudiada, utilizando datos experimentales disponibles en literatura tanto del congelamiento, solubilidad y la temperatura de transición vítrea de la mezcla.
- (2) Posteriormente se incluyen en el SPD los datos experimentales disponibles de viscosidades a diferentes temperaturas y concentraciones, con el fin de reconocer aquellos que se encuentran en el régimen sobresaturado.
- (3) Mediante la temperatura característica  $T'_g$  se propone una forma matemática de la temperatura de transición vítrea como función de la concentración  $T_g(c)$  para las distintas soluciones.
- (4) Utilizando la información experimental disponible de la viscosidad en el régimen sobresaturado y  $T_g(c)$  se propone una expresión para viscosidad en términos de la variable reducida  $(T_g(c)/T)^2$  en el régimen sobresaturado, siguiendo la metodología propuesta para un líquido sobreenfriado.

## 4.1. El diagrama de fases suplementario SPD

En un SPD se incluyen regiones dentro y fuera de equilibrio como se observa en el diagrama de la figura 4.1. Para analizar la región sobresaturada de la solución, que se encuentra fuera de equilibrio, se construye el SPD para los sistemas estudiados en este trabajo a partir de información experimental recopilada de la literatura.

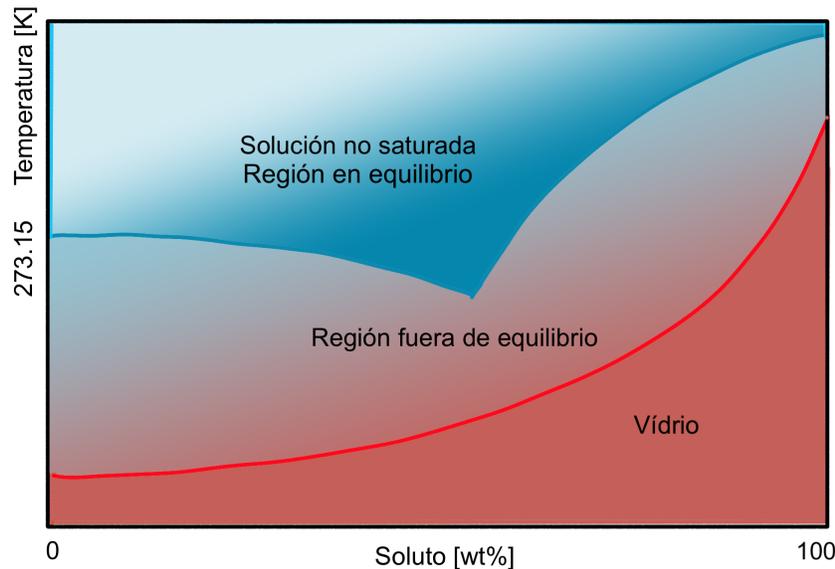
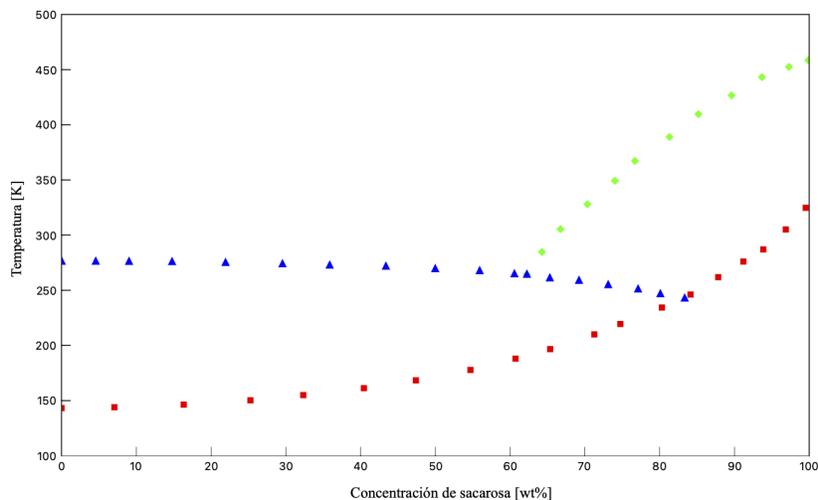


Figura 4.1: Diagrama de fases suplementario formado por una solución de agua y una sustancia polihidroxilada.

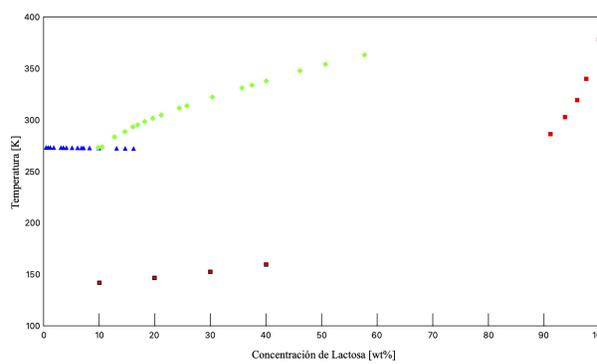
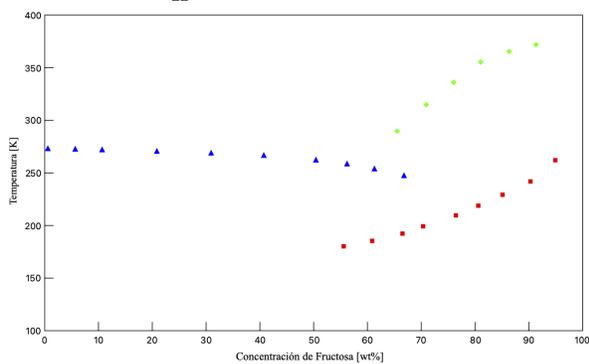
Como primer paso construimos los SPD para soluciones acuosas de sacarosa 4.2a, fructosa 4.2b, lactosa 4.2c y trehalosa 4.2d. Los diagramas se construyen a partir de información experimental reportada por diversas fuentes. Las temperaturas de congelamiento del agua ( $\blacktriangle$ ) que conforman la llamada freezing o liquidus curve son relativamente factibles de medir, pues en este caso el agua congela fácilmente en la solución diluida, sin embargo, para el caso de la solubilidad ( $\blacklozenge$ ) en este tipo de soluciones anómalas es mucho más difícil de medir experimental y teóricamente.

En el caso de las temperaturas de transición vítrea a distintas concentraciones ( $\blacksquare$ ) que se dibujan en los SPDs de la figura , las mediciones son obtenidas a partir de distintas metodologías. Sin embargo, a pesar de las discrepancias que se puedan encontrar, los diagramas muestran claramente las regiones dentro y fuera de equilibrio como en el esquema de la figura 4.1 que es lo que esperábamos encontrar.

Para reconocer las viscosidades en el régimen sobresaturado, dado que para algunas temperaturas y concentraciones no se cuenta con información experimental sobre la curva de solubilidad. Se propone definir esta frontera mediante el estudio del cambio de tendencia en la viscosidad mediante un diagrama  $\text{Log}(\eta)$  vs  $(T_g/T)$ . Es decir, se propone un análisis local de la gráfica de Angell [84] como se presenta en la sección 4.3. Para lo cuál, es necesario previamente estimar los valores de la temperatura de transición vítrea de la mezcla en

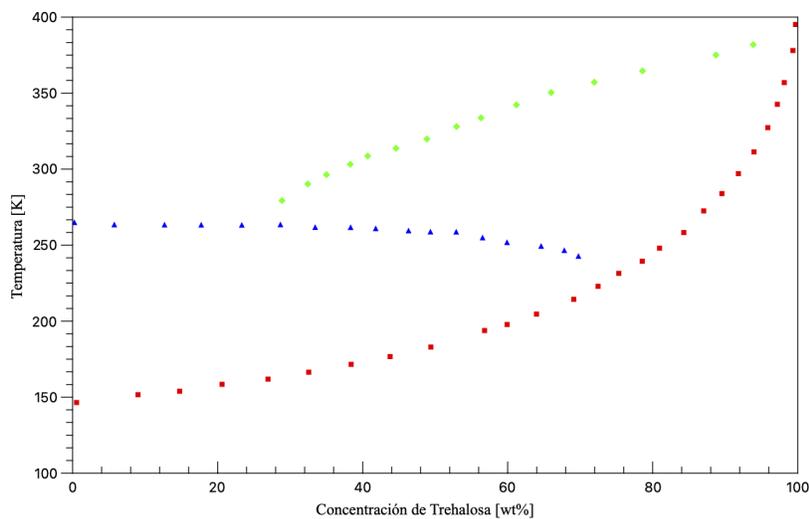


h (a) SPD: agua - sacarosa [223, 224].



(b) SPD: agua - fructosa [179, 214, 222, 225].

(c) SPD: agua - lactosa [12, 119, 217, 226, 227].



(d) SPD: agua - trehalosa [120, 225, 228, 229].

Figura 4.2: Diagramas de fase suplementario SPD de mezclas binarias de agua y azúcares donde se incluyen la curva líquidus ▲ la solubilidad ◆ y la temperatura de transición vítrea ■.

términos de la concentración.

## 4.2. La temperatura de transición vítrea como función de la concentración en las mezclas binarias

Las temperaturas de transición vítrea para distintas soluciones acuosas de azúcar en función de la concentración se muestran en la figura 4.3. Los datos experimentales mostrados en las figuras son obtenidos de diversas fuentes. Los valores de  $T_g$  reportados se obtienen regularmente a partir de un proceso de calentamiento a razón de entre 10 y 40°C/min en un intervalo de temperaturas donde la capacidad calorífica sufre una inflexión con la temperatura. Por lo tanto, la temperatura de transición vítrea se puede tomar en el inicio, el punto medio o el final de dicho termograma. La figura 4.3 se construye con datos experimentales disponibles reportados a partir de diferentes mediciones experimentales siguiendo distintas metodologías.

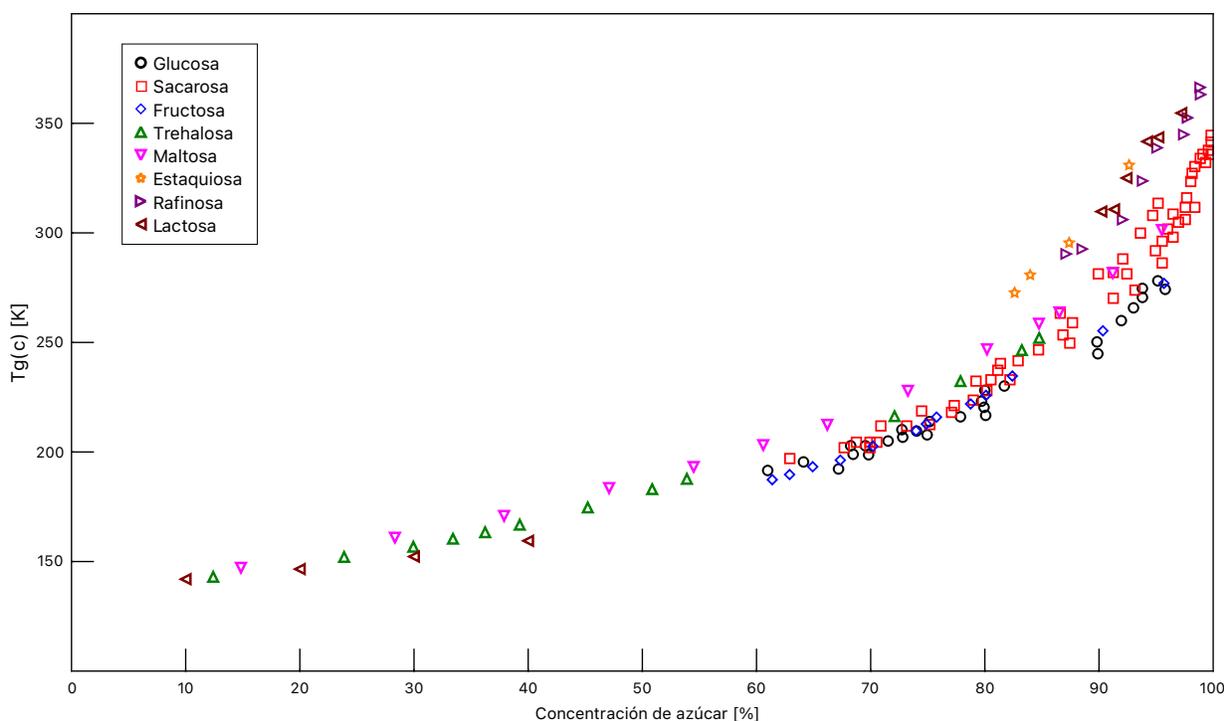


Figura 4.3: Temperatura de transición vítrea de distintas mezclas acuosas de azúcares: glucosa [166,230], fructosa [231], trehalosa [120,166], estaquiosa [232], lactosa [226,227], rafinosa [233], maltosa [205], sacarosa [166,234]

Dado la importancia del parámetro  $T'_g$  en este tipo de soluciones anómalas se propone usar esta temperatura para estimar  $T_g(c)$  tal que,

$$\left(\frac{T'_g}{T_g}\right)^2 = Ac + B \quad (4.1)$$

donde  $c$  es la concentración de azúcar en la solución,  $A$  y  $B$  son parámetros ajustables.  $T'_g$  es descrita como la temperatura de la máxima concentración de hielo en una solución acuosa de azúcar, por lo que este valor se estima ya sea como la intersección de la curva líquida de equilibrio con la curva de transición vítrea en el SPD o mediante

una medición experimental. La variable en la ecuación lineal propuesta es  $(T'_g/T)^2$ .  $T'_g$  está descrito por F. Franks [?] como un punto cuasi-invariante  $(T'_g, c'_g)$  en el SPD [235]. Este valor, se ha estimado en algunos trabajos por medio de correlaciones empíricas [236,237].

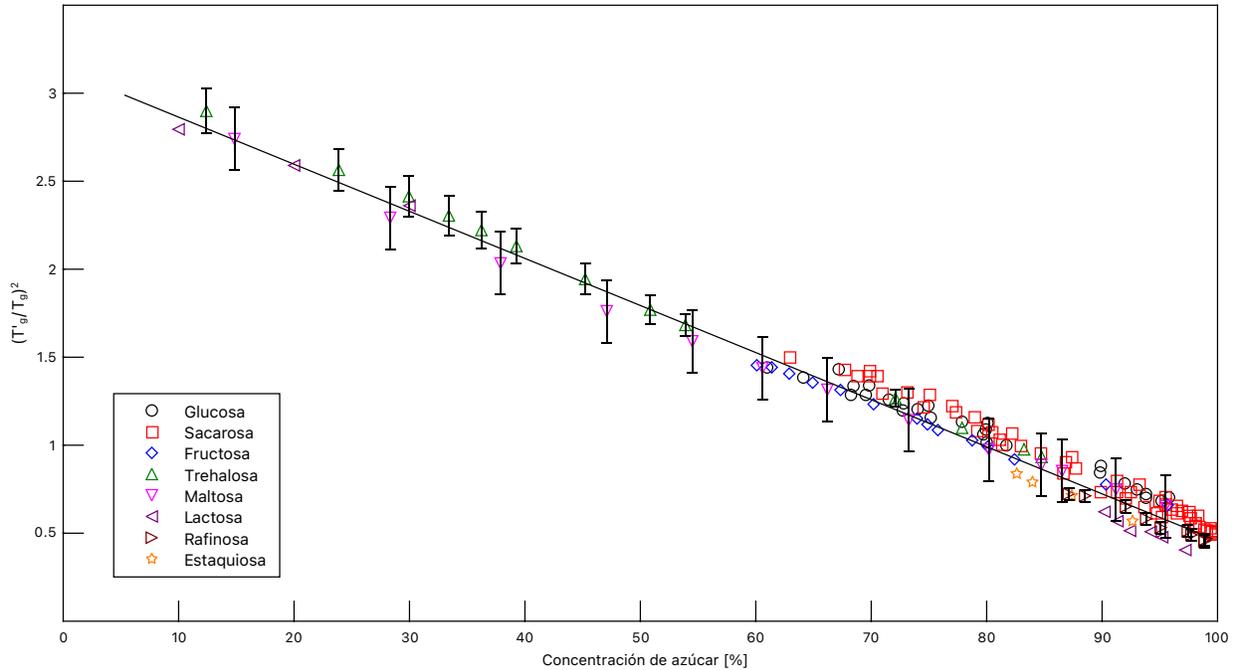


Figura 4.4: Gráfica de  $(T'_g/T)^2$  vs (%c) de las soluciones de azúcar de la gráfica 4.3.

Se ha demostrado que este valor de  $T'_g$  en la solución acuosa aumenta con el peso molecular de algunos malto-oligosacáridos a partir de mediciones experimentales de DSC con muestras de 20 % de azúcar [138]. Slade y Levine reportan una serie de valores experimentales de  $T'_g$  para distintas mezclas [238–240]. Dado que este parámetro está relacionado con un proceso cinético, no es un valor único al igual que  $T_g$ , por lo que el intervalo de temperaturas reportadas podría variar de 5 a 10 grados [236]. Estas discrepancias aumentan según la medición calorimétrica tomada. Por ejemplo, para soluciones acuosas de fructosa, la temperatura reportada por Roos et al [172] es de  $-57^\circ\text{C}$  tomada en el inicio del termograma, Slade y Levine informaron  $-41^\circ\text{C}$  en el punto final y Ablett et al [231] informaron  $-48^\circ\text{C}$  con un  $c'_g$  del 79%. Se encuentran discrepancias similares para soluciones binarias acuosas de agua-trehalosa [228] y para otras mezclas binarias acuosas [129].

En la Figura 4.4 se presenta la variable reducida  $(T'_g/T)^2$  en función de la concentración  $c$  para ocho soluciones diferentes de azúcar en agua. Los valores tomados en este trabajo son aquellos reportados experimentalmente por L. Slade and H. Levine [136, 238] reportados en la Tabla 4.1 donde además se incluyen los valores de las pendientes y las intersecciones para cada solución de azúcar. Con esta nueva variable, la temperatura de transición vítrea de la mezcla como función de la concentración se puede escribir como,

$$T_g(c) = \frac{T'_g}{\sqrt{Ac + B}} \quad (4.2)$$

Azúcar	$T'_g$ [K]	$A$	$B$
Glucosa	230	-0.023	2.903
Sacarosa	241	-0.028	3.388
Fructosa	231	-0.024	3.015
Trehalosa	243.5	-0.027	3.200
Maltosa	243.5	-0.025	3.007
Lactosa	245	-0.028	3.136
Estaquirosa	249.5	-0.026	3.006
Rafinosa	246.5	-0.023	2.780

Cuadro 4.1: Parámetros del ajuste lineal a partir de la temperatura reducida de transición vítrea en función de la concentración de azúcar de la Figura 4.4. Los valores de la concentración máxima de congelación  $T'_g$  y los parámetros del ajuste lineal de la ecuación 4.2 para cada solución acuosa de azúcar.

A partir del análisis de los parámetros de ajuste lineal  $A$  y  $B$  en la Tabla 1, a cierta concentración  $c_1$ , la temperatura de transición vítrea es proporcional a  $T'_g$ .

Esta ecuación propuesta se ajusta a distintas de concentraciones desde un 10 % de azúcar en el caso de trehalosa, maltosa y lactosa acuosas. Comparando la ecuación lineal propuesta en soluciones de glucosa, la temperatura experimental de transición vítrea para la solución de glucosa con 60 % de concentración de azúcar es de 190.5 K y la temperatura calculada por la ecuación propuesta es de 186.46, el valor informado con el modelo GT es de 179.36 tomando los parámetros de ajuste reportados por Constantin et al. [166] con el  $T_{g2} = 304$  K, el  $T_{g1} = 138$  K y el parámetro de ajuste  $K = 4.5$  de la ecuación Gordon-Taylor. Por lo tanto, a pesar de que la temperatura calculada para este caso está cuatro grados por debajo de la medición experimental, es una buena aproximación.

Las temperaturas de transición vítrea de mezclas acuosas binarias se han modelado recurriendo a enfoques teóricos basados en la teoría del volumen libre de los líquidos.

#### 4.2.1. La temperatura de transición vítrea como función de la concentración en los alimentos

Los alimentos son mezclas complejas de sólidos y agua, mientras que los polímeros se componen principalmente de unidades repetidas de moléculas bien caracterizadas. Sin embargo, la ciencia de polímeros ha sido base para caracterizar a ciertos alimentos, lo cuales pueden ser caracterizados mediante ciertas propiedades termodinámicas [130, 138, 241].

El aumento del volumen libre en los polímeros aumenta el movimiento de la molécula provoca una disminución de la temperatura de transición vítrea y este efecto lo causa un llamado plastificante como lo es el agua en los alimentos. El estudio de la relación de diferentes propiedades termodinámicas en polímeros como el coeficiente de expansión térmica y el volumen específico en función de la temperatura con su estructura molecular permiten el desarrollo de conceptos y teorías.

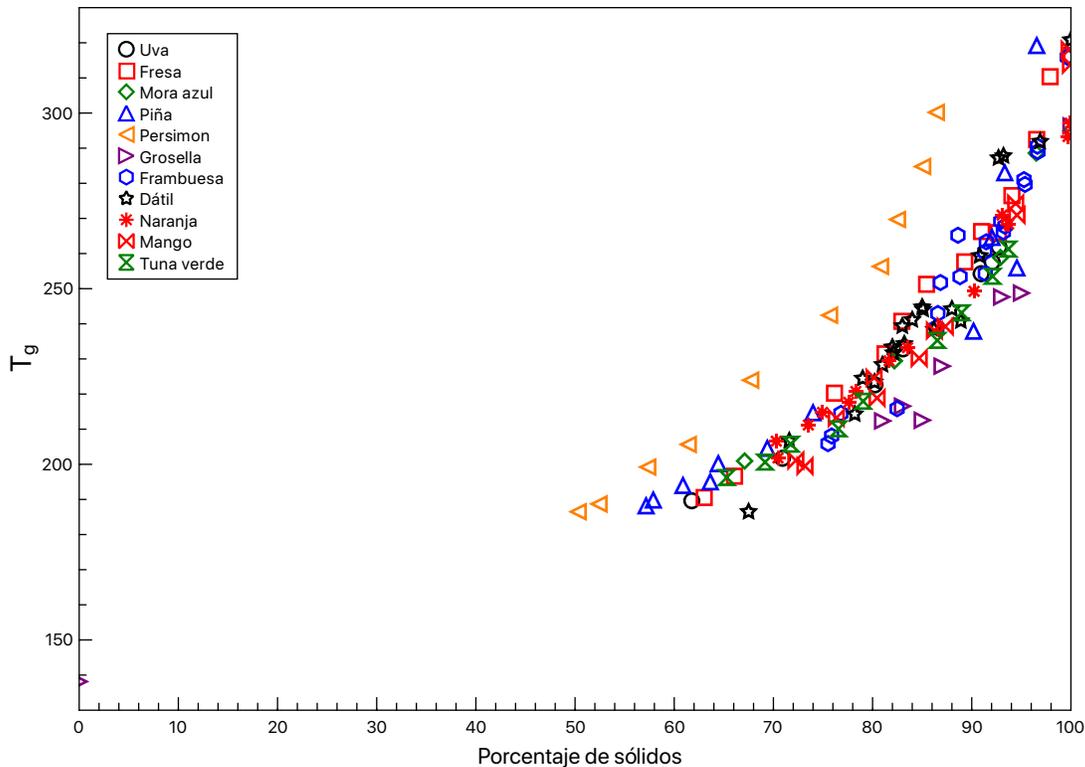


Figura 4.5: Temperatura de transición vítrea como función del porcentaje de sólidos para distintos alimentos dulces.

Un plastificante facilita el movimiento de moléculas grandes en el sistema y la vitrificación. Las teorías sobre este efecto plastificante se desarrollaron a mediados del siglo XX. En particular, se adaptó la teoría del volumen libre para explicar los efectos viscosos. Proporcionando una descripción termodinámica y matemática del mecanismo de los plastificantes [242].

La teoría del volumen libre explica satisfactoriamente la disminución de la temperatura de transición vítrea con el aumento del plastificante. Los modelos matemáticos presentados se basan en la descripción de la temperatura de transición vítrea de la mezcla, polímero y plastificante, con su correspondiente temperatura de transición vítrea respectivamente. Así, a menor agua, menor volumen libre, menor movimiento molecular, menor degradación de los alimentos y una mayor temperatura de transición vítrea. Este efecto en el aumento de la temperatura de transición vítrea con la disminución del agua se observa en la figura 4.5 construida a partir de mediciones experimentales reportadas por diversas fuentes [243–248].

El modelo más utilizado en la ciencia de alimentos es el conocido por Gordon y Taylor en 1952 [249]. Por tanto, en este trabajo al igual que las mezclas de azúcares se propone utilizar la ecuación 4.2 para el estudio de la temperatura de transición vítrea como función de la concentración de sólidos en los alimentos.

Como se observa en la figura 4.6, al igual que para las mezclas binarias, mediante el parámetro  $T'_g$  se sigue una tendencia lineal para estos alimentos dulces. En la tabla 4.2 se reportan estos valores y los parámetros correspondientes.

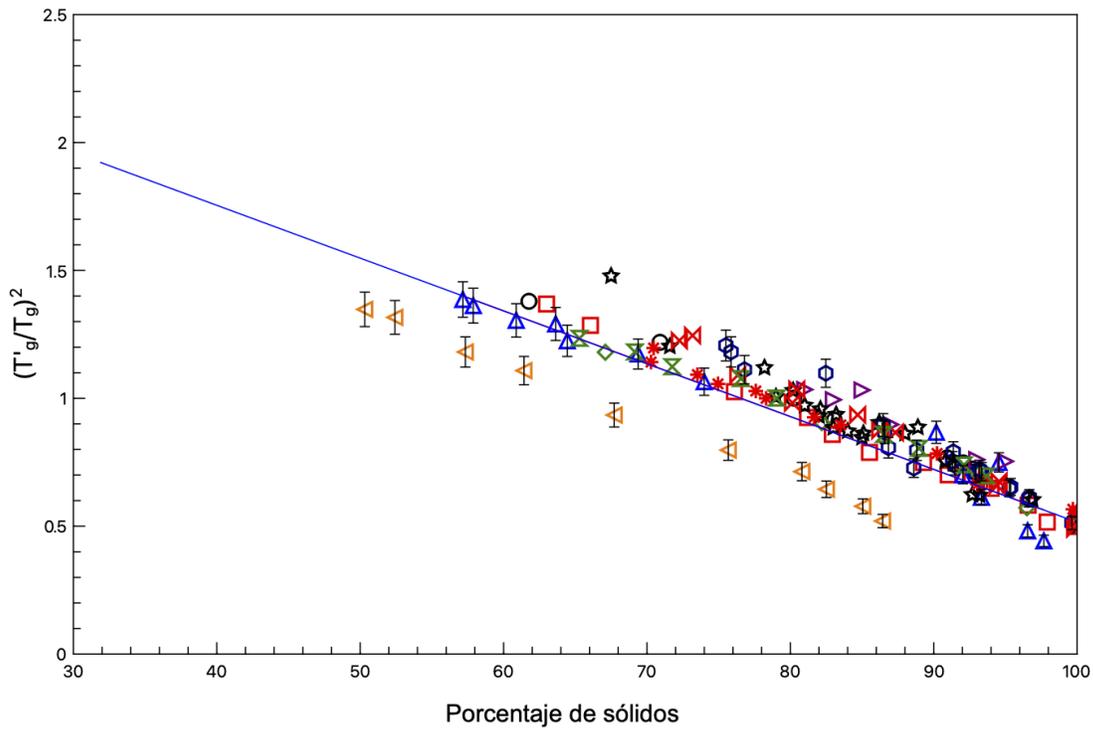


Figura 4.6: Gráfico de  $(T'_g/T_g)^2$  como función del porcentaje de sólidos para distintos alimentos dulces.

Fruta	$T'_g$	$A$	$B$
Uva	222.7	-0.021	2.718
Fresa	222.9	-0.023	2.800
Mora azul	218.35	-0.019	2.509
Piña	221.5	-0.020	2.582
Persimon	216.5	-0.024	2.754
Grosella	215.9	-0.022	2.461
Frambuesa	226.15	-0.026	3.176
Datil	225.15	-0.027	3.264
Naranja	220.75	-0.027	3.222
Mango	218.55	-0.026	3.122
Tuna	218.05	-0.019	2.542

Cuadro 4.2: Valores de  $T'_g$  y los parámetros de la expresión lineal para distintos alimentos.

### 4.3. El régimen sobresaturado en las mezclas de azúcar: estimación de una frontera

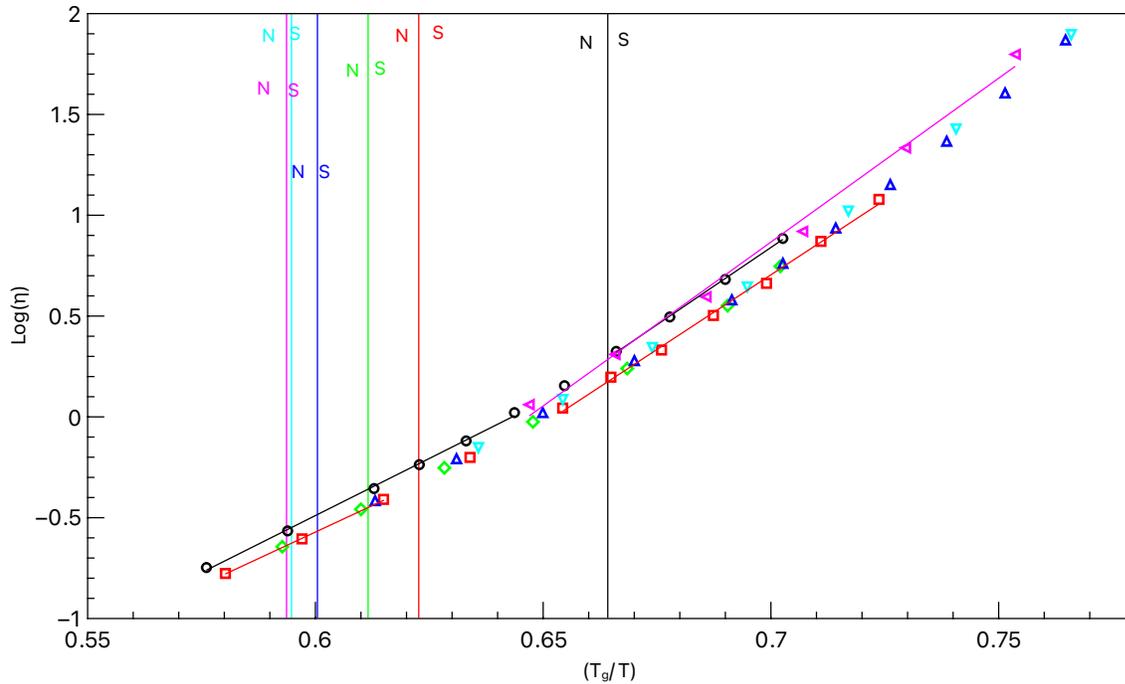


Figura 4.7: El logaritmo de la viscosidad de la solución acuosa de sacarosa en función de la temperatura reducida  $(T_g/T)$  a diferentes concentraciones:  $\circ$  65,  $\square$  70,  $\diamond$  72,  $\triangle$  75,  $\nabla$  78,  $\blacktriangleleft$  80. Las soluciones se vuelven sobresaturadas alrededor de las líneas verticales  $T_g/T_s$  para cada caso, los valores se reportan en la tabla.

Como se estudió en el capítulo de la termodinámica de las soluciones, en el caso del sistema binario sólido-líquido uno de los diagramas de fase que se puede encontrar para este caso es el eutéctico simple donde por debajo de cierta temperatura y composición eutécticas, la solución líquida se precipita en una mezcla sólida de cristales de ambos compuestos. Sin embargo, al estudiar los procesos de cristalización como método de purificación de sustancias se encontró que en algunos casos muy particulares este procedimiento tiene que ser inducido ya que naturalmente se tiende a la sobresaturación hasta formar un vidrio en lugar de precipitar como se encontró para los azúcares. Existen dificultades experimentales para realizar mediciones de algunos datos sobre la hipotética curva de saturación en el SPD. Así, dado que la curva de solubilidad en un diagrama eutéctico describe los estados de equilibrio que se encuentran en una mezcla binaria simple y las soluciones acuosas de azúcar inhiben la cristalización, se propone estimar esta curva en otros términos, mediante el análisis de la viscosidad en el régimen no saturado y el sobresaturado.

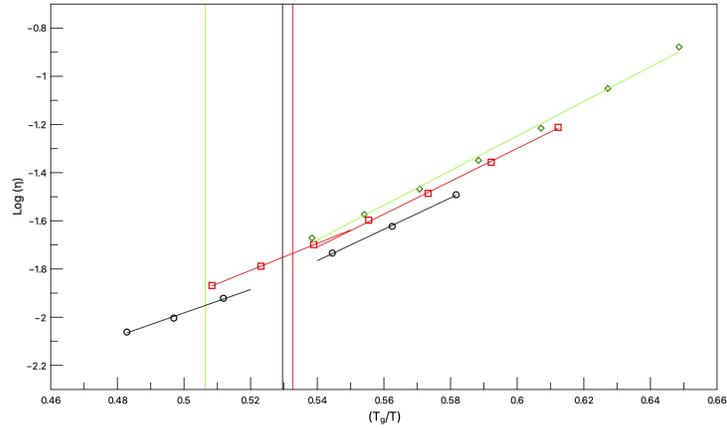
Al no existir una frontera ni una condición de equilibrio termodinámica entre las regiones no saturada y sobresaturada, proponemos encontrar una vecindad para una concentración dada donde puede ocurrir el cambio. Al estar el régimen sobresaturado proponemos analizar el cambio de la viscosidad alrededor de esta vecindad. En la figura 4.7 se muestra una

Azúcar	Concentración $c$	$T_g/T_m$	Regimen no saturado	Regimen sobresaturado
			$r_{promNS}$	$r_{promSS}$
Lactosa	20	0.5295	4.842	3.3498
	30	0.5327	5.576	6.828
	40	0.5064		7.181
Trehalosa	38.3	0.5513	6.009	8.729
	39.2	0.5493		10.606
	48.1	0.5696	6.048	9.65
	54.85	0.5751	6.021	10.191
	60.6	0.5862	8.382	11.302
Fructosa	70	0.6497	11.4089	17.6821
	75	0.6382		
	80	0.6406		
	85	0.6566		
Sacarosa	65	0.6641	11.31	15.32
	70	0.622	10.51	14.8
	72	0.611	10.74	14.12
	75	0.6		14.97
	78	0.594		15.73
	80	0.593		15.25
Glicerina	80	0.682	11.483	20.72
	90	0.661	12.451	21.652

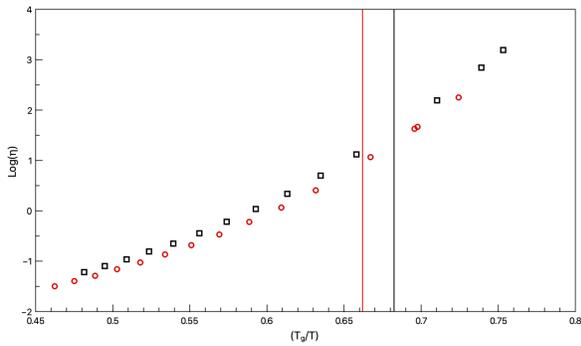
Cuadro 4.3: Los valores correspondientes de concentración, la temperatura de transición vítrea, y la razón de cambio promedio del regimen no saturado al sobresaturado.

gráfica de Angell para el logaritmo de la viscosidad y analizar la razón con la que cambia la viscosidad, a una concentración dada en una vecindad de un punto de saturación medido. El ejemplo mostrado es el caso de una solución acuosa de la sacarosa para varias concentraciones. Para hacer el análisis se calcula la razón de cambio promedio de la viscosidad alrededor las temperaturas reportadas. En la figura 4.8 se muestran los casos para la lactosa, fructosa, trehalosa y glicerina.

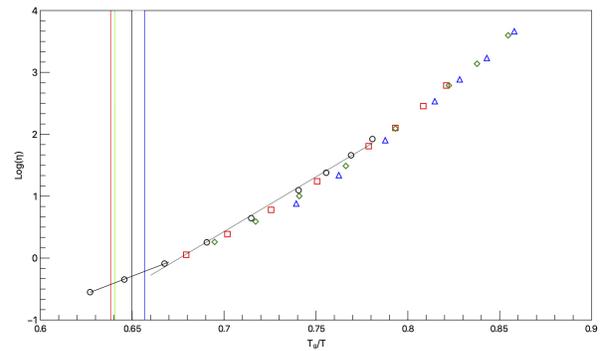
En la tabla 4.3 presentamos las razones de cambio promedio para distintas soluciones. El cambio de regímenes puede ser estudiado en términos del aumento de la viscosidad alrededor de  $T_g/T_m$  donde  $T_g$  es la temperatura de transición vítrea de la mezcla y  $T_m$  la temperatura de fusión de la mezcla a una concentración dada respectivamente. La comparación entre las razones a la izquierda  $r_{promNS}$  y la derecha  $r_{promSS}$  nos indica el cambio de la viscosidad.



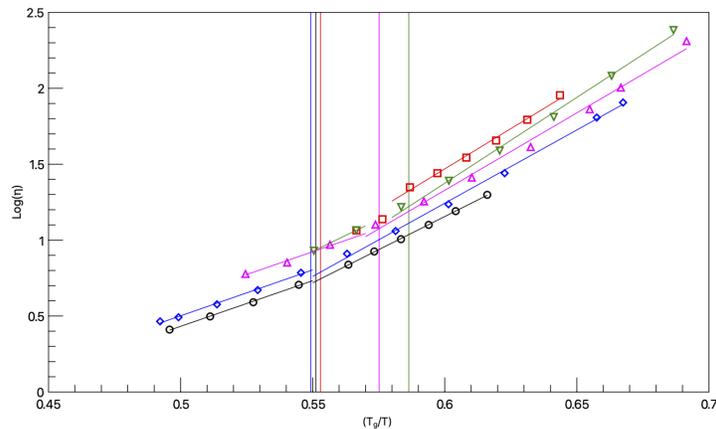
(a)  $\text{Log}(\eta)$  vs  $(T_g/T)$  para concentraciones de  $\circ$  30,  $\square$  40,  $\diamond$  50 del porcentaje en peso de lactosa.



(b)  $\text{Log}(\eta)$  vs  $(T_g/T)$  para concentraciones a concentraciones de  $\circ$  80 y  $\square$  90 por ciento en peso de glicerina.



(c)  $\text{Log}(\eta)$  vs  $(T_g/T)$  para concentraciones de  $\circ$  70,  $\square$  75,  $\diamond$  80,  $\triangle$  85 de fructosa.



(d)  $\text{Log}(\eta)$  vs  $(T_g/T)$  para concentraciones para concentraciones  $\circ$  38.3,  $\square$  39.2,  $\diamond$  48.1,  $\triangle$  54.85,  $\nabla$  60.6 de porcentaje en peso de trehalosa.

Figura 4.8: Razón de cambio de la viscosidad al pasar del regimen no saturado (U) al sobresaturado (S).

## UNIVERSALIDAD EN LA VISCOSIDAD DE LAS SOLUCIONES SOBRESATURADAS DE AZUCARES

Una vez que se construyen los SPDs para las soluciones estudiadas y se reconoce la región fuera de equilibrio, la región sobresaturada. Se incorporan a los diagramas las temperaturas y concentraciones de las viscosidades reportadas experimentalmente en diversos artículos de investigación disponibles en literatura como se observa en la figura 5.1 para la sacarosa y en la figura 5.2 para las demás azúcares, trehalosa, lactosa y fructosa.

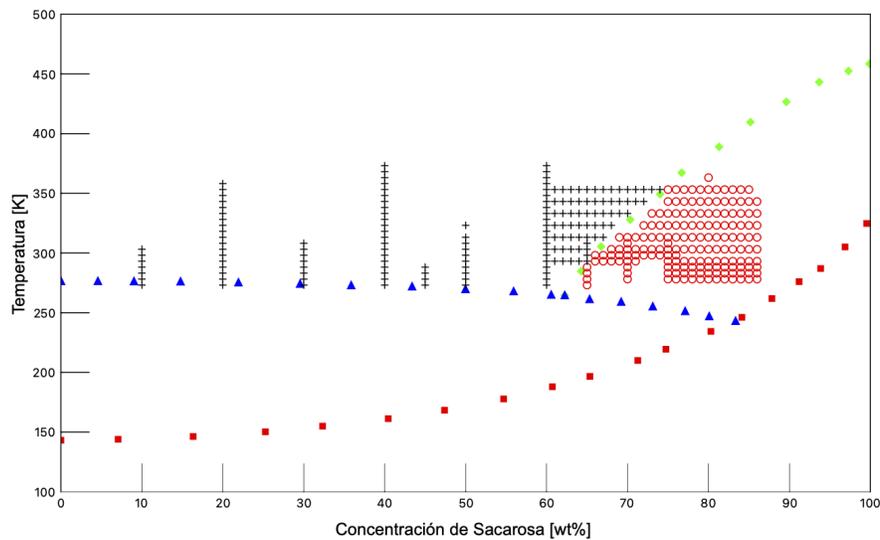
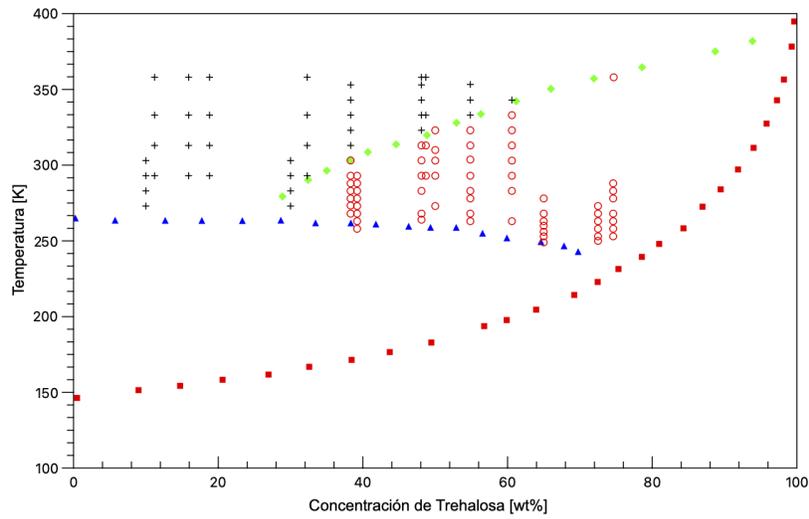
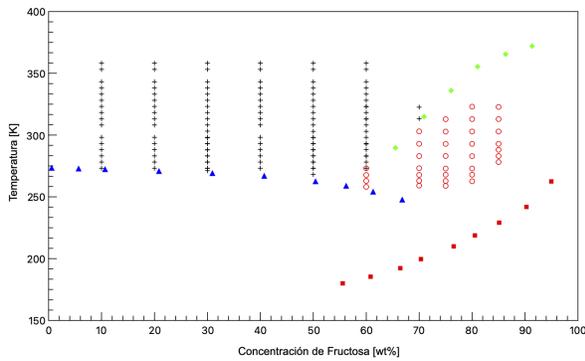


Figura 5.1: Diagrama de fase suplementario SPD de la mezcla binaria de agua y sacarosa donde se incluyen la congelación ▲ la solubilidad ◆, la temperatura de transición vítrea ■ así como la viscosidad en los regímenes no saturado + y sobresaturado ○ [215, 223, 224].

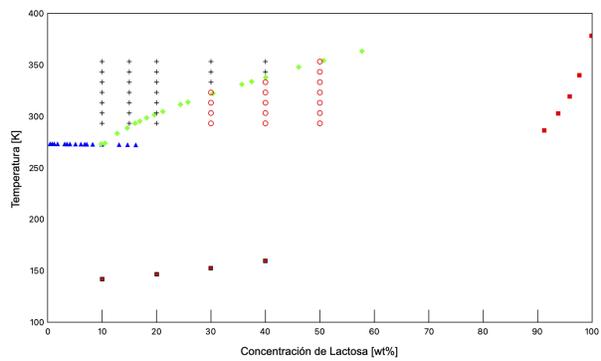
Como se observa, para todas las soluciones se dispone de mediciones de la viscosidad en los dos regímenes no saturado (+) y en el sobresaturado (○). Los datos de viscosidad para la solución de lactosa 5.2c incluyen solo tres concentraciones diferentes: 30, 40 y 50 % en peso, debido a las dificultades experimentales [217] dado que esta azúcar es menos soluble que otras [250] pero son suficientes para realizar su análisis.



h (a) SPD: agua - trehalosa [120, 215, 225, 228, 229].



(b) SPD: agua - fructosa [179, 214, 222, 225].



(c) SPD: agua - lactosa [12, 119, 217, 226, 227].

Figura 5.2: Diagramas de fase suplementario SPD de mezclas binarias de agua y azúcares donde se incluyen la congelación  $\blacktriangle$  la solubilidad  $\blacklozenge$ , la temperatura de transición vítrea  $\blacksquare$  así como la viscosidad en los regímenes no saturado  $+$  y sobresaturado  $\circ$ .

## 5.1. La viscosidad en las soluciones sobresaturadas de azúcares

A partir del comportamiento de la viscosidad y su dependencia con la temperatura y la concentración se ha mostrado que la dependencia de este coeficiente de transporte satisfacen las mismas ecuaciones teóricas que los líquidos sobreenfriados frágiles por lo que pueden ser descritas a través de las ecuaciones utilizadas para explicar el comportamiento de los líquidos frágiles simples sobreenfriados. En la figura 5.3 se muestra esta dependencia de la viscosidad con la temperatura  $\eta(T)$  para una mezcla de agua y sacarosa a concentración constante.

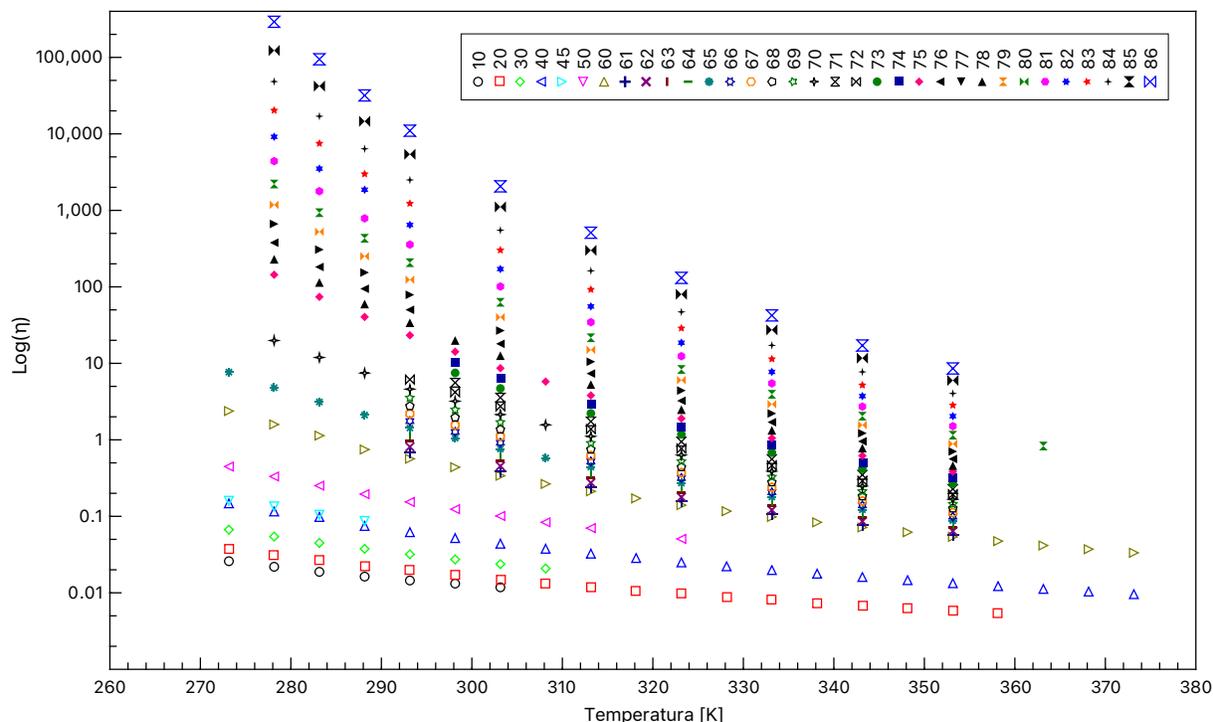
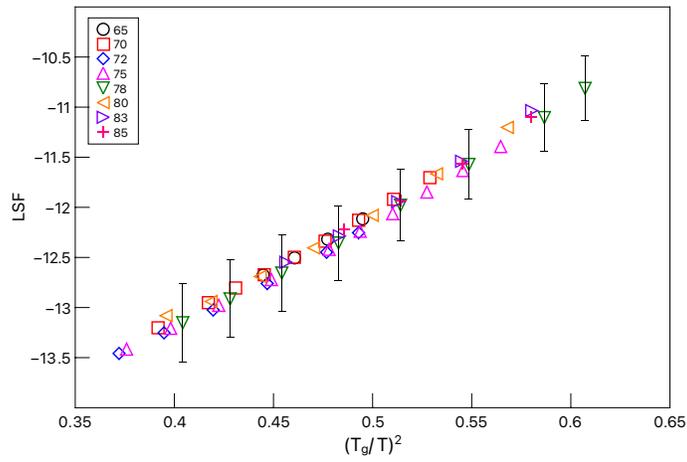


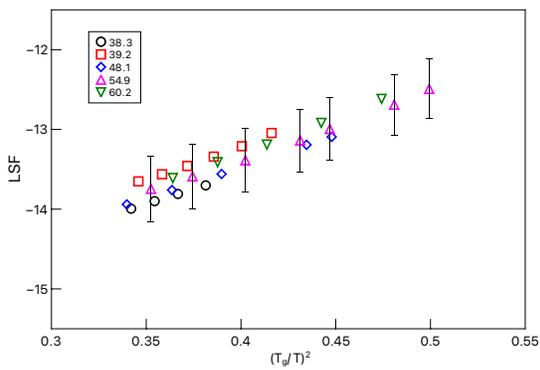
Figura 5.3: Viscosidad de la solución de agua y sacarosa como función de la temperatura a distintas concentraciones.

En la Figura 5.4, separamos los valores de las viscosidades para los regímenes no saturado y sobresaturado para para soluciones de sacarosa, fructosa, trehalosa y lactosa incluyéndolos en el SPD respectivo presentado en la figura 4.2. Dado que la región sobresaturada ha sido descrita como frágil [84], trazamos la en la Figura 5.4 el *LSF* para los datos de viscosidad en este régimen, en todos los casos en función de la temperatura, para diferentes concentraciones, en términos de la variable reducida  $(T_g/T)^2$  para verificar si la viscosidad de las soluciones en esta región sigue una ecuación tipo *WLF*, es decir la ecuación propuesta 2.11. Para diferentes concentraciones, el *LSF* puede representarse mediante funciones lineales, aparentemente con pendientes similares pero con diferentes intersecciones. La temperatura de transición vítrea  $T_g(c)$  mediante la expresión 4.2 utilizando los datos correspondientes de la tabla 4.1 para cada caso.

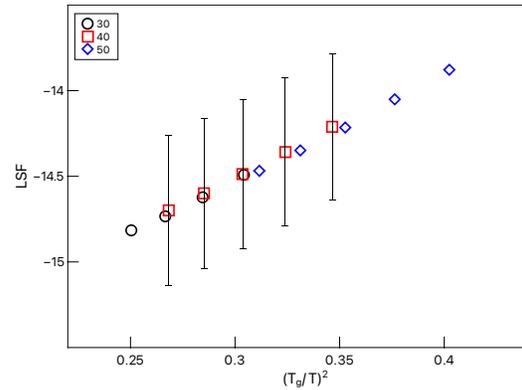
En trabajos previos con formadores de vidrio sobreenfriados simples y frágiles, se ha reportado un comportamiento universal. Para verificar la posibilidad de encontrar un comporta-



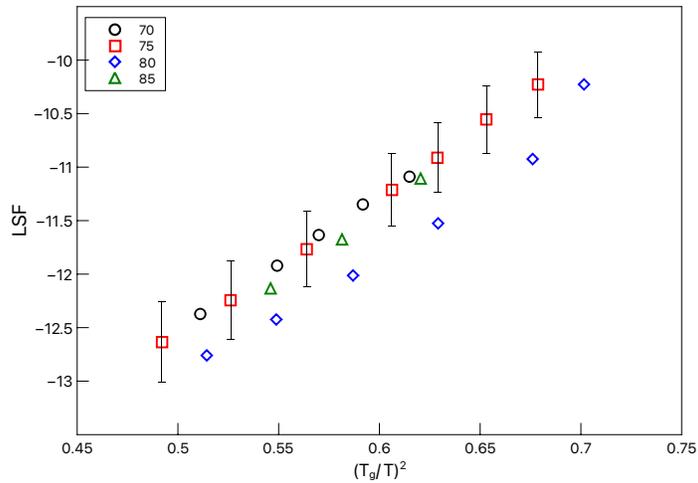
(a)  $LSF$  para soluciones sobresaturadas de agua y sacarosa.



(b)  $LSF$  para soluciones sobresaturadas de agua y trehalosa.



(c)  $LSF$  para soluciones sobresaturadas de agua y lactosa.



(d)  $LSF$  para soluciones sobresaturadas de agua y fructosa.

Figura 5.4:  $LSF$  vs  $(T_g/T)^2$  para distintas soluciones acuosas sobresaturadas de azúcares. Barras de error del 3%.

miento universal similar entre diferentes soluciones azúcar-agua en el régimen sobresaturado, aplicamos el mismo procedimiento que el utilizado anteriormente para obtener los estados correspondientes mediante la construcción de gráficas maestras [92,93] para cada solución de azúcar. Para lo cual se elige una nueva temperatura de referencia  $T_b$  tal que todas las rectas que representan el  $LSF$  caigan en una sola, sumando un factor  $\psi$  a cada ecuación a una concentración determinada, así,

$$LSF_{T_b} = \log \frac{\eta(T)}{\eta(T_b)} = LSF_{T_g} + \psi$$

que se reescribe como

$$LSF_{T_b} = \log \frac{\eta(T)}{\eta(T_g)} = \log \frac{\eta(T_g)}{\eta(T_b)} = m \left( \frac{T_g}{T} \right)^2 + b(T_g) + \psi$$

por tanto,

$$\psi = \log \frac{\eta(T_g)}{\eta(T_b)} = -\log \frac{\eta(T_b)}{\eta(T_g)} = -m \left( \frac{T_g}{T} \right)^2 - b(T_g)$$

así, podemos encontrar en cada caso el valor de  $T_b$

$$T_b = \left[ \sqrt{\frac{-(b(T_g) + \psi)}{m}} \right]^{-1} = fT_g$$

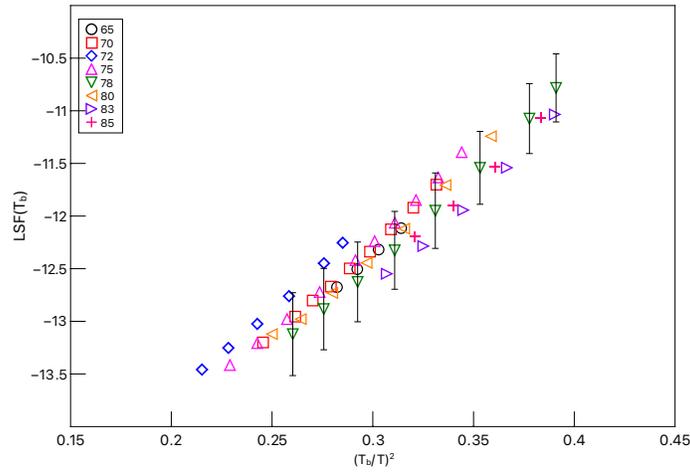
Este procedimiento se desarrolla de igual forma en el capítulo 2 para los líquidos sobreenfriados. Este calculo se repite para todas las concentraciones disponibles. En la figura 5.5 se presentan los gráficos maestros para cada solución y en la tabla 5.1 se reportan los valores correspondientes para cada solución.

Como se observa, hemos obtenido un resultado similar sobre la universalidad para cada solución de azúcar, en el régimen sobresaturado, en términos de concentración, al que obtuvimos anteriormente en el caso de los líquidos sobreenfriados en términos de temperatura.

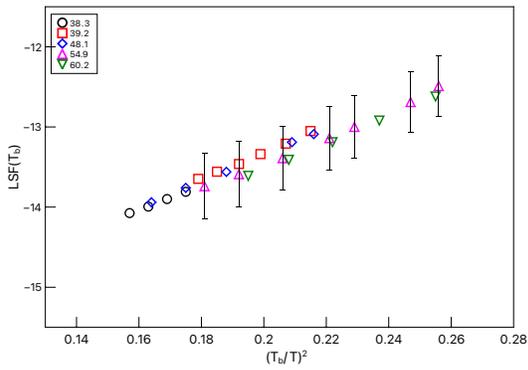
Los parámetros de ajuste lineal se reportan en la tabla 5.1 donde se incluye el factor  $f$  que nos ayuda a relacionar el valor de la nueva temperatura de referencia con la temperatura de transición vítrea correspondiente para cada soluto. Los valores de estos factores son muy similares para diferentes concentraciones. En el caso de líquidos sobreenfriados simples, un valor similar  $f \sim 1.2$ , tenía un significado físico definido en términos de la temperatura de entrecruzamiento. En el caso de soluciones acuosas de azúcar sobresaturadas, actualmente se carece de información experimental sobre los valores de la viscosidad para temperaturas más bajas, por lo que es no se puede predecir cualquier interpretación.

Finalmente, en la Figura 5.7 se presenta el  $LSF(T_b)$  de las soluciones de trehalosa y lactosa. Para establecer una posible universalidad entre distintas azúcares se procede a la construcción de un gráfico maestro adicional para estas dos soluciones de azúcar diferentes (Fig.5.7b). Para esta universalidad se emplea un desplazamiento de -0.23 para trehalosa a nuestros valores de referencia. Siguiendo los cálculos correspondientes a través de  $LSF(T'_b)$ .

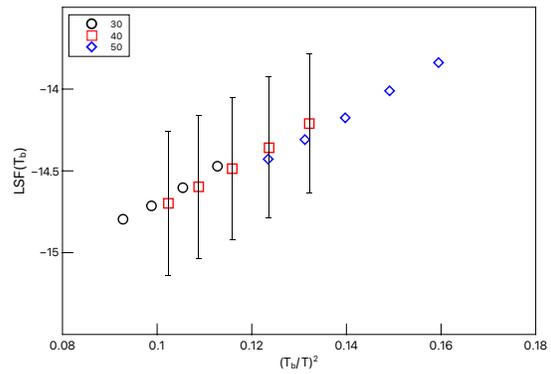
Estos resultados que se muestran en las figuras 5.7 y 5.6 sugieren que la viscosidad de estas



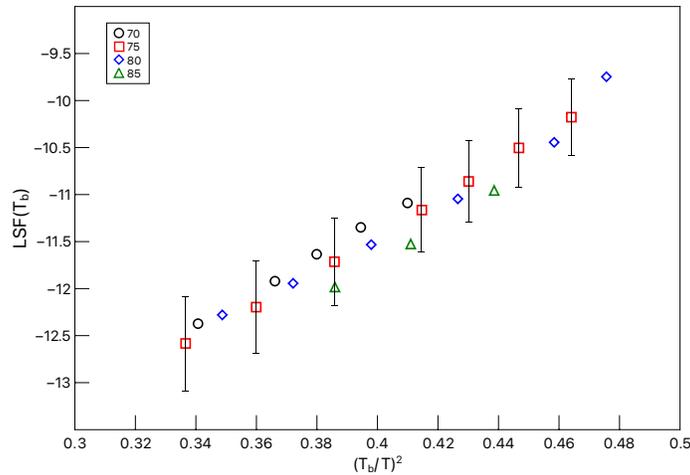
(a)  $LSF(T_b)$  para soluciones sobresaturadas de agua y sacarosa.



(b)  $LSF(T_b)$  para soluciones sobresaturadas de agua y trehalosa.



(c)  $LSF(T_b)$  para soluciones sobresaturadas de agua y lactosa.



(d)  $LSF(T_b)$  para soluciones sobresaturadas de agua y fructosa.

Figura 5.5: Estados correspondientes para los datos de viscosidad de soluciones sobresaturadas en función de la temperatura reducida  $(T_b/T)^2$ . Barras de error del 3%.

Azúcar	Concentración	$T_g(c)$	$\psi$	$m$	$b(T_g)$	$f$	$T_b(c)$
Sacarosa	65	192.18	-0.05	11.164	-17.644	0.797	153.086
	70	202.29	-0.04	10.966	-17.529	0.792	160.184
	72	209.32	0.03	9.91	-17.165	0.76	159.189
	75	216.52	0.03	10.669	-17.475	0.781	169.036
	78	224.53	0.02	11.515	-17.863	0.802	180.172
	80	228.47	-0.04	11.058	-17.552	0.795	181.549
	83	238.54	0	12.222	-18.17	0.82	195.637
	85	246.04	0.03	11.959	-18.055	0.813	200.077
	LSF			14.877	-16.797		
	Fructosa	70	202.32	0	12.519	-18.776	0.816
75		212.54	0.05	13.016	-19.079	0.827	175.776
80		224.47	0.48	12.903	-19.509	0.823	184.835
85		238.67	0.15	13.805	-19.682	0.841	200.662
LSF				14.469	-14.7		
Lactosa	30	161.69	0.02	6.047	-16.337	0.609	98.434
	40	172.57	0	6.249	-16.379	0.618	106.59
	50	185.97	0.04	6.525	-16.508	0.629	117.064
	LSF			14.078	-16.112		
Trehalosa	38.3	165.52	0.4	7.415	-16.529	0.678	112.222
	39.2	166.45	0	8.586	-16.638	0.718	119.572
	48.1	176.69	0.25	7.883	-16.624	0.694	122.59
	54.9	185.85	0.17	8.517	-16.783	0.716	133.063
	60.2	194.88	0.1	9.02	-16.904	0.733	142.779
	LSF			15.028	-16.314		

Cuadro 5.1: Valores correspondientes de  $\psi$  ,  $f$  y la temperatura  $T_b$ .

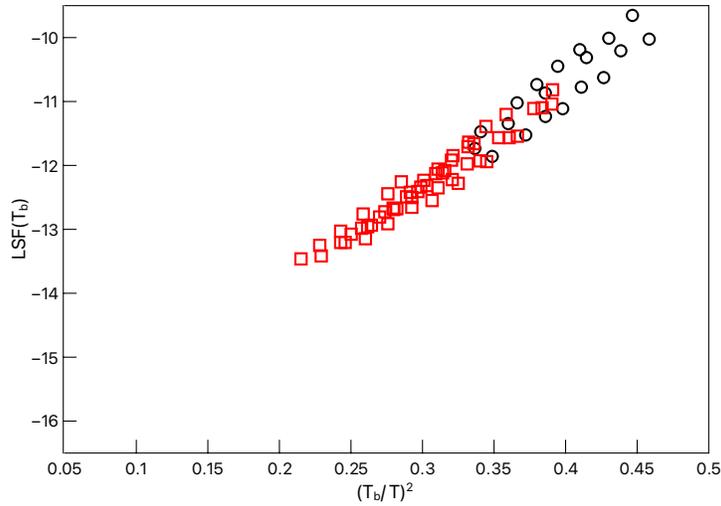
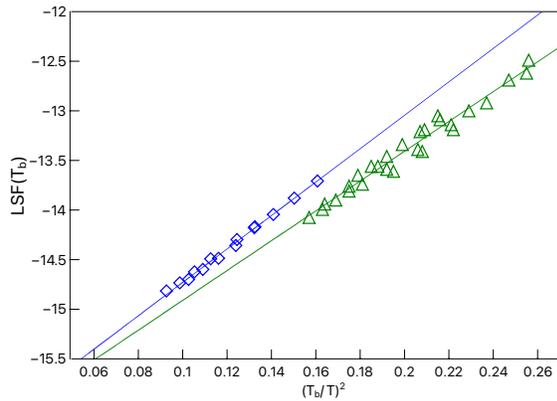
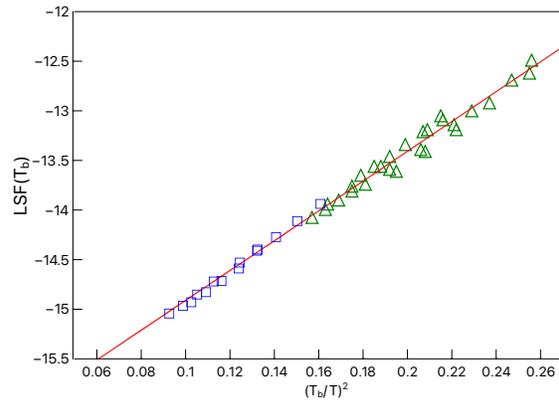


Figura 5.6: Universalidad para las soluciones sobresaturadas de sacarosa  $\circ$  y fructosa  $\square$ .

soluciones, en el régimen sobresaturado, puede tener comportamientos similares. En cuanto a su uso en protocolos de criopreservación para evitar la formación de hielo, se pueden usar diferentes soluciones de azúcar en diferentes concentraciones, para lograr resultados similares.



(a)  $LSF(T_b)$  vs  $(T_b/T)^2$  para la lactosa  $\square$  y la trehalosa  $\triangle$ .



(b)  $LSF(T'_b)$  vs  $(T'_b/T)^2$  para la lactosa  $\square$  y la trehalosa  $\triangle$ .

Figura 5.7: Universalidad para las soluciones sobresaturadas de lactosa y la trehalosa.

---

## LOS AZÚCARES Y SUS APLICACIONES BIOLÓGICAS

---

Algunos seres vivos tienen la habilidad de sobrevivir durante largos períodos de tiempo bajo condiciones de muy bajas temperaturas al no presentar daños por la inhibición de la formación de hielo dentro de sus estructuras. A partir del final del siglo XIX, varios botánicos se dieron cuenta de que algunas plantas sobrevivían las bajas temperaturas del invierno acumulando sus propias azúcares presentando una alta concentración de las mismas en hojas y raíces. Este comportamiento se notó también en otros tipos de organismos tales como la rana del bosque (*Lithobates sylvaticus*) y los tardígrados (*Tardigrada*). Esta sobrevivencia conocida como “animación suspendida” se realiza a través de la deshidratación de parte del organismo y la síntesis de las azúcares presentes generando una transición vítrea. Estos comportamientos naturales llevaron a que varios científicos a principios del siglo XX comenzaran a proponer mecanismos para generar una criopreservación artificial en células y tejidos en el laboratorio emulando esta transición vítrea agregando diferentes tipos de azúcares. Una de las contribuciones más importantes fue realizada por Basile Luyet, quién se basó en los trabajos de Tammann acerca de la transición vítrea. La ciencia de alimentos contribuyó a estos resultados y a las teorías que se generaron.

Al día de hoy, la criopreservación por vitrificación de soluciones acuosas de azúcares tiene muchas aplicaciones tanto para células y tejidos y en la industria farmacéutica así como en la ciencia de alimentos. En este trabajo se presentan aplicaciones en los dos primeros campos. Las aplicaciones en la ciencia de alimentos utilizando nuestros resultados es un trabajo que aún se encuentra en proceso.

### 6.1. La relevancia de los azúcares en los procesos de criopreservación por vitrificación

El agua es esencial en la vida y está presente tanto dentro como fuera de las células en una cantidad mayor al 70%, por lo que se suele decir que las células son pequeños sacos de agua. El contenido de agua adecuado es factor clave en el correcto funcionamiento de los organismos. Las propiedades fisicoquímicas del agua como por ejemplo una menor densidad en estado sólido, y como consecuencia la flotación del hielo en la superficie, permiten la vida en el fondo de las aguas.

La preservación de células, tejidos u órganos se realiza a bajas temperaturas, donde bajas temperaturas son aquellas denominadas criogénicas por debajo de 0°C. En la figura 6.1 se describe brevemente algunas de los efectos de las bajas temperaturas en los sistemas biológicos.

El desarrollo de la preservación celular se vio impulsada por la tecnología de bajas temperaturas a finales del siglo XIX, como la del helio o nitrógeno líquido ( $\sim -200\text{C}$ ) [251]. Sin

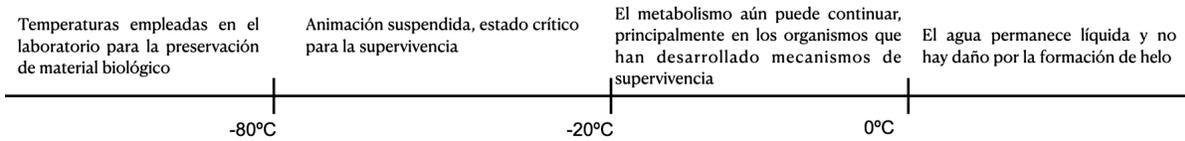


Figura 6.1: Intervalos de temperatura y las distintas implicaciones en los sistemas biológicos.

	Proceso	CPAs	Tiempo de almacenamiento	Tipo de célula y desafíos
Almacenamiento hipotérmico	Isotérmico $\sim 4C$	PBS, sales, etc.	periodos cortos ( días)	células (glóbulos rojos)
Criopreservación	Enfriamiento lento $(0.1 - 50)^{\circ}C/min$	Bajas concentraciones de CPAs	Largos periodos de tiempo, temperaturas bajas $\sim -150C$	células reproductivas
Vitrificación	Enfriamiento rápido $> 100C/min$	Altas concentraciones de CPAs	Largos periodos de tiempo vitrificadas, temperaturas bajas $\sim -150C$	embriones, células madre, reproductivas, tejidos, órganos.

Cuadro 6.1: Distintos procesos de preservación.

embargo, sus orígenes se remontan a los estudios y observaciones en los procesos adaptativos desarrollados por diversos organismos en la naturaleza a inicios del siglo XX [252]. Estos mecanismos de supervivencia son procesos adaptativos de conservación desarrollados por las condiciones extremas del medio ambiente [253], los cuales se dividen en dos principales grupos: la tolerancia al hielo formado y la prevención a la formación de hielo. Siendo el hielo, el principal enemigo de la célula a temperaturas bajo cero, ya que causa muerte celular. Uno de los ejemplos más interesantes es una tolerancia natural desarrollada en al menos cuatro especies de ranas que hibernan en tierra como la rana *sylvatica* [254]. De hecho, fue en la década de 1880, cuando Muller y Thurgau documentaron la relación entre la formación de hielo y la deshidratación celular como la causa principal de la muerte celular [103].

Con el surgimiento de la criopreservación y la criobiología, estos procesos adaptativos naturales en los organismos se estudian e implementan de forma artificial en el laboratorio con el fin de preservar células, tejidos, órganos, etc. durante largos periodos de tiempo que van desde días, semanas o años [255].

Se han desarrollado distintos métodos de preservación a bajas temperaturas, en la tabla 6.1 se describen brevemente algunas técnicas y su principal campo de aplicación. En el almacenamiento hipotérmico, las temperaturas rondan alrededor de los  $4^{\circ}C$ , al ser una temperatura baja pero por arriba de la temperatura de cristalización del agua, ralentiza los procesos biológicos celulares pero sin dañarlas, los otros métodos descritos utilizan temperaturas por debajo de los  $0^{\circ}C$ , por lo que la formación de hielo es inminente siendo esta la principal causa de muerte de las células y tejidos.

La gran cantidad de agua en el ambiente celular hace casi imposible la formación de hielo durante la criopreservación aún utilizando velocidades de enfriamiento muy grandes. Sin embargo, es posible minimizar la cantidad de hielo formado, como por ejemplo retirando cierta cantidad de agua o agregando sustancias a la solución. Agregar un soluto al agua perturba el sistema completo causando variaciones en las propiedades termodinámicas, las llamadas coligativas, como se vio en los capítulos anteriores. Estas acciones permiten minimizar la cantidad y el tamaño de los cristales de hielo formado, sin embargo, causan efectos nocivos no deseados, lo que se conoce como toxicidades, como por ejemplo cambios conformacionales en la membrana celular<sup>vi</sup>, o inclusive problemas en la motilidad de los espermatozoides por nombrar un ejemplo en particular. Actualmente existen otras técnicas que prometen mejorar los procesos de criopreservación minimizando la cantidad de hielo por medio de pulsos electromagnéticos [256], ondas de sonido [257] o mediante procesos isocóricos [258–260].

### Mecanismos e implicaciones en el proceso de congelación de célula

Durante el proceso de preservación celular se identifican ciertos eventos físicos importantes dependiendo de la velocidad de enfriamiento como se observa en la figura 6.2. De acuerdo al diagrama entre los  $-2$  y  $-5$  °C debido a los solutos agregados a la solución, se baja el punto de congelación y es a partir de esta temperatura que el hielo puede comenzar a aparecer, por lo que la célula no tiene daño aparente. A temperaturas menores el hielo inminentemente aparece y dependiendo de la velocidad de enfriamiento pueden ocurrir tres eventos distintos: i) si la velocidad de enfriamiento es lenta se formará hielo en el exterior de la célula ya sea de forma homogénea o heterogénea que irá incrementando de tamaño conforme disminuye la temperatura, causando que el agua disponible dentro de la célula se transporte hacia afuera por la diferencia de potencial químico y la célula se deshidrate, se cree que esta agua intracelular no se congela debido a que la membrana bloquea el crecimiento del hielo en el citoplasma. ii) Si el enfriamiento es intermedio, el hielo se formará tanto en el interior como en el exterior de la célula, pero su tamaño será pequeño a comparación de i), esto debido a que una mayor cantidad de agua permanece dentro de la membrana e inminentemente aparecerá el hielo a bajas temperaturas. iii) en este último caso si la célula se enfría demasiado rápido, la cantidad de hielo formada en ambos lados de la célula será mínima, quedando vitrificada, pero en el momento de calentar la muestra estos cristales crecerán a menos que se inhiba de alguna manera. En los dos últimos casos se mantiene la tonicidad celular.

Los azúcares juegan un papel muy importante en la criopreservación, por un lado tienen una temperatura de transición vítrea mucho mayor que la del agua, varios cientos de grados, haciendo que la solución contenedora de las células o tejidos incremente la temperatura de transición siendo más fácil el proceso de vitrificación. Además se ha mostrado que la interacción de los azúcares con la membrana celular previene estos cambios conformacionales reemplazando las moléculas de agua y creando una especie de capsula [262]. En estos procesos, la viscosidad es un factor clave, pues el incremento de la viscosidad con la temperatura disminuye el proceso de transporte de moléculas de agua para formar los cristales, quedando

<sup>vi</sup>Esto es generado por los esfuerzos mecánicos a causa de la presión osmótica generada por variaciones en la concentración de la solución estabilizadora

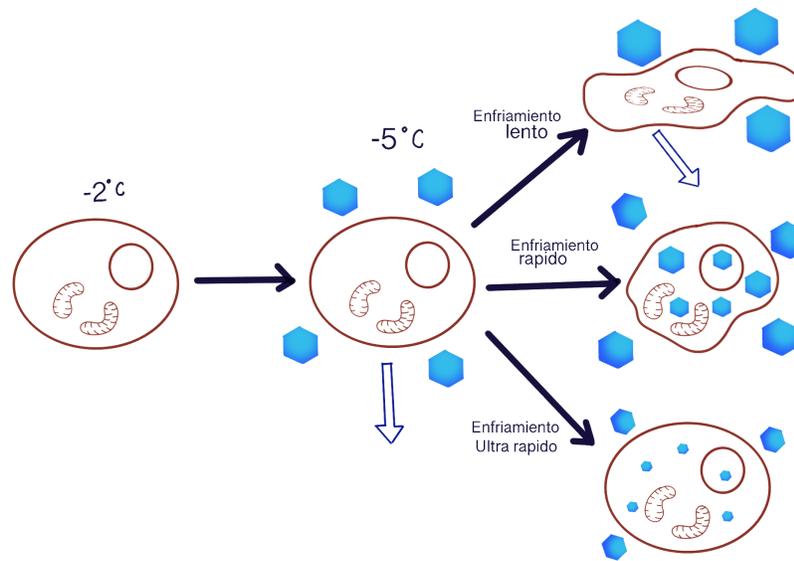


Figura 6.2: Esquema de los eventos fisicoquímicos en la célula durante el congelamiento. Los exágonos dibujados son cristales de hielo formados, el tamaño variable también se incluye de forma ilustrativa sobre el crecimiento de los cristales dependiendo del proceso [261].

atrapada en una matriz vitrificada.

### 6.1.1. Los azúcares como agentes crioprotectores (CPAs)

Como es sabido las temperaturas más bajas en la tierra suelen registrarse en territorios de Rusia, de hecho la temperatura más baja registrada aparentemente ha sido de poco más de  $-90^{\circ}\text{C}$  en la estación Vostok ubicada en la Antártida [263]. En muchos territorios del planeta, los inviernos o durante todo el año, los seres vivos sobreviven a temperaturas bajo cero. En 1907 Lidfors se percató que el sabor del camote cambiaba en las estaciones más frías del año, volviéndose más dulce, y estudio sobre la acumulación de azúcar durante el invierno en las plantas de hoja perenne, hecho que derivó en la hipótesis de la acumulación de azúcar al disminuir la temperatura [264]. En investigaciones posteriores, Maximov [264] documentó los cambios en la concentración de azúcar en la savia de las plantas de su jardín como en la Petunia y la Magnolia, además estudió la variación de otras sustancias durante el enfriamiento como las sales. Con todas estas evidencias sobre el rol protector de los azúcares, en 1927 Akerman [265] añadió de forma intencional en sus experimentos azúcares y otras sustancias como glicina, urea y eritrita en las muestras biológicas, percatándose particularmente de la característica no penetrante del azúcar y sus propiedades 'protectoras'.

Tres años después de este experimento, W. Stiles publicó sobre la existencia de soluciones atípicas que forman una gelatina grumosa en lugar de una separación eutéctica [103]. Además reportó sus resultados experimentales al utilizar diferentes procesos de congelación a partir de los cuales concluyó que el mejor proceso para la supervivencia celular es aquel que minimiza los núcleos cristalinos así como el tamaño del cristal, esta relación entre cristalización y la velocidad de enfriamiento fue el trabajo desarrollado sobre los líquidos

sobreenfriados por G. Tammann varios años antes [266]. Así, la razón de enfriamiento fue introducida como una nueva variable en los procesos de criopreservación por Basile Luyet a fines de 1930 inspirado por el trabajo de G. Tammann en los polímeros.

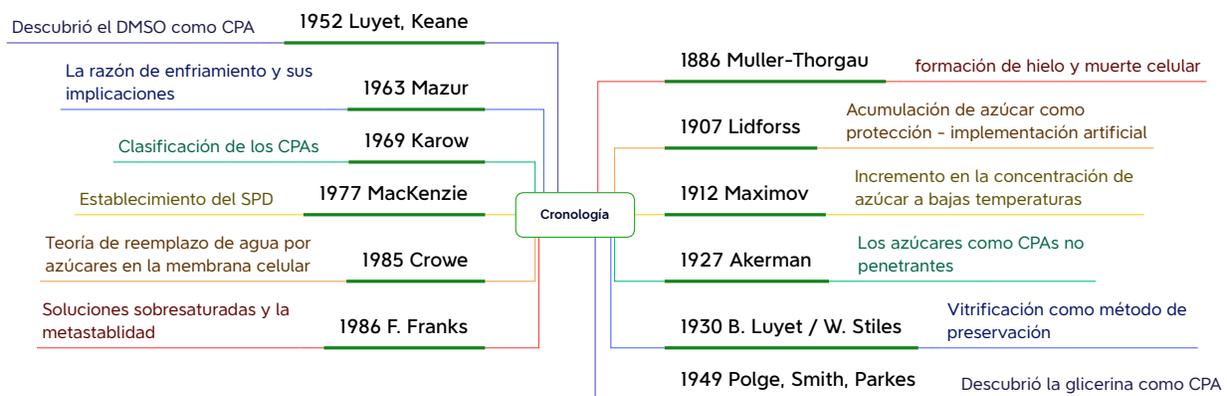


Figura 6.3: Cronología de algunos hechos importantes en el desarrollo de las tecnologías de criopreservación y la relevancia de los azúcares.

B. Luyet fue el pionero en utilizar la vitrificación como un método de criopreservación, en sus primeros experimentos mostró este hecho usando espermatozoides de rana en soluciones de sacarosa, donde reportó la disminución del porcentaje de espermatozoides muertos [267]. En sus muchos trabajos publicados, Luyet también presentó varios análisis sobre el proceso de vitrificación y sus implicaciones en las soluciones, como por ejemplo las distintas estructuras y tamaño del hielo formado en las soluciones de azúcar [112]. En base a este trabajo se evidenció que los principales factores a mejorar en los distintos procesos de criopreservación son tanto la velocidad de enfriamiento como el tipo y cantidad de los agentes crioprotectores o CPAs (por sus siglas en inglés) en la solución amortiguadora o conocido como buffer [114,268].

### Clasificación de los CPAs

De la termodinámica de las soluciones y de los procesos de cristalización estudiados en los primeros capítulos, se sabe que la adición de ciertas sustancias a la solución pueden favorecer o disminuir la formación de cristales en influir en el tamaño y forma, aunque el proceso de cristalización son muchas más las variables involucradas. Los CPAs, son todas aquellas sustancias químicas que se agregan a la solución con el fin de mejorar la supervivencia celular durante cierto proceso. Se ha estudiado extensamente la cantidad y tipos de CPAs adecuados para cada caso, ya que como efecto secundario produce toxicidades.

En 1966, G.F. Doebbler [162] presentó una revisión de casi cincuenta tipos diferentes de CPAs utilizados hasta esa fecha, en su listado incluyó en que casos fue usada, su estructura molecular, su comportamiento en soluciones acuosas y también sus implicaciones en la actividad crioprotectora de cada uno. Resumió una lista de compuestos polihidroxilados, polisacáridos y polímeros entre otros. El glicerol, más conocido como glicerina, fue un CPA incluido de forma accidental a finales de la década de 1940, cuando C Polge trabajaba con semen de pollo y de toro, sin saberlo lo agregó a las muestras teniendo un éxito

Azúcares y polialcoholes derivados	Alcoholes y Polímeros	Sulfóxidos y amidas	Aminas	Amidas
Glucose	Metanol	Polietilenglicol(PEG)	Dimetilsulfóxido	Prolina
Galactosa	Etanol	Polivinilpirrolidona(PVP)	Acetamida	Glutamina
Lactosa	Glycerol	Dextrano	Formamida	Betaina
Sacarosa	Propilenglicol	Ficoll	Dimetilacetamida(DMA)	
Trehalosa	Etilenglicol			
Rafinosa				
Fructosa				
Glucosa				
Manitol				
Sorbitol				

Cuadro 6.2: Agentes crioprotectores comúnmente utilizados en el laboratorio [272].

inusual en la recuperación celular después del proceso [269, 270]. Tal fue el éxito que tuvo una fuerte importancia económica en la industria de la inseminación artificial, de hecho la investigación en esta área fue impulsada principalmente por la preservación de las células reproductivas de los caballos y otros animales de gran valor como los toros. El primer mamífero reproducido de forma artificial con espermatozoides criopreservados fue un ternero, en el año de 1951 [255]. La motilidad del espermatozoide es el criterio que se suele tomar en cuenta para evaluar el éxito del procedimiento de congelación. Se ha demostrado que una concentración demasiado alta de glicerina en el semen líquido disminuye la fertilidad ya que se daña la membrana celular del esperma. Los primeros experimentos sobre la criopreservación de espermatozoides humanos fueron reportados en 1940 y el primer embarazo a partir de un embrión humano criopreservado se reportó en 1983 [271].

Los CPAs se suelen clasificar en dos grupos principales: penetrantes y no penetrantes, los primeros se caracterizan por poseer un bajo peso molecular permitiéndose el paso a través de la membrana celular, caso contrario de los agentes no penetrantes que suelen ser de alto peso molecular como los azúcares impidiéndoles el paso por la membrana. Esta clasificación se propuso desde los 70's por A. Karow [273]. Los agentes penetrantes presentan una mayor toxicidad provocando diversos efectos adversos como daño o rompimiento en la membrana celular, afectación en las funciones enzimáticas, disminución en el desarrollo celular y embrionario, afectación en la motilidad del esperma (como el caso de la glicerina), e inclusive puede causar reducción en la función de la mitocondria o dañar el ADN directamente. En general, los CPAs del tipo penetrantes causan modificaciones en los procesos bioquímicos dentro de las células. Es por esto que se suelen usar en pequeñas cantidades. Por otro lado, los CPAs no penetrantes pueden ser menos tóxicos pero la protección que brindan en algunos casos puede ser menos efectiva. Ya que ofrecen protección extra celular pero no intracelular.

Los investigadores que trabajan en el laboratorio suelen decir que 'determinar la causa del daño a menudo es más difícil que identificar la existencia del daño'. En este sentido, la toxicidad puede ser específica, es decir, que proviene de un crioprotector en particular (toxicidad específica) o una puede ser una toxicidad que es consecuencia propia de los CPAs (no específica) [274]. Las diferencias en los grados de toxicidad de los distintos CPAs se deben principalmente a las diferentes condiciones experimentales, como a la temperatura, la concentración y el tiempo de exposición al CPA.

Con la experimentación se demostró que la mezcla diferentes CPAs aumenta la supervivencia celular [275], ya que ofrece una protección más amplia. Sin embargo, algunos de los CPAs presentados en la lista de A. Karow son inviables debido a sus efectos secundarios por tanto a partir de los resultados experimentales, la cantidad de agentes crioprotectores se redujo a la mitad. Así, G. D. Elliott y colaboradores (2017) presentaron una lista más reducida de sustancias viables [272]. En la tabla 6.2 se incluyen los distintos CPAs. En los últimos cuarenta años se han estudiado combinaciones de los diferentes CPAs, en la actualidad ya se cuenta con muchas soluciones de formulación patentada listas para ser usadas en laboratorio como el FucoPol [276]. Formulaciones similares son por ejemplo el VS55, VS1, M22 o DP6 [277–279]. Cada formulación se recomienda para diferentes tejidos y células.

Otro tipo de sustancias utilizadas son los solventes eutécticos profundos o DESs por sus siglas en inglés (Deep Eutectic Solvents), que incorporan moléculas biocompatibles a los CPAs [280–284]. Los NADES son capaces de minimizar la cristalización a bajas temperaturas alcanzando altas viscosidades favoreciendo la vitrificación.

### Los azúcares como CPAs

Los azúcares son excelentes agentes crioprotectores debido a que no son tóxicos y tienen la capacidad de proteger las membranas celulares [285]. Por ejemplo, D. Martinetti y colaboradores observaron que, para las células madre, el uso de trehalosa mejora la supervivencia celular en concentraciones altas (0.3 M-1.25 M), obteniendo los mejores resultados a concentraciones altas [286] a diferencia de un estudio similar en las mismas células donde la sacarosa mostró un mejor desempeño [287].

A concentraciones muy bajas, se ha informado que la trehalosa no presenta diferencias notables en comparación con otros disacáridos como la sacarosa, la maltosa y la lactosa en espermatozoides de cabra [288]. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de trehalosa, se observa un claro aumento en la recuperación con diferencias significativas, en este estudio se utilizaron seis azúcares diferentes: galactosa, glucosa, meliobiosa, lactosa, trehalosa y sacarosa, en tres concentraciones diferentes. Después de un amplio análisis, de todas las azúcares descubrieron que tanto trehalosa y la lactosa brindan una mayor viabilidad de las celular en comparación con los demás azúcares [289]. Como se ha mencionado, los azúcares y en general todos los CPAs tiene efectos diferentes en diversos tejidos y células biológicas, es por esto que se han refinado los protocolos para cada tejido celular [290].

Se ha mostrado en diversas investigaciones la baja toxicidad de los azúcares [274], además de su capacidad que tienen en la estabilización de la membrana celular disminuyendo la deformación debido a la conformación de las moléculas de azúcar [291], este efecto favorecedor se ha documentado particularmente relevante con la trehalosa como concluye el grupo de investigación de L. M. Crowe después de treinta años de investigación [292, 293]. Sin embargo, dado que los azúcares son no penetrantes, los efectos positivos que tienen este tipo de sustancias sólo se tienen en el exterior de la célula, es por esto que actualmente se esta investigando lo que se conoce como 'artificial sugar delivery', es decir, en introducir los azúcares o moléculas grandes al interior de la célula de forma artificial. En la figura 6.4 se muestran algunas

formas artificiales de introducir los azúcares en la célula. A principios del siglo A. Eroglu y su equipo [152] crearon poros en la membrana de células madre para introducir trehalosa, como resultado el porcentaje de supervivencia fue mayor que cualquier otro método usado, esto abrió la puerta a nuevos protocolos de criopreservación.

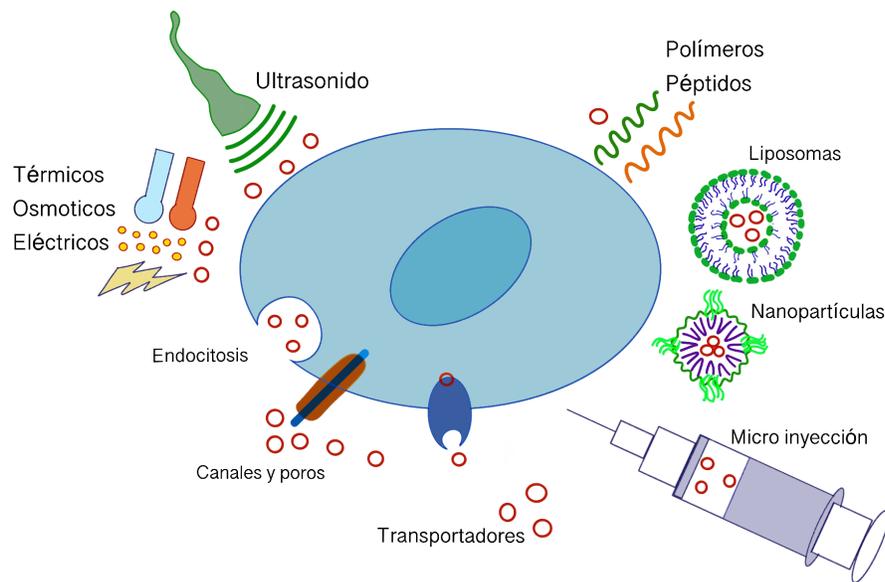


Figura 6.4: Formas de introducir artificialmente los azúcares al interior de la célula.

Actualmente ya se tiene implementado en diversos protocolos algunas técnicas de este tipo y han mostrado muy buenos resultados. Algunas de estas técnicas utilizan ultrasonido, nanopartículas en forma de nanocápsulas portadoras [294, 295], electroporación o electropermeabilización [296], choques térmicos [297] entre otros [298]. Por ejemplo, B. Dovgan y colaboradores [299], quienes criopreservaron dos tipos de células estromales mesenquimales humanas<sup>vii</sup>. Sin embargo, comparando los resultados finales con los métodos convencionales utilizando dimetilsulfóxido no fue muy diferente la supervivencia celular. Pero esto puede ser debido a los tipos de células tratados, ya que se tiene bien documentado que en el caso de espermatozoides la afectación en la motilidad debido al DMSO es alta [300, 301].

### 6.1.2. Evidencias de universalidad en la criopreservación celular

En el año 2008 Yu. A. Petrenko y D.R.E. Jones diseñaron un protocolo con el fin de evaluar el efecto de la adición de sacarosa a distintos medios de criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas<sup>viii</sup> derivadas del hígado fetal humano, su principal objetivo

<sup>vii</sup>Las células madre mesenquimales, también conocidas como células estromales multipotentes o células estromales mesenquimatosas, son células madre adultas no hematopoyéticas multipotentes que están presentes en múltiples tejidos como en la médula ósea y el tejido adiposo.

<sup>viii</sup>Son células inmaduras que se puede transformar en todos los tipos de células sanguíneas, como glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas

fue reducir la concentración de DMSO debido a sus efectos adversos [302]. Las células fueron preservadas en soluciones con distintas concentraciones de DMSO con o sin sacarosa. Los resultados finales fueron comparados con una solución estándar de criopreservación. En este experimento utiliza una razón de enfriamiento de 1 °C/min hasta los -80°C usando nitrógeno y después las muestras son almacenadas a -196 °C durante 3 meses. Para su análisis posterior, las muestras se descongelaron en un baño de agua a 37 °C, se retiran los CPAs mediante un lavado y finalmente se determina la tasa de recuperación y la viabilidad celular.

En un trabajo publicado en el año 2012 por G. Quan y sus colaboradores sobre el congelamiento de espermatozoides de cabra reportaron que tras comparar la eficacia tipo de solución patentada de uso común denominado 'NS' con soluciones de azúcares como trehalosa, sacarosa y maltosa, el efecto de la criopreservación en la motilidad de las células con azúcares fue significativamente menor que la de aquellos tratados con la solución NS, pero la presencia de disacáridos mostró mayor protección del acrosoma<sup>IX</sup>. Además, para los casos de sacarosa y maltosa la diferencia en el resultado no es diferente, lo que implicaría una protección común posiblemente derivado de propiedades fisicoquímicas semejantes en solución. Quizá la supervivencia y motilidad abrían sido mayores, pero no se agregó glucosa que resulta ser esencial para la supervivencia de los espermatozoides de cabra durante la congelación.

Recientemente Mutsenko et al [303] preservaron células madre mesenquimales<sup>X</sup> del cordón umbilical humano utilizando azúcares como el CPA único mediante electroporación<sup>XI</sup>. Evalúan tres azúcares diferentes: sacarosa, trehalosa y rafinosa para distintas concentraciones. Después del procedimiento experimental descrito previamente, observaron una mejora proporcional con la concentración obteniendo un porcentaje muy alto de células viables alrededor de 80% utilizando la concentración máxima. Independientemente del tipo de azúcar, a altas concentraciones, la supervivencia celular es similar. Como los investigadores declaran en su trabajo, estos hallazgos sugieren un comportamiento universal de los resultados obtenidos con diferentes soluciones de azúcar.

Se demostrado una mejora en la supervivencia gracias al uso de los azúcares en diferentes circunstancias [304–309]. Sin embargo, aún hay muchas preguntas sobre los resultados obtenidos pues los mecanismos físico químicos implicados son muy difíciles de describir debido a la complejidad de los procesos, el número de variables a considerar y todas las interacciones involucradas. A partir de diversos estudios, la evidencia muestra que los azúcares y su interacciones con la membrana celular son responsables de su preservación durante los procesos de desecación y congelación. Sin embargo, el mecanismo molecular mediante el cual los azúcares ofrecen esta protección no está del todo comprendida [157].

Desde un punto de vista macroscópico se ha atribuido los buenos resultados gracias

---

<sup>IX</sup>El acrosoma es un pequeño depósito situado en el extremo de la cabeza del espermatozoide que contiene las enzimas necesarias para la penetración del esperma en el óvulo

<sup>X</sup>La función de estas células es reparar tejidos y órganos, mejorar su función, modular el sistema inmunológico y reducir la inflamación

<sup>XI</sup>Esta técnica permite la apertura de canales en la membrana celular lo que facilita la penetración de sustancias al interior de la célula

a que las soluciones de azúcares vitrifican gracias al aumento de la viscosidad con la concentración y la disminución de la temperatura. Este comportamiento está relacionado con el coeficiente de actividad de este tipo de soluciones, cuyo valor negativo implica una interacción más fuerte entre las moléculas de agua y azúcar que entre las moléculas de agua, lo que reduce la formación de hielo. Recientemente, C. Olsson y J. Swenson [250] mostraron que la presencia de trehalosa 'perturba' la estructura general de la solución y esto modifica el proceso de cristalización del agua, efecto similar para la sacarosa. De estas observaciones hay algunas diferencias notables principalmente a bajas concentraciones pero conforme se incrementa la concentración estas desaparecen. Todas las teorías apuntan como resultado común una universalidad en las propiedades físicas de las soluciones de azúcar.

## 6.2. Las partículas lipídicas nanométricas (LNPs) y las vacunas

En los últimos 30 años, el estudio de diferentes nanoportadores para mejorar la entrega de ARNm ha sido muy importante para desarrollar nanomedicamentos para tratar diversas enfermedades y prevenir infecciones a través de vacunas [155, 310–313]. Las nanopartículas lipídicas (LNPs) más importantes pueden atravesar la membrana celular y transmitir información genética. Se han propuesto diferentes métodos tecnológicos para encapsular y crear LNPs para entregar un tipo específico de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para atacar tejidos y células específicos con la respuesta inmune deseada, presentando baja toxicidad y su posterior biodegradación dentro de la célula [314]. Uno de los principales problemas a considerar es la estabilización del LNP donde se encapsula el ARNm para ser entregado a tejidos y células específicos para silenciar o expresar ciertos genes.

Las nanopartículas basadas en lípidos, partículas lipídicas o mejor conocidas como LNPs (lipid nanoparticles) son partículas portadoras capaces de encapsular los ácidos nucleicos en su interior, inhibiendo su degradación con el fin de transportar estas moléculas hacia un objetivo determinado. Después de años de investigación, las LNPs han probado ser el mejor método para introducir de manera eficiente y segura el ADN [315], siARN [316] y recientemente mARN [317] a las células.

Las LNPs suelen estar formuladas con un lípido catiónico ionizable, un lípido auxiliar, colesterol y un lípido PEGilado. En la figura 6.5 se muestra la conformación de las LNPs así como su composición. Esta composición de las LNPs facilita la entrada a la membrana celular para permitir la liberación de los ácidos nucleicos del endosoma y finalmente los liberan en el citosol de la célula donde se activan. Cada componente proporciona la acción requerida del LNP para la entrega precisa del ARNm al objetivo deseado [318]. Debido a esta composición, las LNP son capaces de cruzar la membrana celular y liberar los compuestos químicos que se transportan en su interior [319].

La estabilidad de un fármaco es uno de los desafíos más grandes. Y siendo las LNPs un medio transportador, también tiene que asegurarse su estabilidad en el medio, con la preservación de su forma y tamaño. Se han realizado numerosos experimentos con el fin de mejorar la formulación, eficiencia y seguridad, de estas partículas en condiciones de laboratorio y en vivo así como durante el almacenamiento y transportación. Para

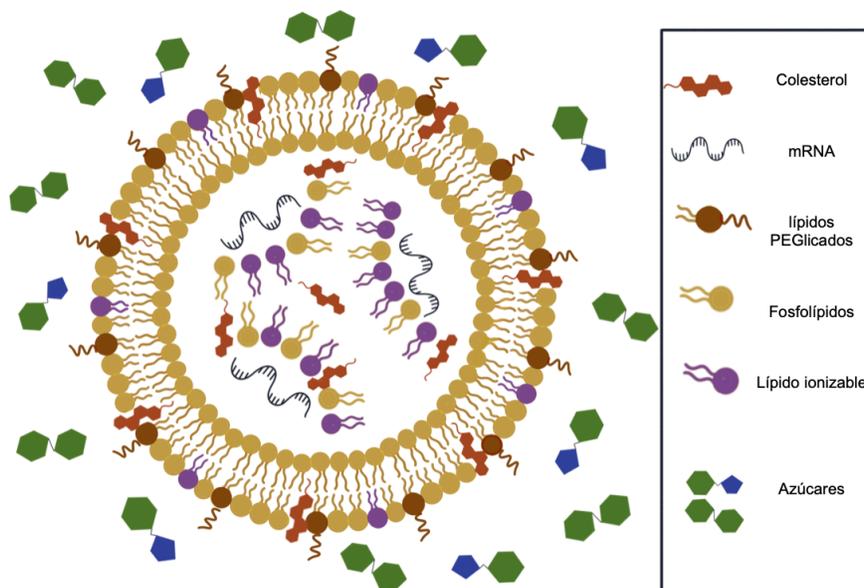


Figura 6.5: La estructura y composición de los LNPs utilizados para las vacunas contra el covid-19 basadas en ARNm. Los fosfolípidos son los componentes principales con colesterol y lípidos PEGilados incrustados para disminuir la degradación de LNP. En la formulación se incluyen azúcares como sacarosa y trehalosa para reducir los efectos oxidativos sobre los fosfolípidos, la agregación o fusión de nanopartículas y la permeabilización gradual de la bicapa lipídica evitando fugas.

mejorar su almacenamiento y funcionalidad, los LNP deben almacenarse a temperaturas muy bajas introduciéndolos en nitrógeno líquido. Varios estudios han demostrado que los azúcares, los CPA no penetrantes, especialmente la sacarosa, estabilizan las capas lipídicas de las LNP, ya que presentan una estructura similar a la de una membrana celular. El ARNm se empaqueta en su interior y ambos se congelan mediante vitrificación, evitando esfuerzos elásticos y térmicos. En literatura se reporta que mediante diferentes métodos, diferentes azúcares, sacarosa, trehalosa o glucosa, en diferentes concentraciones, presentan resultados similares [157–159, 320]. Los disacáridos presentan baja movilidad molecular debido al aumento de la viscosidad al bajar la temperatura promoviendo la vitrificación [321].

Es importante mencionar que las nanopartículas se ensamblan por sí mismas debido a interacciones hidrofóbicas-hidrofílicas y electrostáticas entre sus diferentes componentes, y ya se tienen bien establecidos los protocolos para su formulación. Sin embargo, es inevitable que pasado un tiempo tiendan a desintegrarse. Se tiene bien definido al menos dos mecanismos involucrados en la inestabilidad de las LNPs, por un lado los esfuerzos mecánicos, que pueden provocar daños en la membrana liposomal, y por otro lado las transformaciones químicas que pueden afectar su funcionamiento. Algunos de los problemas más comunes que causan esta degradación incluyen la oxidación de los fosfolípidos, la agregación y fusión de las nanopartículas y la permeabilización gradual de sus membranas causando con fugas. Estos efectos adversos en las LNPs se pueden disminuir mediante el uso de agentes estabilizadores como el polietilenglicol (PEG), agentes crioprotectores (CPAs) como

por ejemplo la sacarosa y la trehalosa entre otras [322], y su preservación en ambientes con bajo contenido de agua, es decir la liofilización ya sea por congelación y o secado al vacío.

El ARN mensajero es usado para la prevención y el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. El éxito alcanzado más reciente que todos hemos conocido es el de las dos vacunas de mRNA contra en covid-19 producidas por los laboratorios de Moderna y Pfizer-BioNTech [323]. El premio Nobel de medicina del año pasado 2023 se otorgó a Katalin Karikó y Drew Weissman por el desarrollo de esta vacuna. En la última década, la FDA aprobó más de 10 medicamentos diferentes basados en la administración de ARNm a través de LNP, como vacunas de ARN personalizadas para prevenir varios tipos de tumores cancerosos y otras enfermedades [155, 156, 160, 311, 314].

**Parte III**  
**Conclusiones**



---

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

Un gran número de CPAs se han incluido en los distintos procesos de criopreservación, sin embargo los azúcares han demostrado ser el CPA menos tóxico y se han utilizado para preservar diversos tipos de tejidos así como para estabilizar fármacos. Los agentes criopreservadores están siendo sustituidos por azúcares por lo que actualmente se están desarrollando varias técnicas para mejorar la difusión de los azúcares a través de las membranas celulares [161]. El estudio de su viscosidad a temperaturas bajo cero es sumamente importante, ya que inhibir la formación de hielo dentro de la célula es vital.

Desde un punto de vista termodinámico de equilibrio, no podemos reconocer un límite físico entre la solución no saturada y la región sobresaturada, ni como una curva de coexistencia ni como el lugar geométrico de mediciones experimentales de saturación. Se ha comentado sobre los obstáculos experimentales que pueden encontrarse para su identificación en procedimientos experimentales. El análisis de la razón de cambio de la viscosidad en las proximidades de esta región utilizando un diagrama de Angell, puede proporcionar una alternativa para una determinación física de esta frontera mediante el incremento de este coeficiente de transporte. Desafortunadamente, en algunos casos no hemos encontrado más datos experimentales para las viscosidades en esta vecindad y nuestro análisis es limitado.

Este trabajo contribuye en la descripción de un sistema fuera de equilibrio, como una alternativa a las aproximaciones presentadas en diversos estudios partiendo de un estado de equilibrio.

Una de las principales aplicaciones de las soluciones acuosas que hemos presentado es su eficacia en los procedimientos de la criopreservación de material biológico y productos farmacéuticos ejerciendo una acción protectora al descender la temperatura mediante la vitrificación. En este trabajo se presentó evidencia sobre el comportamiento universal de la viscosidad en soluciones acuosas de azúcar a distintas concentraciones en la región sobresaturada.

A partir de la ecuación presentada para la viscosidad se estableció un comportamiento universal entre distintas soluciones como lo son la trehalosa y lactosa por un lado y la sacarosa y fructosa por otro. Este resultado, evidencia de alguna manera la universalidad entre diferentes azúcares en diferentes concentraciones en varias soluciones crioprotectoras comerciales que presentan resultados similares [290,324]. En el caso de los nanomedicamentos basados en ARNm, la estabilidad de los LNP se ha modelado y medido utilizando diferentes azúcares obteniendo resultados similares [157–159].

Quedan aún algunos estudios adicionales que debemos terminar y posteriormente presentar en un futuro cercano.

En esta tesis nos enfocamos a las mezclas sobresaturadas acuosas con azúcares. Queda pendiente corroborar la validez de nuestra propuesta con otros solutos tales como el glicerol. En este caso, tenemos ya algunos resultados para esta sustancia y seguimos buscando otros.

Como mencionamos, la determinación del lugar geométrico para la frontera entre las regiones diluida y sobresaturada es un problema abierto y cabe la posibilidad de encontrar más datos experimentales para otros solutos.

Por último, queda por reportar los resultados que hemos comenzado a estudiar en los procesos de congelación de varios alimentos tales como frutas y verduras.

## APÉNDICE

### A.1. Termodinámica de las soluciones

La termodinámica de las soluciones se formula en términos de las cantidades o propiedades molares parciales, ya que las propiedades de las soluciones no pueden determinarse a partir del promedio de las propiedades de los componentes puros que la conforman. Por ejemplo, considere dos volúmenes de agua diferentes  $V_1$  y  $V_2$ , si se mezclan estos dos volúmenes, el volumen final será  $V_{mez} = V_1 + V_2$  pues se trata de la misma sustancia. Si ahora el volumen  $V_2$  fuese alcohol en lugar de agua, el volumen de la solución de estas dos sustancias ya no será aditivo y por tanto  $V_{mez} \neq V_1 + V_2$ . Pero, lo deseado es contar con una ecuación aditiva para calcular el volumen total de una mezcla a partir del volumen molar parcial  $\bar{V}$  como  $V_{mez} = \bar{V}_1 + \bar{V}_2$ . Así, para  $k$  especies químicas, el total se expresa como

$$V_{mez} = \sum_{i=1}^k \bar{V}_i \quad (\text{A.1})$$

donde  $\bar{V}_i = \left( \frac{\partial V_{mez}}{\partial n_i} \right)_{X,Y,n_{j \neq i}}$  es el volumen molar parcial de la especie química  $i$ . Una propiedad molar parcial, es la razón a la que una propiedad extensiva de la mezcla cambia con el número de moles del componente  $i$  en la mezcla cuando la temperatura, la presión y el número de moles de todos los componentes distintos a  $i$  permanecen constantes. Además, es una propiedad intensiva de la mezcla y no solamente una propiedad de la componente  $i$ , que depende de la composición de la mezcla, así como de la temperatura y la presión [6].

En una mezcla, los parámetros termodinámicos extensivos se expresan de forma molar parcial, es decir, con  $Y$  cualquier variable extensiva, el correspondiente parámetro molar parcial de la componente  $i$ , es  $\bar{Y}_i$ ,

$$\bar{Y}_i = \left( \frac{\partial Y}{\partial n_i} \right)_{X,Y,n_{j \neq i}} \quad (\text{A.2})$$

De la misma forma que se definió en la ecuación A.11, el potencial de Gibbs molar parcial,

$$\bar{G} = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,P,n_{j \neq i}} = \mu_i(T, P, n_{j \neq i})$$

Así, la energía libre de Gibbs  $G$  de una solución de  $k$  componentes en una fase está dado por,

$$G = \sum_{i=1}^k \bar{G}_i = \sum_{i=1}^k n_i \mu_i \quad (\text{A.3})$$

donde dadas las interacciones moleculares, el potencial químico  $\mu_i$  depende de  $T, P$  y las fracciones molares  $x_{i \neq j}$ , siendo a su vez una variable dependiente de las propiedades de la solución. La importancia en este potencial radica en las variables independientes de la representación y que determina el equilibrio de fases y de reacción (si fuese el caso) para el sistema termodinámico [325]. Como se expuso en el capítulo anterior, las condiciones de equilibrio termodinámico se deben cumplir para establecer las fases y su coexistencia para sistemas multicomponentes, lo que conlleva el establecimiento de los valores mínimos del potencial químico dadas la presión, la temperatura y la composición en este tipo de sistemas.

Dentro del marco teórico de la termodinámica es posible establecer relaciones funcionales entre los distintos potenciales y representaciones para así derivar todas las demás propiedades del sistema a partir del potencial químico, mismo que se puede determinar de forma teórica y/o experimental. Por tanto dado a partir de las expresiones,

$$-\bar{S}_i = \left( \frac{\partial \mu}{\partial T} \right)_{P, n_j} = \left( \frac{\partial \bar{G}}{\partial T} \right)_{P, n_j} \quad (\text{A.4})$$

$$\bar{V}_i = \left( \frac{\partial \mu}{\partial P} \right)_{T, n_j} = \left( \frac{\partial \bar{G}}{\partial P} \right)_{T, n_j} \quad (\text{A.5})$$

se puede obtener la entalpía molar parcial mediante  $\mu_i = \bar{H}_i - T\bar{S}_i$  de donde se puede obtener  $\bar{C}_{P,i}$ , además de obtener la energía  $\bar{U}_i = \bar{H}_i - P\bar{V}_i$ . A partir de estas relaciones se obtiene por ejemplo, el volumen  $V$  de la solución, es decir, su ecuación de estado.

La ecuación fundamental para un sistema, se puede obtener por medio de la cinética molecular o mediante el estudio fenomenológico controlado (vía experimental) y las ecuaciones de estado. En el laboratorio las variables que generalmente se pueden controlar y medir son la presión  $P$ , temperatura  $T$  así como la cantidad de sustancia  $n_i$ , por lo que, el potencial termodinámico de la energía libre de Gibbs cuyas variables independientes son las mencionadas,  $G = G(T, P, n_k)$ , es el potencial clave para describir el cambio de fases y los diagramas de fases de un sistema termodinámico en sus distintas representaciones.

Dado el potencial de Gibbs,  $G = G(T, P, n_1, \dots, n_k)$  en términos de sus variables independientes, la diferencial total de este potencial está dado por la siguiente expresión,

$$dG = \left( \frac{\partial G}{\partial T} \right)_{P, n_i} dT + \left( \frac{\partial G}{\partial P} \right)_{T, n_i} dP + \left( \frac{\partial G}{\partial n_1} \right)_{P, T, n_{i \neq 1}} dn_1 + \dots + \left( \frac{\partial G}{\partial n_k} \right)_{P, T, n_{i \neq k}} dn_k \quad (\text{A.6})$$

si se suman los términos de las derivadas parciales molares se tiene,

$$dG = \left( \frac{\partial G}{\partial T} \right)_{P, n_i} dT + \left( \frac{\partial G}{\partial P} \right)_{T, n_i} dP + \sum_{i=1}^k \left( \frac{\partial G}{\partial n_k} \right)_{P, T, n_{i \neq k}} dn_i \quad (\text{A.7})$$

Además se sabe que,

$$dG = -SdT + Vdp + \sum_{i=1}^k \mu_i dn_i \quad (\text{A.8})$$

de donde al comparar las dos ultimas expresiones,

$$-\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_{P,n_i} = S(T, P, n_i) \quad (\text{A.9})$$

$$\left(\frac{\partial G}{\partial V}\right)_{T,n_i} = V(T, p, n_i) \quad (\text{A.10})$$

$$\left(\frac{\partial G}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_{j \neq i}} = \bar{G} = \mu_i(T, P, n_{j \neq i}) \quad (\text{A.11})$$

donde  $\bar{G}$  es el potencial de Gibbs molar parcial y  $\mu_i(T, P, n_{j \neq i})$  el potencial químico de la componente  $i$ , y como se verá en el capítulo siguiente las cantidades molares parciales son las propiedades mediante las cuales se describe la termodinámica de las soluciones [326]. Así, en el caso particular de una sustancia pura, de la ecuación A.11, el potencial de Gibbs molar parcial  $\bar{G}$  es igual al potencial químico  $\mu$  del sistema,

$$\bar{G} = \left(\frac{\partial G}{\partial n}\right)_{T,P,n} = \mu(T, P) \quad (\text{A.12})$$

En la ecuación A.11 se denota explícitamente la dependencia del potencial químico tanto de la temperatura como de la presión así como de la composición en caso de tener una mezcla de sustancias. Por ejemplo, para una sustancia pura  $A$  cuyo potencial químico se define por  $\mu_A$  y una sustancia  $B$  con  $\mu_B$ , de la ecuación A.8 se tiene el potencial de Gibbs de la mezcla como

$$dG = -SdT + Vdp + \mu_A dn_A + \mu_B dn_B \quad (\text{A.13})$$

con

$$\begin{cases} \mu_A = \left(\frac{\partial G}{\partial n_A}\right)_{T,P,n_B} \\ \mu_B = \left(\frac{\partial G}{\partial n_B}\right)_{T,P,n_A} \end{cases}$$

La expresión A.8 se aplica a soluciones de una sola fase con  $k$  especies químicas. Sin embargo, si el sistema termodinámico tiene más de una fase, para describirlo es necesario diferenciar todas las fases presentes en el sistema. Así, la energía libre de Gibbs en la fase  $\alpha$  descrito como  $G^\alpha$  será,

$$dG^\alpha = -S^\alpha dT + V^\alpha dP + \sum_i \mu_i^\alpha dn_i^\alpha \quad (\text{A.14})$$

donde  $S^\alpha$  y  $V^\alpha$  son la entropía y el volumen de la fase  $\alpha$  y el potencial químico de la sustancia  $i$  en la fase  $\alpha$   $\mu_i^\alpha$  es,

$$\mu_i^\alpha = \left(\frac{\partial G^\alpha}{\partial n_i^\alpha}\right)_{T,P,n_{j \neq i}^\alpha} \quad (\text{A.15})$$

donde  $n_i^\alpha$  es el número de moles de  $i$  en la fase  $\alpha$ . Por tanto, si el sistema se compone de  $\alpha$  fases, el diferencial total de la energía libre de Gibbs será la suma de las energías de cada

una de las fases presentes, así

$$dG = \sum_{\alpha} -S^{\alpha}dT + \sum_{\alpha} V^{\alpha}dP + \sum_{\alpha} \sum_i \mu_i^{\alpha} dn_i^{\alpha} \quad (\text{A.16})$$

donde  $S^{\alpha}$  y  $V^{\alpha}$ , son la entropía y el volumen de la fase  $\alpha$  mismas que al ser cantidades extensivas  $S = \sum_{\alpha} S^{\alpha}$  y  $V = \sum_{\alpha} V^{\alpha}$ .

El potencial químico de la sustancia  $i$  en la fase  $\alpha$  a una cierta  $T$  y  $P$  será

$$\mu_i^{\alpha} = \mu_i^{\alpha}(T, P, x_1^{\alpha}, x_2^{\alpha}, \dots, x_k^{\alpha}) \quad (\text{A.17})$$

donde  $x_1^{\alpha}, x_2^{\alpha}, \dots$  son las fracciones molares de las sustancias  $1, 2, \dots$  en la fase  $\alpha$ . La suma de las fracciones molares de todo el sistema son la unidad. De acuerdo a la ecuación A.17 el potencial químico de una sustancia depende tanto de su fracción molar como de las fracciones molares de las otras componentes, ya que existe interacción de todas las componentes del sistema [16].

Considere un sistema aislado que contiene dos fases  $\alpha$  y  $\beta$ , donde se permite un intercambio de masa y energía entre estas dos fases. En el caso de que no haya reacción química, los valores totales de energía interna, volumen y número de moles se pueden expresar como,

$$U = U^{\alpha} + U^{\beta} = cte \Rightarrow dU^{\alpha} = -dU^{\beta}$$

$$V = V^{\alpha} + V^{\beta} = cte \Rightarrow dV^{\alpha} = -dV^{\beta}$$

$$n = n^{\alpha} + n^{\beta} = cte \Rightarrow dn^{\alpha} = -dn^{\beta}$$

Suponga que un proceso arbitrario produce cambios en el sistema adonde la entropía de las fases cambia tal que

$$dS^{\alpha} = \frac{1}{T^{\alpha}}dU^{\alpha} + \frac{P^{\alpha}}{T^{\alpha}}dV^{\alpha} - \frac{\bar{G}^{\alpha}}{T^{\alpha}}dn^{\alpha} \quad (\text{A.18})$$

$$dS^{\beta} = \frac{1}{T^{\beta}}dU^{\beta} + \frac{P^{\beta}}{T^{\beta}}dV^{\beta} - \frac{\bar{G}^{\beta}}{T^{\beta}}dn^{\beta} \quad (\text{A.19})$$

por tanto, el cambio de entropía del sistema es,

$$dS = \left( \frac{1}{T^{\alpha}} - \frac{1}{T^{\beta}} \right) dU + \left( \frac{P^{\beta}}{T^{\beta}} - \frac{P^{\alpha}}{T^{\beta}} \right) dV - \left( \frac{\bar{G}^{\alpha}}{T^{\beta}} - \frac{\bar{G}^{\beta}}{T^{\beta}} \right) dn \quad (\text{A.20})$$

La condición de equilibrio se satisface cuando  $dS = 0$ , por tanto de la ecuación A.20, las condiciones de equilibrio termodinámico que se deben cumplir entre la fases  $\alpha$  y  $\beta$  son con  $P^{\alpha} = P^{\beta}$ ,  $T^{\alpha} = T^{\beta}$  y  $\bar{G}^{\alpha} = \bar{G}^{\beta}$ . En el caso de que el sistema sea multicomponente, con  $k$  fases, la condición de equilibrio químico con  $T$  y  $P$  es cuando para toda  $i$  se cumpla la condición

$$\mu_i^{\alpha} = \mu_i^{\beta} = \mu_i^{\delta} = \dots \quad (\text{A.21})$$

Considere por ejemplo un sistema con presión y temperatura constantes, de la ecuación A.16 y la condición para el equilibrio material o químico en un sistema multicomponente se

tiene que,

$$\sum_{\alpha} \sum_i \mu_i^{\alpha} dn_i^{\alpha} = 0 \quad (\text{A.22})$$

esta expresión es la condición de equilibrio químico en un sistema cerrado. Si el sistema no se encuentra en equilibrio esta expresión será una desigualdad dada por

$$\sum_{\alpha} \sum_i \mu_i^{\alpha} dn_i^{\alpha} < 0 \quad (\text{A.23})$$

Por tanto, en el equilibrio, el potencial químico de una sustancia es el mismo en todo el sistema, independientemente de cuántas fases estén presentes.

La expresión más simple que se tiene para el potencial químico es el caso de un gas ideal. Como se trata de una sustancia pura  $\mu$  solo depende de la  $T$  y  $P$ , así la diferencial total está dada por

$$d\mu = -sdT + vdp \quad (\text{A.24})$$

con  $s = S/n$  y  $v = V/n$  la entropía y el volumen molar respectivamente. Integrando la ecuación A.24, desde una presión  $P_0$  hasta una cierta  $P$  y manteniendo la temperatura constante  $T$ ,  $dT = 0$ ,

$$\mu(T, P) = \mu(T, P_0)^0 + \int_{P_0}^P v(P^*, T) dP^* \quad (\text{A.25})$$

con  $\mu(T, P_0)^0 = \mu^0$  un valor de referencia. Si se considera el caso de un mol de gas ideal cuya ecuación de estado está dada por  $PV = RT$ , se obtiene el potencial químico

$$\mu(T, P) = \mu^0 + RT \ln \left( \frac{P}{P_0} \right) \quad (\text{A.26})$$

si se toma el valor de referencia  $P_0 = 1\text{bar}$  la expresión anterior se simplifica aún mas,

$$\mu = \mu^0 + RT \ln(P) \quad (\text{A.27})$$

este es el potencial químico de un gas ideal como función de la presión a cierta temperatura  $T$ . Si se conocen los potenciales químicos como funciones de la temperatura, la presión y la composición, las derivadas parciales de  $\mu_i$  respecto de éstas variables permite determinar la entropía, el volumen y la entalpía molar parcial así como las capacidades caloríficas.

Para estudiar el equilibrio de las soluciones es necesario conocer la variación de la energía de Gibbs con la composición. Para su cálculo se parte del hecho que en el equilibrio, el potencial químico de una sustancia presente en su fase gaseosa debe ser igual a su potencial químico en su fase líquida. Desde el punto de vista termodinámico macroscópico, una solución ideal se define como aquella cuyo potencial químico de cada una de las componentes en la solución está dado por

$$\mu_i = \mu_i^0(T, P) + RT \ln(x_i) \quad (\text{A.28})$$

donde  $\mu_i^0(T, P)$  es el potencial químico de la sustancia pura  $i$ , en el estado estándar, es decir, un valor de referencia del potencial químico y  $x_i$  la correspondiente fracción molar. La diferencia entre el potencial químico de la componente  $i$  en la solución real y el potencial químico de  $i$  considerado como un componente ideal es el potencial químico en exceso  $\mu_i^E$

dado por

$$\mu_i^E = \mu_i - [\mu_i^0(T, P) + RT \ln(x_i)] \quad (\text{A.29})$$

Para estudiar la termodinámica de las soluciones se parte de la definición del potencial químico de una mezcla ideal y al igual que para el modelo del gas ideal se analizan las desviaciones de la idealidad y sus consecuencias.

Para cuantificar las desviaciones del comportamiento ideal, se introduce el coeficiente de actividad del componente  $i$ ,  $\gamma_i$ , que se define en términos del potencial químico de exceso,

$$\gamma_i = e^{\mu_i^E/RT} = \frac{1}{x_i} e^{(\mu_i - \mu_i^0)/RT} \quad (\text{A.30})$$

$\gamma_i$  es el coeficiente de actividad<sup>xii</sup> con respecto a la fracción molar. De las expresiones anteriores se deduce que

$$\mu_i = \mu_i^0(T, P) + RT \ln(\gamma_i x_i) = \mu_i^0(T, P) + RT \ln(a_i) \quad (\text{A.31})$$

el producto  $\gamma_i x_i$  se le denomina la actividad del componente  $i$ ,  $a_i = \gamma_i x_i$ . La actividad  $a_i$  sustituye a la fracción molar  $x_i$  en la ecuación A.31 para el potencial químico ideal tal que cuando el componente  $i$  de la solución está en el estado estándar,  $\mu_i = \mu_i^0$  y  $a_i = 1$ . Dado que la actividad y el coeficiente de actividad está definido por el potencial químico de exceso, se infiere la dependencia de estos parámetros tanto de la concentración como de la temperatura y la presión. Así, con  $\mu_i$  dependiente de  $T$  y  $P$ ,  $a_i = a_i(T, P, x_1, x_2, \dots)$  y  $\gamma_i = \gamma_i(T, P, x_1, x_2, \dots)$ , estas son cantidades positivas adimensionales [14].

## A.2. Teoría física estadística de G. Adam y H. Gibbs

La primera hipótesis formulada por Adam y Gibbs es suponer que el líquido sobreenfriado conserva únicamente sus grados de libertad configuracionales por lo que la termodinámica del sistema se refiere a la parte configuraciones. Dividen al líquido en  $N$  subconjuntos que cuentan con un número  $z$  de moléculas. Del número total  $N$ , existe un número  $n$  de regiones donde dada una fluctuación adecuada de energía, las moléculas pueden reacomodarse de manera cooperativa hasta llegar a una nueva configuración. Estas regiones se conocen como regiones de rearrreglos cooperativos (CRR) en la figura A.1 se muestra un esquema.

El modelo de Adam Gibb describe estadísticamente al líquido a través del ensamble isotérmico isobárico cuya función de partición  $\Delta$  está dada por

$$\Delta(z, P, T) = \sum_{E, V} w(z, E, V) \exp(-E/k_B T) \exp(-PV/k_B T) \quad (\text{A.32})$$

donde  $w$  representa la degeneración del nivel de energía  $E$ ,  $P$  es la presión y  $V$  es el volumen del subsistema.  $k_B$  es la constante de Boltzmann.

---

<sup>xii</sup>El concepto de actividad en química fue propuesto por primera vez por el químico estadounidense Gilbert N. Lewis en la década de 1900. La actividad sirve como base para comprender el comportamiento de las sustancias en sistemas no ideales.

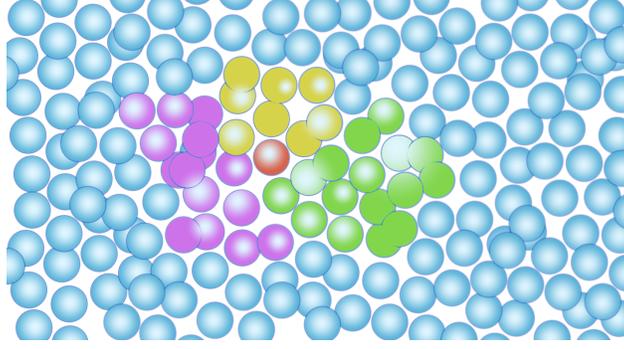


Figura A.1: Regiones de reordenamiento cooperativo (CRR).

A partir de esta función de partición, se separa la contribución configuracional  $\Delta_c$ , relacionada con la energía potencial para describir las  $n$  CRR

$$\Delta_c(z, P, T) = \sum_{E_{pot}, V} w_c(z, E_{pot}, V) \exp(-E_{pot}/k_B T) \exp(-PV/k_B T) \quad (\text{A.33})$$

A partir de la cuál se puede calcular la energía de Gibbs configuracional,  $G_c$ ,

$$G_c = z\mu_c = -k_B T \ln \Delta_c \quad (\text{A.34})$$

Donde el potencial químico configuracional  $\mu_c$  se interpreta como la barrera de energía potencial configuracional necesaria para llevar a cabo un cambio de configuración. La probabilidad de que ocurra un re arreglo configuracional,  $W(T)$ , es proporcional a la fracción de regiones CRR

$$Wn/\tilde{N}$$

de donde encuentran que

$$W(T) = A \exp(-z * \Delta\mu/k_B T) \quad (\text{A.35})$$

donde  $A$  representa un factor de frecuencia, y  $z * \Delta\mu = \mu_c - \mu = G_c - G$ .

Proponen la existencia de un valor crítico para el valor mínimo de  $z$  en una CRR,  $z^*$ , para el cuál existe una probabilidad de transición, caracterizada por una entropía configuracional crítica  $s^*_c$

$$z^*_c = \frac{N_A s^*_c}{S_c} \quad (\text{A.36})$$

donde  $N_A$  es el número de Avogadro.

La probabilidad promedio de una transición puede reescribirse como,

$$\overline{W}(T) = \overline{A} \exp\left(-\frac{\Delta\mu s^*_c}{k_B T S_c}\right) \quad (\text{A.37})$$

donde  $\overline{A}$  es un factor independiente de la temperatura.

Debido a que los tiempos de relajamiento están relacionados recíprocamente con la probabilidad de transición, se puede escribir  $\log a_T$ ,

$$LSF = \log(a_T) = \log \frac{\mathcal{T}(T)}{\mathcal{T}(T_s)} \propto \frac{1}{\overline{W}(T)} \quad (\text{A.38})$$

donde  $T_s$  es una temperatura de referencia.

Finalmente se encuentra la llamada ecuación de Adam Gibbs en términos de la entropía configuracional

$$-LSF(T_s) = 2.303 \frac{\Delta\mu S_c^*}{k_B} \left[ \frac{1}{T_s S_c(T_s)} - \frac{1}{T S_c(T)} \right] \quad (\text{A.39})$$

donde  $\Delta\mu$  es el potencial químico configuracional, entendido como la barrera de energía potencial que debe ser superada para producir un reordenamiento de las moléculas dentro de una región de reordenamiento cooperativo CRR,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $S_c^*$  representa una entropía crítica configuracional y  $S_c$  es la entropía configuracional del sistema. Puede evaluarse mediante  $\Delta C_P$ .

### A.3. La solubilidad en sistemas binarios

Una solución se dice que se está saturada cuando se encuentra en equilibrio termodinámico con la fase sólida, es decir, cuando el potencial químico de la solución es igual al potencial químico del soluto  $\mu^{sol} = \mu^{st}$  a una cierta temperatura. Más allá de este límite, en el llamado sobresaturado, el soluto se precipitará de la solución en su fase sólida, dado que el sistema buscará su estado de equilibrio más próximo de acuerdo a lo expuesto en el capítulo 1. Es así que la sobresaturación es un factor inicial del proceso de cristalización. Sin embargo, la sobresaturación no es una condición suficiente para que un sistema cristalice. Antes de que un cristal se desarrolle debe existir en la solución un cierto número de semillas/núcleos/embriones que actúen como centros de cristalización [12] lo cuales deben crecer hasta un cierto tamaño 'critico' para que la cristalización se desarrolle, la cuál se presentará de forma espontánea o de forma inducida (artificialmente).

La cinética del proceso de nucleación proviene de las diferencias de densidad y/o composición del sistema creando cambios en su estructura en su retorno al equilibrio [327]. Una fluctuación en el sistema provoca una respuesta que la contrarresta, en este caso la respuesta es pasar a una fase estable. Sin embargo, cómo y cuando se formará un núcleo cristalino en la mezcla aún sigue siendo un evento no determinado pero si se pueden establecer ciertas teorías de aproximación.

El estudio de las soluciones, las condiciones de equilibrio y estabilidad comenzaron a finales del siglo XIX. Y para el año de 1897 W. Ostwald [328] diferenció la sobresaturación para clasificar aquellas soluciones en las que se observó la nucleación espontánea como lábiles o inestables y las que no lábiles o metastables. Las primeras son aquellas en las que el proceso de cristalización es espontáneo y las segundas aquellas en las que es necesario la creación de una fluctuación para iniciar este proceso, para forzarlo como sucede para las soluciones acuosas de azúcares. En 1907 Miers e Isaac proponen un diagrama de equilibrio solubilidad-supersolubilidad como el que se observa en la figura A.2. En este diagrama se observan las tres zonas propuestas por Ostwald: la no saturada donde la solución está en equilibrio, la metastable más allá del saturado y la lábil o inestable en las que se formarán

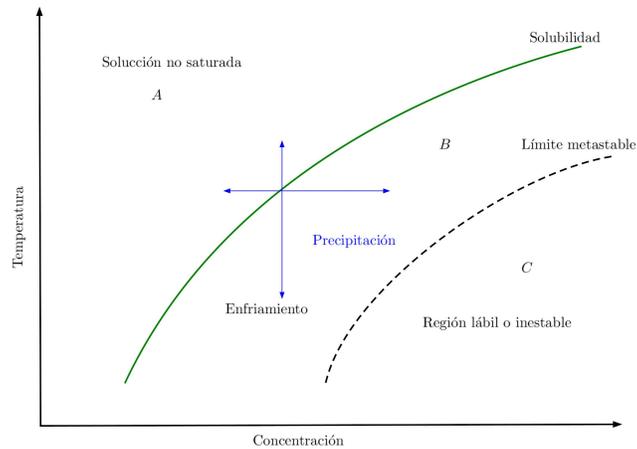


Figura A.2: Diagrama de equilibrio solubilidad-supersolubilidad.

los cristales y crecerán dependiendo del tipo de solución.

Por ejemplo, si se colocara un núcleo de cristal de azúcar en una solución que se encuentre en la zona metastable de la solución sobresaturada se favorecerá la cristalización ya que al tratarse de un estado fuera de equilibrio, se verá favorecido hacia un estado de menor energía. Este método es el usado en la gran industria azucarera. De hecho para este tipo de mezclas sin esta 'ayuda' la cristalización por si sola no ocurre.



---

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] S. Ruiz-Matus and P. Goldstein, “On the universality of viscosity in supersaturated binary aqueous sugar solutions: Cryopreservation by vitrification,” *Cryobiology*, vol. 115, p. 104886, 2024.
- [2] W. T. Glasgow, “4. the effect of pressure in lowering the freezing-point of water experimentally demonstrated,” *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, vol. 2, pp. 267–271, 1851.
- [3] J. Rowlinson, “The work of thomas andrews and james thomson on the liquefaction of gases,” *Notes and Records of the Royal Society of London*, vol. 57, no. 2, pp. 143–159, 2003.
- [4] T. Andrews, “Xviii. the bakerian lecture.—on the continuity of the gaseous and liquid states of matter,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, no. 159, pp. 575–590, 1869.
- [5] A. D. Pelton, *Phase diagrams and thermodynamic modeling of solutions*. Academic Press, 2018.
- [6] İ. Tosun, *The thermodynamics of phase and reaction equilibria*. Elsevier, 2021.
- [7] L. Glasser, “Water, water, everywhere: Phase diagrams of ordinary water substance,” *Journal of chemical education*, vol. 81, no. 3, p. 414, 2004.
- [8] U. W. Gedde and F. Helmholtz, *Essential classical thermodynamics*. Springer, 2020.
- [9] L. Q. Lobo and A. G. Ferreira, “Phase equilibria from the exactly integrated clapeyron equation,” *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 33, no. 11, pp. 1597–1617, 2001.
- [10] B. Cantor, *The Equations of Materials*. Oxford University Press, 2020.
- [11] R. DeHoff, *Thermodynamics in Materials Science*. CRC Press, 2006.
- [12] J. W. Mullin, *Crystallization*. Elsevier, 2001.
- [13] I. Levine, *Physical Chemistry*. McGraw-Hill international edition, McGraw-Hill Education, 2009.
- [14] J. G. Kirkwood and I. Oppenheim, *Chemical thermodynamics*. McGraw-Hill, 1961.
- [15] H. B. CALLEN, “Introducción a las teorías físicas de la termostática del equilibrio y de la termodinámica irreversible,”
- [16] D. Kondepudi and I. Prigogine, *Modern thermodynamics: from heat engines to dissipative structures*. John Wiley & Sons, 2014.
- [17] G. W. Castellan, *Fisicoquímica*. Pearson Educación, 1987.

- [18] T. Matsushita and K. Mukai, *Chemical thermodynamics in material science*. Springer, 2018.
- [19] F. Guthrie, “Lii. on eutexia,” *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 17, no. 108, pp. 462–482, 1884.
- [20] K. El Kadi and I. Janajreh, “Desalination by freeze crystallization: an overview,” *Int. J. Therm. Environ. Eng.*, vol. 15, no. 2, pp. 103–110, 2017.
- [21] P. G. Koutsoukos, A. N. Kofina, and D. G. Kanellopoulou, “Solubility of salts in water: Key issue for crystal growth and dissolution processes,” *Pure and applied chemistry*, vol. 79, no. 5, pp. 825–850, 2007.
- [22] I. Levine, *Physical Chemistry*. McGraw-Hill, 2008.
- [23] B. E. Poling, J. M. Prausnitz, and J. P. O’connell, *Properties of gases and liquids*. McGraw-Hill Education, 2001.
- [24] M. Papadopoulos and E. Derr, “Group interaction. ii. a test of the group model on binary solutions of hydrocarbons,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 81, no. 10, pp. 2285–2289, 1959.
- [25] O. Redlich, E. Derr, and G. Pierotti, “Group interactin. i. a model for interaction in solutions,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 81, no. 10, pp. 2283–2285, 1959.
- [26] K. S. Pitzer and Y.-g. Li, “Thermodynamics of aqueous sodium chloride to 823 k and 1 kilobar (100 mpa),” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 80, no. 24, pp. 7689–7693, 1983.
- [27] H. Langer and H. Offermann, “On the solubility of sodium chloride in water,” *Journal of crystal growth*, vol. 60, no. 2, pp. 389–392, 1982.
- [28] W. Gunter, I.-M. Chou, and S. Girsperger, “Phase relations in the system nacl-kcl-h<sub>2</sub>o ii: Differential thermal analysis of the halite liquidus in the nacl-h<sub>2</sub>o binary above 450° c,” *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 47, no. 5, pp. 863–873, 1983.
- [29] K. S. Pitzer, J. C. Peiper, and R. Busey, “Thermodynamic properties of aqueous sodium chloride solutions,” *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 13, no. 1, pp. 1–102, 1984.
- [30] A. Anderko and K. S. Pitzer, “Equation-of-state representation of phase equilibria and volumetric properties of the system nacl-h<sub>2</sub>o above 573 k,” *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 57, no. 8, pp. 1657–1680, 1993.
- [31] C. P. Lamas, C. Vega, and E. G. Noya, “Freezing point depression of salt aqueous solutions using the madrid-2019 model,” *The Journal of chemical physics*, vol. 156, no. 13, 2022.
- [32] C. J. Downes and K. S. Pitzer, “Thermodynamics of electrolytes. binary mixtures formed from aqueous nacl, na<sub>2</sub>so<sub>4</sub>, cucl<sub>2</sub>, and cuso<sub>4</sub>, at 25 c,” *Journal of Solution Chemistry*, vol. 5, pp. 389–398, 1976.
- [33] J. Bohm, “The history of crystal growth,” *Acta Physica Hungarica*, vol. 57, no. 3-4, pp. 161–178, 1985.
- [34] D. M. Murphy and T. Koop, “Review of the vapour pressures of ice and supercooled water for atmospheric applications,” *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society: A journal of the atmospheric sciences, applied meteorology and physical oceanography*, vol. 131, no. 608, pp. 1539–1565, 2005.

- 
- [35] G. Tammann, "Ueber die abhängigkeit der zahl der kerne, welche sich in verschiedenen unterkühlten flüssigkeiten bilden, von der temperatur," *Zeitschrift für physikalische Chemie*, vol. 25, no. 1, pp. 441–479, 1898.
- [36] P. H. Handle, T. Loerting, and F. Sciortino, "Supercooled and glassy water: Metastable liquid (s), amorphous solid (s), and a no-man's land," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 51, pp. 13336–13344, 2017.
- [37] J. Jackle, "Models of the glass transition," *Reports on Progress in Physics*, vol. 49, no. 2, p. 171, 1986.
- [38] I. Gutzow and A. Dobрева, "Structure, thermodynamic properties and cooling rate of glasses," *Journal of non-crystalline solids*, vol. 129, no. 1, pp. 266–275, 1991.
- [39] D. Champion, M. Le Meste, and D. Simatos, "Towards an improved understanding of glass transition and relaxations in foods: molecular mobility in the glass transition range," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 11, no. 2, pp. 41–55, 2000.
- [40] N. Giovambattista, C. A. Angell, F. Sciortino, and H. E. Stanley, "Structural relaxation in the glass transition region of water," *Physical Review E*, vol. 72, no. 1, p. 011203, 2005.
- [41] K. Rao, *Structural chemistry of glasses*. Elsevier, 2002.
- [42] C. A. Angell, "Formation of glasses from liquids and biopolymers," *Science*, vol. 267, no. 5206, pp. 1924–1935, 1995.
- [43] R. Richert and A. Blumen, *Disorder effects on relaxational processes: glasses, polymers, proteins*. 2012.
- [44] G. White and S. Cakebread, "The glassy state in certain sugar-containing food products," *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 1, no. 1, pp. 73–82, 1966.
- [45] Y. Roos and M. Karel, "Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars," *Biotechnology Progress*, vol. 7, no. 1, pp. 49–53, 1991.
- [46] L. Slade, H. Levine, and D. S. Reid, "Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety," *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, vol. 30, no. 2-3, pp. 115–360, 1991.
- [47] G. Johari and D. Pyke, "On the glassy and supercooled liquid states of a common medicament: Aspirin," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 2, no. 23, pp. 5479–5484, 2000.
- [48] V. Krishnan and T. Lakshmi, "Bioglass: A novel biocompatible innovation," *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, vol. 4, no. 2, pp. 78–83, 2013.
- [49] C. Angell, "In franks, f.(ed.) water: A comprehensive treatise vol. 7, 1–81," 1982.
- [50] F. Franks, S. Mathias, and R. Hatley, "Water, temperature and life," *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, vol. 326, no. 1237, pp. 517–533, 1990.
- [51] A. Hallbrucker, E. Mayer, and G. Johari, "The heat capacity and glass transition of hyperquenched glassy water," *Philosophical Magazine B*, vol. 60, no. 2, pp. 179–187, 1989.
- [52] C. A. Angell, "Amorphous Water," *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 55, no. 1, pp. 559–583, 2004.

- [53] D. G. Fahrenheit, “Viii. experimenta & observationes de congelatione aquæ in vacuo factæ a dg fahrenheit, rs s,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 33, no. 382, pp. 78–84, 1724.
- [54] E. Burton and W. Oliver, “X-ray diffraction patterns of ice,” *Nature*, vol. 135, no. 3413, pp. 505–506, 1935.
- [55] E. Burton and W. Oliver, “The crystal structure of ice at low temperatures,” *Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences*, vol. 153, no. 878, pp. 166–172, 1935.
- [56] G. Johari, A. Hallbrucker, and E. Mayer, “The glass–liquid transition of hyperquenched water,” *Nature*, vol. 330, no. 6148, p. 552, 1987.
- [57] V. Velikov, S. Borick, and C. Angell, “The glass transition of water, based on hyperquenching experiments,” *Science*, vol. 294, no. 5550, pp. 2335–2338, 2001.
- [58] P. Lucas, J. Pries, S. Wei, and M. Wuttig, “The glass transition of water, insight from phase change materials,” *Journal of Non-Crystalline Solids: X*, vol. 14, p. 100084, 2022.
- [59] E. Jenckel and R. Heusch, “Die erniedrigung der einfriertemperatur organischer gläser durch lösungsmittel,” *Kolloid-Zeitschrift*, vol. 130, no. 2, pp. 89–105, 1953.
- [60] H. Eyring and J. Hirschfelder, “The theory of the liquid state,” *Journal of physical chemistry*, vol. 41, no. 2, pp. 249–257, 1937.
- [61] E. D. Zanotto and D. R. Cassar, “The race within supercooled liquids—relaxation versus crystallization,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 149, no. 2, p. 024503, 2018.
- [62] F. Stickel, E. W. Fischer, and R. Richert, “Dynamics of glass-forming liquids. i. temperature-derivative analysis of dielectric relaxation data,” *The Journal of chemical physics*, vol. 102, no. 15, pp. 6251–6257, 1995.
- [63] F. Stickel, E. W. Fischer, and R. Richert, “Dynamics of glass-forming liquids. ii. detailed comparison of dielectric relaxation, dc-conductivity, and viscosity data,” *The Journal of chemical physics*, vol. 104, no. 5, pp. 2043–2055, 1996.
- [64] A. Lukichev, “Physical meaning of the stretched exponential kohlrusch function,” *Physics Letters A*, vol. 383, no. 24, pp. 2983–2987, 2019.
- [65] R. Palmer, “Relaxation in complex systems,” *Lecture Notes in Physics, Berlin Springer Verlag*, vol. 275, pp. 275–286, 1987.
- [66] S. Arrhenius, “Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren,” *Zeitschrift für physikalische Chemie*, vol. 4, no. 1, pp. 226–248, 1889.
- [67] S. Logan, “The origin and status of the arrhenius equation,” *Journal of Chemical Education*, vol. 59, no. 4, p. 279, 1982.
- [68] S. Glasstone, K. J. Laidler, and H. Eyring, “The theory of rate processes; the kinetics of chemical reactions, viscosity, diffusion and electrochemical phenomena,” tech. rep., McGraw-Hill Book Company, 1941.
- [69] M. D. Ediger, C. A. Angell, and S. R. Nagel, “Supercooled liquids and glasses,” *The journal of physical chemistry*, vol. 100, no. 31, pp. 13200–13212, 1996.
- [70] R. Kohlrausch, “Theorie des elektrischen rückstandes in der leidener flasche,” *Annalen der Physik*, vol. 167, no. 1, pp. 56–82, 1854.

- [71] G. Williams and D. C. Watts, “Non-symmetrical dielectric relaxation behaviour arising from a simple empirical decay function,” *Transactions of the Faraday society*, vol. 66, pp. 80–85, 1970.
- [72] F. Kohlrausch, “Ueber die elastische nachwirkung bei der torsion,” *Annalen der physik*, vol. 195, no. 7, pp. 337–368, 1863.
- [73] G. Williams, D. C. Watts, S. Dev, and A. North, “Further considerations of non symmetrical dielectric relaxation behaviour arising from a simple empirical decay function,” *Transactions of the faraday Society*, vol. 67, pp. 1323–1335, 1971.
- [74] G. B. McKenna, S. W. Martin, C. A. Angell, K. L. Ngai, and P. F. McMillan, “Relaxation in glassforming liquids and amorphous solids,” *Journal of Applied Physics*, vol. 88, no. 6, pp. 3113–3157, 2002.
- [75] E. Donth, *The glass transition: relaxation dynamics in liquids and disordered materials*, vol. 48. Springer Science & Business Media, 2013.
- [76] M. L. Williams, R. F. Landel, and J. D. Ferry, “The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass-forming liquids,” *Journal of the American Chemical society*, vol. 77, no. 14, pp. 3701–3707, 1955.
- [77] H. Vogel, “Das temperaturabhängigkeitsgesetz der viskosität von flüssigkeiten,” *Phys. Z.*, vol. 22, pp. 645–646, 1921.
- [78] G. Tammann and W. Hesse, “Die abhängigkeit der viscosität von der temperatur bie unterkühlten flüssigkeiten,” *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, vol. 156, no. 1, pp. 245–257, 1926.
- [79] G. Tammann and W. Hesse, “Die Abhängigkeit der Viscosität von der Temperatur bie unterkühlten Flüssigkeiten,” *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, vol. 156, no. 1, pp. 245–257, 1926.
- [80] G. S. Fulcher, “Analysis of recent measurements of the viscosity of glasses,” *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 8, no. 6, pp. 339–355, 1925.
- [81] P. Goldstein, L. S. García-Colín, and L. F. Del Castillo, “On the Stokes-Einstein relation in glass forming liquids,” *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 275, no. 3, pp. 325–335, 2000.
- [82] C. Angell, “Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions,” *Chemical reviews*, vol. 102, no. 8, pp. 2627–2650, 2002.
- [83] P. G. Debenedetti and F. H. Stillinger, “Supercooled liquids and the glass transition,” *Nature*, vol. 410, no. 6825, p. 259, 2001.
- [84] C. Angell, R. Bressel, J. Green, H. Kanno, M. Oguni, and E. Sare, “Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions,” *Journal of Food Engineering*, vol. 22, no. 1-4, pp. 115–142, 1994.
- [85] C. Alba-Simionesco and G. Tarjus, “A perspective on the fragility of glass-forming liquids,” *Journal of Non-Crystalline Solids: X*, vol. 14, p. 100100, 2022.
- [86] C. Angell, “Spectroscopy simulation and scattering, and the medium range order problem in glass,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 73, no. 1-3, pp. 1–17, 1985.
- [87] C. A. Angell, “Perspective on the glass transition,” *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, vol. 49, no. 8, pp. 863–871, 1988.

- [88] C. Angell, "Relaxation in liquids, polymers and plastic crystals—strong/fragile patterns and problems," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 131, pp. 13–31, 1991.
- [89] G. Adam and J. H. Gibbs, "On the temperature dependence of cooperative relaxation properties in glass-forming liquids," *The journal of chemical physics*, vol. 43, no. 1, pp. 139–146, 1965.
- [90] J. H. Gibbs and E. A. DiMarzio, "Nature of the glass transition and the glassy state," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 28, no. 3, pp. 373–383, 1958.
- [91] P. Goldstein, L. Del Castillo, and L. Garcia-Colin, "Determination of the isoentropic temperature in the glass transition," *Macromolecules*, vol. 26, no. 4, pp. 655–658, 1993.
- [92] A. Andraca, P. Goldstein, and L. F. del Castillo, "Description of the viscosity of honeys in the supercooled regime," *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 392, no. 24, pp. 6206–6213, 2013.
- [93] A. Andraca, P. Goldstein, and L. F. del Castillo, "Universal behavior of the viscosity of supercooled fragile and polymeric glassformers in different temperature regions," *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 461, pp. 366–373, 2016.
- [94] E. Rössler, "Indications for a change of diffusion mechanism in supercooled liquids," *Physical review letters*, vol. 65, no. 13, p. 1595, 1990.
- [95] E. A. Guggenheim, "The principle of corresponding states," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 13, no. 7, pp. 253–261, 1945.
- [96] J. Hirschfelder, *Molecular Theory of Gases and Liquids [by] Joseph O. Hirschfelder, Charles F. Curtiss [and] R. Byron Bird, with the Assistance of the Staff of the Former University of Wisconsin Naval Research Laboratory: Corrected Printing with Notes Added*. Structure of matter series, Wiley, 1964.
- [97] K. S. Pitzer, "Corresponding states for perfect liquids," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 7, no. 8, pp. 583–590, 1939.
- [98] E. Helfand and S. A. Rice, "Principle of corresponding states for transport properties," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 32, no. 6, pp. 1642–1644, 1960.
- [99] E. Rössler, "Corresponding states analysis for viscosity and nuclear magnetic resonance data in the glass transition regime," *The Journal of chemical physics*, vol. 92, no. 6, pp. 3725–3735, 1990.
- [100] A. Sokolov, E. Rössler, A. Kisliuk, Quitmann, and D., "Dynamics of strong and fragile glass formers: Differences and correlation with low-temperature properties," *Physical review letters*, vol. 71, no. 13, p. 2062, 1993.
- [101] A. Einstein, *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*. Courier Corporation, 1956.
- [102] T. Moran, "The freezing of gelatin gel," *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, vol. 112, no. 760, pp. 30–46, 1926.
- [103] W. Stiles, "On the cause of cold death of plants," *Protoplasma*, vol. 9, no. 1, pp. 459–468, 1930.
- [104] L. A. Alves, J. B. Almeida e Silva, and M. Giulietti, "Solubility of d-glucose in water and ethanol/water mixtures," *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 52, no. 6, pp. 2166–2170, 2007.

- [105] A. G. Jones, *Crystallization process systems*. Elsevier, 2002.
- [106] B. Herrington, "Some physico-chemical properties of lactose: I. the spontaneous crystallization of supersaturated solutions of lactose," *Journal of Dairy Science*, vol. 17, no. 7, pp. 501–518, 1934.
- [107] F. E. Young and F. T. Jones, "Sucrose hydrates: The sucrose-water phase diagram," *Journal of Physical Colloid Chemistry*, vol. 53, no. 9, pp. 1334–1350, 1949.
- [108] T. M. HERRINGTON and A. C. BRANFIELD, "Physico-chemical studies on sugar glasses," *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 19, no. 4, pp. 409–425, 2010.
- [109] A. MacKenzie, "Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems," *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, vol. 278, no. 959, pp. 167–189, 1977.
- [110] F. E. Young, F. T. Jones, and H. J. Lewis, "D-fructose-water phase diagram," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 56, no. 9, pp. 1093–1096, 1952.
- [111] F. E. Young, "D-glucose-water phase diagram," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 61, no. 5, pp. 616–619, 1957.
- [112] B. J. Luyet, "Phase Transitions Encountered in the Rapid Freezing of Aqueous Solutions," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 125, no. 2, pp. 502–521, 1965.
- [113] B. Wowk, "Thermodynamic aspects of vitrification," *Cryobiology*, vol. 60, no. 1, pp. 11–22, 2010.
- [114] B. Luyet, "on Various Phase Transitions Occurring in Aqueous Solutions At Low Temperatures," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 85, no. 2, pp. 549–569, 1960.
- [115] F. H. Stillinger and P. G. Debenedetti, "Glass transition thermodynamics and kinetics," *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.*, vol. 4, no. 1, pp. 263–285, 2013.
- [116] D. H. Rasmussen and A. P. MacKenzie, "Phase diagram for the system water–dimethylsulphoxide," *Nature*, vol. 220, no. 5174, pp. 1315–1317, 1968.
- [117] F. Franks, *Biophysics and biochemistry at low temperatures*. 1985.
- [118] J. Vašátko and A. Smelik, "Solubility of anhydrous  $\beta$ -d-fructose in water," *Chemical Papers*, vol. 21, no. 9, pp. 736–738, 1967.
- [119] A. M. Lammert, S. J. Schmidt, and G. A. Day, "Water activity and solubility of trehalose," *Food Chemistry*, vol. 61, no. 1-2, pp. 139–144, 1998.
- [120] D. P. Miller, J. J. de Pablo, and H. Corti, "Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions," *Pharmaceutical Research*, vol. 14, no. 5, pp. 578–590, 1997.
- [121] G. Wilson and C. Deal, "Activity coefficients and molecular structure. activity coefficients in changing environments-solutions of groups," *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, vol. 1, no. 1, pp. 20–23, 1962.
- [122] D. S. Abrams and J. M. Prausnitz, "Statistical thermodynamics of liquid mixtures: a new expression for the excess gibbs energy of partly or completely miscible systems," *AIChE journal*, vol. 21, no. 1, pp. 116–128, 1975.

- [123] B. L. Larsen, P. Rasmussen, and A. Fredenslund, "A modified unifac group-contribution model for prediction of phase equilibria and heats of mixing," *Industrial & engineering chemistry research*, vol. 26, no. 11, pp. 2274–2286, 1987.
- [124] A. Fredenslund, J. Gmehling, M. L. Michelsen, P. Rasmussen, and J. M. Prausnitz, "Computerized design of multicomponent distillation columns using the unifac group contribution method for calculation of activity coefficients," *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, vol. 16, no. 4, pp. 450–462, 1977.
- [125] A. M. Peres and E. A. Macedo, "Thermodynamic properties of sugars in aqueous solutions: correlation and prediction using a modified uniquac model," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 123, no. 1-2, pp. 71–95, 1996.
- [126] G. Blond, D. Simatos, M. Catté, C. G. Dussap, and J. B. Gros, "Modeling of the water-sucrose state diagram below 0 c," *Carbohydrate Research*, vol. 298, no. 3, pp. 139–145, 1997.
- [127] N. Spiliotis and D. Tassios, "A unifac model for phase equilibrium calculations in aqueous and nonaqueous sugar solutions," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 173, no. 1, pp. 39–55, 2000.
- [128] O. Ferreira, E. A. Brignole, and E. A. Macedo, "Phase equilibria in sugar solutions using the a-unifac model," *Industrial & engineering chemistry research*, vol. 42, no. 24, pp. 6212–6222, 2003.
- [129] H. R. Corti, C. A. Angell, T. Auffret, H. Levine, M. P. Buera, D. S. Reid, Y. H. Roos, and L. Slade, "Empirical and theoretical models of equilibrium and non-equilibrium transition temperatures of supplemented phase diagrams in aqueous systems (IUPAC technical report)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 82, no. 5, pp. 1065–1097, 2010.
- [130] M. P. Buera, Y. Roos, H. Levine, L. Slade, H. R. Corti, D. S. Reid, T. Auffret, and C. A. Angell, "State diagrams for improving processing and storage of foods, biological materials, and pharmaceuticals (IUPAC Technical Report)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 83, no. 8, pp. 1567–1617, 2011.
- [131] G. M. Kontogeorgis and G. K. Folas, *Thermodynamic models for industrial applications: from classical and advanced mixing rules to association theories*. John Wiley & Sons, 2009.
- [132] M. Baghbanbashi and G. Pazuki, "Application of soft-vr equation of state for prediction of thermophysical properties of sugar solutions," *Journal of Food Process Engineering*, vol. 39, no. 6, pp. 601–609, 2016.
- [133] L. T. Paese, R. L. Spengler, R. d. P. Soares, and P. B. Staudt, "Predicting phase equilibrium of aqueous sugar solutions and industrial juices using cosmo-sac," *Journal of food engineering*, vol. 274, p. 109836, 2020.
- [134] H. Levine and L. Slade, "A polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products (shps)," *Carbohydrate polymers*, vol. 6, no. 3, pp. 213–244, 1986.
- [135] H. Levine and L. Slade, "Principles of "cryostabilization" technology from structure/property relationships of carbohydrate/water systems—a review," *Cryo-letters*, vol. 9, no. 1, pp. 21–63, 1988.
- [136] H. Levine and L. Slade, "Thermomechanical Properties of Small-carbohydrate-Water Glasses and 'Rubbers'," *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, vol. 84, no. 8, pp. 2619–2633, 1988.

- [137] H. Levine and L. Slade, “Influences of the glassy and rubbery states on the thermal, mechanical, and structural properties of doughs and baked products,” in *Dough rheology and baked product texture*, pp. 157–330, Springer, 1990.
- [138] L. Slade and H. Levine, “A food polymer science approach to structure-property relationships in aqueous food systems: non-equilibrium behavior of carbohydrate-water systems,” *Water Relationships in Foods: Advances in the 1980s and Trends for the 1990s*, pp. 29–101, 1991.
- [139] L. Slade and H. Levine, “Glass transitions and water-food structure interactions,” *Advances in food and nutrition research*, vol. 38, pp. 103–269, 1995.
- [140] Y. Roos and M. Karel, “Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions,” *International journal of food science & technology*, vol. 26, no. 6, pp. 553–566, 1991.
- [141] J.-H. Zhao, P. K. Kumar, and S. S. Sablani, “Glass transitions in frozen systems as influenced by molecular weight of food components,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 21, no. 6, pp. 4683–4715, 2022.
- [142] X. Sun, Y. Wu, Z. Song, and X. Chen, “A review of natural polysaccharides for food cryoprotection: Ice crystals inhibition and cryo-stabilization,” *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, vol. 27, p. 100291, 2022.
- [143] S. Mahato, Z. Zhu, and D.-W. Sun, “Glass transitions as affected by food compositions and by conventional and novel freezing technologies: A review,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 94, pp. 1–11, 2019.
- [144] Z. Zhu, Q. Zhou, and D.-W. Sun, “Measuring and controlling ice crystallization in frozen foods: A review of recent developments,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 90, pp. 13–25, 2019.
- [145] F. Fan and Y. H. Roos, “Glass transition-associated structural relaxations and applications of relaxation times in amorphous food solids: a review,” *Food Engineering Reviews*, vol. 9, pp. 257–270, 2017.
- [146] S. Balasubramanian, A. Devi, K. Singh, S. D. Bosco, and A. M. Mohite, “Application of glass transition in food processing,” *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 56, no. 6, pp. 919–936, 2016.
- [147] Y. H. Roos, “Glass transition temperature and its relevance in food processing,” *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 1, pp. 469–496, 2010.
- [148] L. Cheng, D.-W. Sun, Z. Zhu, and Z. Zhang, “Emerging techniques for assisting and accelerating food freezing processes: A review of recent research progresses,” *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 57, no. 4, pp. 769–781, 2017.
- [149] Y. H. Roos and S. Drusch, *Phase transitions in foods*. Academic Press, 2015.
- [150] C. POLGE, “Low-temperature storage of mammalian spermatozoa,” *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, vol. 147, no. 929, pp. 498–508, 1957.
- [151] A. Parkes and A. Smith, “Storage of testicular tissue at very low temperatures,” *British Medical Journal*, vol. 1, no. 4857, p. 315, 1954.
- [152] A. Eroglu, M. J. Russo, R. Bieganski, A. Fowler, S. Cheley, H. Bayley, and M. Toner, “Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells,” *Nature Biotechnology*, vol. 18, no. 2, pp. 163–167, 2000.

- [153] S. M. Willadsen, C. Polge, L. Rowson, and R. Moor, “Deep freezing of sheep embryos,” *Reproduction*, vol. 46, no. 1, pp. 151–154, 1976.
- [154] W. F. Wolkers, F. Tablin, and J. H. Crowe, “From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells,” *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 131, no. 3, pp. 535–543, 2002.
- [155] J. A. Kulkarni, P. R. Cullis, and R. Van Der Meel, “Lipid nanoparticles enabling gene therapies: from concepts to clinical utility,” *Nucleic acid therapeutics*, vol. 28, no. 3, pp. 146–157, 2018.
- [156] A. Akinc, M. A. Maier, M. Manoharan, K. Fitzgerald, M. Jayaraman, S. Barros, S. Ansell, X. Du, M. J. Hope, T. D. Madden, *et al.*, “The onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs,” *Nature nanotechnology*, vol. 14, no. 12, pp. 1084–1087, 2019.
- [157] S. S. Stachura, C. J. Malajczuk, and R. L. Mancera, “Does sucrose change its mechanism of stabilization of lipid bilayers during desiccation? influences of hydration and concentration,” *Langmuir*, vol. 35, no. 47, pp. 15389–15400, 2019.
- [158] P. Zhao, X. Hou, J. Yan, S. Du, Y. Xue, W. Li, G. Xiang, and Y. Dong, “Long-term storage of lipid-like nanoparticles for mrna delivery,” *Bioactive materials*, vol. 5, no. 2, pp. 358–363, 2020.
- [159] H. Rouco, P. Diaz-Rodriguez, A. Guillin, C. Remuñán-López, and M. Landin, “A traffic light system to maximize carbohydrate cryoprotectants’ effectivity in nanostructured lipid carriers’ lyophilization,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 9, p. 1330, 2021.
- [160] D. J. Crommelin, T. J. Anchordoquy, D. B. Volkin, W. Jiskoot, and E. Mastrobattista, “Addressing the cold reality of mrna vaccine stability,” *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 110, no. 3, pp. 997–1001, 2021.
- [161] T. Chang and G. Zhao, “Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges,” *Advanced Science*, vol. 8, no. 6, p. 2002425, 2021.
- [162] G. Doebbler, “Cryoprotective compounds: Review and discussion of structure and function,” *Cryobiology*, vol. 3, no. 1, pp. 2–11, 1966.
- [163] Y. Roos and M. Karel, “Water and molecular weight effects on glass transitions in amorphous carbohydrates and carbohydrate solutions,” *Journal of food science*, vol. 56, no. 6, pp. 1676–1681, 1991.
- [164] B. Luyet, “on Various Phase Transitions Occurring in Aqueous Solutions At Low Temperatures,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 85, no. 2, pp. 549–569, 1960.
- [165] I. I. Katkov and F. Levine, “Prediction of the glass transition temperature of water solutions: comparison of different models,” *Cryobiology*, vol. 49, no. 1, pp. 62–82, 2004.
- [166] J. G. Constantin, M. Schneider, and H. R. Corti, “Glass transition temperature of saccharide aqueous solutions estimated with the free volume/percolation model,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 120, no. 22, pp. 5047–5055, 2016.
- [167] M. Gordon and J. S. Taylor, “Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. i. non-crystalline copolymers,” *Journal of Applied Chemistry*, vol. 2, no. 9, pp. 493–500, 1952.
- [168] J. M. Gordon, G. B. Rouse, J. H. Gibbs, and W. M. Risen, “The composition dependence of glass transition properties,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 66, no. 11, pp. 4971–4976, 1977.

- [169] E. DiMarzio and J. Gibbs, "Glass temperature of copolymers," *Journal of Polymer Science*, vol. 40, no. 136, pp. 121–131, 1959.
- [170] H. A. Schneider, "The gordon-taylor equation. additivity and interaction in compatible polymer blends," *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 189, no. 8, pp. 1941–1955, 1988.
- [171] P. Couchman and F. Karasz, "A classical thermodynamic discussion of the effect of composition on glass-transition temperatures," *Macromolecules*, vol. 11, no. 1, pp. 117–119, 1978.
- [172] Y. Roos, "Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates," *Carbohydrate research*, vol. 238, pp. 39–48, 1993.
- [173] C. A. Angell, E. Sare, and R. Bressel, "Concentrated electrolyte solution transport theory: Directly measured glass temperatures and vitreous ice," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 71, no. 8, pp. 2759–2761, 1967.
- [174] I. Yannas, "Vitrification temperature of water," *Science*, vol. 160, no. 3825, pp. 298–299, 1968.
- [175] D. H. Rasmussen and A. P. MacKenzie, "The glass transition in amorphous water. Application of the measurements to problems arising in cryobiology," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 75, no. 7, pp. 967–973, 1971.
- [176] B. Luyet, "On the possible biological significance of some physical changes encountered in the cooling and the rewarming of aqueous solutions," *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms: Proceedings*, vol. 2, pp. 1–20, 1967.
- [177] T. Ellis, "Moisture-induced plasticization of amorphous polyamides and their blends," *Journal of applied polymer science*, vol. 36, no. 3, pp. 451–466, 1988.
- [178] P. Orford, R. Parker, S. Ring, and A. Smith, "Effect of water as a diluent on the glass transition behaviour of malto-oligosaccharides, amylose and amylopectin," *International journal of biological macromolecules*, vol. 11, no. 2, pp. 91–96, 1989.
- [179] A.-L. Ollett and R. Parker, "The viscosity of supercooled fructose and its glass transition temperature," *Journal of texture studies*, vol. 21, no. 3, pp. 355–362, 1990.
- [180] J. Pochan, C. Beatty, and D. Pochan, "Different approach for the correlation of the  $T_g$  of mixed amorphous systems," *Polymer*, vol. 20, no. 7, pp. 879–886, 1979.
- [181] J. E. Schawe, "The influence of hydrogen bonds on the glass transition in amorphous binary systems," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 368, p. 120598, 2022.
- [182] S. Arrhenius, "Über die innere reibung verdünnter wässriger lösungen," *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, vol. 1, no. 1, pp. 285–298, 1887.
- [183] E. C. Bingham, "Xcix.—a criticism of some recent viscosity investigations," *Journal of the Chemical Society, Transactions*, vol. 103, pp. 959–965, 1913.
- [184] C. H. Lees, "X. on the viscosities of mixtures of liquids and of solutions," *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 1, no. 1, pp. 128–147, 1901.
- [185] A. Einstein, "Zur theorie der brownschen bewegung," *Annalen der physik*, vol. 324, no. 2, pp. 371–381, 1906.

- [186] A. Hughes, "The einstein relation between relative viscosity and volume concentration of suspensions of spheres," *Nature*, vol. 173, pp. 1089–1090, 1954.
- [187] S. Arrhenius, "The viscosity of solutions," *Biochemical Journal*, vol. 11, no. 2, p. 112, 1917.
- [188] S. P. Moulik, "Proposed viscosity-concentration equation beyond einstein's region," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 72, no. 13, pp. 4682–4684, 1968.
- [189] K. Toda and H. Furuse, "Extension of einstein's viscosity equation to that for concentrated dispersions of solutes and particles," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 102, no. 6, pp. 524–528, 2006.
- [190] J. Kendall and K. P. Monroe, "The viscosity of liquids. ii. the viscosity-composition curve for ideal liquid mixtures.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 39, no. 9, pp. 1787–1802, 1917.
- [191] A. E. Dunstan and F. B. Thole, "Xix.—the relation between viscosity and chemical constitution. part vi. viscosity an additive function," *Journal of the Chemical Society, Transactions*, vol. 103, pp. 127–133, 1913.
- [192] E. C. Bingham and R. F. Jackson, "Standard substances for the calibration of viscometers," *Journal of the Washington Academy of Sciences*, vol. 7, no. 3, pp. 53–55, 1917.
- [193] V. Vand, "Viscosity of solutions and suspensions. III: Theoretical interpretation of viscosity of sucrose solutions," *Journal of Physical and Colloid Chemistry*, vol. 52, no. 2, pp. 314–321, 1948.
- [194] V. Vand, "Viscosity of solutions and suspensions. II: Experimental determination of the viscosity-concentration function of spherical suspensions," *Journal of Physical and Colloid Chemistry*, vol. 52, no. 2, pp. 300–314, 1948.
- [195] V. Vand, "Viscosity of solutions and suspensions. iii. theoretical interpretation of viscosity of sucrose solutions," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 52, no. 2, pp. 314–321, 1948.
- [196] S. Moulik and D. Khan, "Viscosities of concentrated solutions of polyhydroxy nonelectrolytes, glucose, sucrose, mannitol & sorbitol in relation to solute-solvent interaction & a universal viscosity equation," 1977.
- [197] J. Chirife and M. Buera, "A simple model for predicting the viscosity of sugar and oligosaccharide solutions," *Journal of Food Engineering*, vol. 33, no. 3-4, pp. 221–226, 1997.
- [198] H. Meyer and J. D. Ferry, "Viscoelastic properties of glucose glass near its transition temperature," *Transactions of the Society of Rheology*, vol. 9, no. 2, pp. 343–350, 1965.
- [199] J. Hildebrand and R. Lamoreaux, "Fluidity and liquid structure," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 77, no. 11, pp. 1471–1473, 1973.
- [200] J. H. Hildebrand *et al.*, *Viscosity and diffusivity*. Wiley, 1977.
- [201] T. Soesanto and M. C. Williams, "Volumetric interpretation of viscosity for concentrated and dilute sugar solutions," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 85, no. 22, pp. 3338–3341, 1981.
- [202] H. Levine and L. Slade, "Water as a plasticizer: physico-chemical aspects of low-moisture polymeric systems," *Water science reviews*, vol. 3, pp. 79–185, 1988.

- [203] R. Parker, A. Ollet, R. Lai-Fook, and A. Smith, "Rheology of food," *P. Zeuthen, London*, p. 1290, 1990.
- [204] M. Peleg, "On the use of the wlf model in polymers and foods," *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, vol. 32, no. 1, pp. 59–66, 1992.
- [205] R. Parker and S. G. Ring, "Diffusion in maltose-water mixtures at temperatures close to the glass transition," *Carbohydrate Research*, vol. 273, no. 2, pp. 147–155, 1995.
- [206] F. Chenlo, R. Moreira, G. Pereira, and A. Ampudia, "Viscosities of aqueous solutions of sucrose and sodium chloride of interest in osmotic dehydration processes," *Journal of food Engineering*, vol. 54, no. 4, pp. 347–352, 2002.
- [207] S. MAGAZÙG, G. Maisano, P. Migliardo, E. Tettamanti, and V. Villari, "Transport phenomena and anomalous glass-forming behaviour in  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose aqueous solutions," *Molecular Physics*, vol. 96, no. 3, pp. 381–387, 1999.
- [208] M. Rampp, C. Buttersack, and H. D. Lüdemann, "c,T-dependence of the viscosity and the self-diffusion coefficients in some aqueous carbohydrate solutions," *Carbohydrate Research*, vol. 328, no. 4, pp. 561–572, 2000.
- [209] D. Champion, H. Hervet, G. Blond, M. Le Meste, and D. Simatos, "Translational diffusion in sucrose solutions in the vicinity of their glass transition temperature," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 101, no. 50, pp. 10674–10679, 1997.
- [210] H. C. Price, J. Mattsson, and B. J. Murray, "Sucrose diffusion in aqueous solution," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 18, no. 28, pp. 19207–19216, 2016.
- [211] H. R. Corti, G. A. Frank, and M. C. Marconi, "Diffusion-viscosity decoupling in super-cooled aqueous trehalose solutions," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 41, pp. 12899–12906, 2008.
- [212] M. P. Longinotti and H. R. Corti, "Diffusion of ferrocene methanol in super-cooled aqueous solutions using cylindrical microelectrodes," *Electrochemistry Communications*, vol. 9, no. 7, pp. 1444–1450, 2007.
- [213] M. Quintas, T. Brandao, C. Silva, and R. Cunha, "Rheology of supersaturated sucrose solutions," *Journal of food engineering*, vol. 77, no. 4, pp. 844–852, 2006.
- [214] V. R. N. Telis, J. Telis-Romero, H. Mazzotti, and A. L. Gabas, "Viscosity of aqueous carbohydrate solutions at different temperatures and concentrations," *International Journal of food properties*, vol. 10, no. 1, pp. 185–195, 2007.
- [215] M. P. Longinotti and H. R. Corti, "Viscosity of concentrated sucrose and trehalose aqueous solutions including the supercooled regime," *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 37, no. 3, pp. 1503–1515, 2008.
- [216] J. Ubbink and M. Dupas-Langlet, "Rheology of carbohydrate blends close to the glass transition: Temperature and water content dependence of the viscosity in relation to fragility and strength," *Food Research International*, vol. 138, p. 109801, 2020.
- [217] I. Gazi, H. Kim, A. H. Paterson, and T. Huppertz, "Measuring viscosity of supersaturated lactose solutions using dynamic light scattering," *International Dairy Journal*, vol. 102, p. 104596, 2020.
- [218] K. Wagnerowski, "Equation for the viscosity of concentrated pure and impure solutions," *Gaz. Cukrow.*, vol. 84, no. 11, pp. 241–246, 1976.

- [219] M. Mathlouthi and J. Génotelle, “Rheological properties of sucrose solutions and suspensions,” *Sucrose: Properties and applications*, pp. 126–154, 1995.
- [220] F. Schneider, D. Schliephake, and A. Klimmek, “„über die viskosität von reinen saccharoselösungen “,” *Zucker*, vol. 16, pp. 465–473, 1963.
- [221] J. F. Swindells, *Viscosities of sucrose solutions at various temperatures: tables of recalculated values*, vol. 440. For sale by the Supt. of Docs., USGPO, 1958.
- [222] M. Migliori, D. Gabriele, R. Di Sanzo, B. de Cindio, and S. Corraera, “Viscosity of multicomponent solutions of simple and complex sugars in water,” *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 52, no. 4, pp. 1347–1353, 2007.
- [223] F. Franks, “Solid aqueous solutions,” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 65, no. 12, pp. 2527–2537, 1993.
- [224] M. Mathlouthi and P. Reiser, *Sucrose: properties and applications*. Springer Science & Business Media, 1995.
- [225] M. Rampp, C. Buttersack, and H.-D. Lüdemann, “c, t-dependence of the viscosity and the self-diffusion coefficients in some aqueous carbohydrate solutions,” *Carbohydrate Research*, vol. 328, no. 4, pp. 561–572, 2000.
- [226] V. Maidannyk and Y. Roos, “Water sorption, glass transition and “strength” of lactose–whey protein systems,” *Food Hydrocolloids*, vol. 70, pp. 76–87, 2017.
- [227] B. C. Hancock and G. Zografi, “The Relationship Between the Glass Transition Temperature and the Water Content of Amorphous Pharmaceutical Solids,” 1994.
- [228] T. Chen, A. Fowler, and M. Toner, “Literature review: Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture,” *Cryobiology*, vol. 40, no. 3, pp. 277–282, 2000.
- [229] K. D. Roe and T. P. Labuza, “Glass transition and crystallization of amorphous trehalose–sucrose mixtures,” *International Journal of Food Properties*, vol. 8, no. 3, pp. 559–574, 2005.
- [230] R. Chan, K. Pathmanathan, and G. Johari, “Dielectric relaxations in the liquid and glassy states of glucose and its water mixtures,” *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 90, no. 23, pp. 6358–6362, 1986.
- [231] S. Ablett, M. J. Izzard, P. J. Lillford, I. Arvanitoyannis, and J. M. Blanshard, “Calorimetric study of the glass transition occurring in fructose solutions,” *Carbohydrate Research*, vol. 246, no. 1, pp. 13–22, 1993.
- [232] R. H. Hatley and A. Mant, “Determination of the unfrozen water content of maximally freeze-concentrated carbohydrate solutions,” *International journal of biological macromolecules*, vol. 15, no. 4, pp. 227–232, 1993.
- [233] K. Kajiwara and F. Franks, “Crystalline and amorphous phases in the binary system water–raffinose,” *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, vol. 93, no. 9, pp. 1779–1783, 1997.
- [234] S. Ablett, A. H. Clark, J. Martin, and P. J. Lillford, “Heat Capacity–Temperature Data for Sucrose–Water,” vol. 88, no. 6, pp. 795–802, 1992.
- [235] F. Franks, *Water and Aqueous Solutions at Subzero Temperatures*, vol. 7. 2013.
- [236] Y. I. Matveev and S. Ablett, “Calculation of the C<sub>g</sub> and T<sub>g</sub> intersection point in the state diagram of frozen solutions,” *Food Hydrocolloids*, vol. 16, no. 5, pp. 419–422, 2002.

- [237] L. Slade and H. Levine, “Non-equilibrium behavior of small carbohydrate-water systems,” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 60, no. 12, pp. 1841–1864, 1988.
- [238] L. Slade and H. Levine, “Non-equilibrium behavior of small carbohydrate-water system,” vol. 60, no. 12, pp. 1841–1864, 1988.
- [239] I. B. Cruz, J. C. Oliveira, and W. M. MacInnes, “Dynamic mechanical thermal analysis of aqueous sugar solutions containing fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose,” *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 36, no. 5, pp. 539–550, 2001.
- [240] D. Z. Icoz and J. L. Kokini, “State diagrams of food materials,” in *Food Materials Science: Principles and Practice*, pp. 95–121, Springer, 2008.
- [241] Y. H. Roos, “Glass transition temperature and its relevance in food processing,” *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 1, no. 1, pp. 469–496, 2010.
- [242] J. K. Sears, N. Touchette, and J. Darby, “Plasticizers,” ACS Publications, 1974.
- [243] V. Telis and P. J. d. A. Sobral, “Glass transitions and state diagram for freeze-dried pineapple,” *LWT-Food Science and Technology*, vol. 34, no. 4, pp. 199–205, 2001.
- [244] P. J. d. A. Sobral, V. Telis, A. Habitante, and A. Sereno, “Phase diagram for freeze-dried persimmon,” *Thermochimica Acta*, vol. 376, no. 1, pp. 83–89, 2001.
- [245] H. Wang, S. Zhang, and G. Chen, “Glass transition and state diagram for fresh and freeze-dried chinese gooseberry,” *Journal of Food Engineering*, vol. 84, no. 2, pp. 307–312, 2008.
- [246] R. M. Syamaladevi, S. S. Sablani, J. Tang, J. Powers, and B. G. Swanson, “State diagram and water adsorption isotherm of raspberry (*rubus idaeus*),” *Journal of Food Engineering*, vol. 91, no. 3, pp. 460–467, 2009.
- [247] N. Guizani, G. S. Al-Saidi, M. S. Rahman, S. Bornaz, and A. A. Al-Alawi, “State diagram of dates: Glass transition, freezing curve and maximal-freeze-concentration condition,” *Journal of Food Engineering*, vol. 99, no. 1, pp. 92–97, 2010.
- [248] A. Grajales-Lagunes, C. Rivera-Bautista, I. Loredó-García, R. González-García, M. González-Chávez, S. Schmidt, and M. Ruiz-Cabrera, “Using model food systems to develop mathematical models for construction of state diagrams of fruit products,” *Journal of food engineering*, vol. 230, pp. 72–81, 2018.
- [249] G. Wypych, “Effect of plasticizers on properties of plasticized materials,” *Handbook of plasticizers*, pp. 209–332, 2017.
- [250] C. Olsson and J. Swenson, “Structural comparison between sucrose and trehalose in aqueous solution,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 124, no. 15, pp. 3074–3082, 2020.
- [251] D. Van Delft, “Little cup of helium, big science,” *Physics Today*, vol. 61, no. 3, pp. 36–42, 2008.
- [252] M. Iwaya-Inoue, M. Sakurai, and M. Uemura, *Survival strategies in extreme cold and desiccation*. Springer, 2018.
- [253] M. Dou, C. Lu, and W. Rao, “Bioinspired materials and technology for advanced cryopreservation,” *Trends in Biotechnology*, vol. 40, no. 1, pp. 93–106, 2022.
- [254] J. P. Wolanczyk, K. B. Storey, and J. G. Baust, “Ice nucleating activity in the blood of the freeze-tolerant frog, *rana sylvatica*,” *Cryobiology*, vol. 27, no. 3, pp. 328–335, 1990.

- [255] A. I. Zhmakin, *Fundamentals of cryobiology: physical phenomena and mathematical models*. Springer, 2009.
- [256] A. Sharma, J. S. Rao, Z. Han, L. Gangwar, B. Namsrai, Z. Gao, H. L. Ring, E. Magnuson, M. Etheridge, B. Wowk, *et al.*, “Vitrification and nanowarming of kidneys,” *Advanced Science*, vol. 8, no. 19, p. 2101691, 2021.
- [257] E. Alcalá, L. Encabo, F. Barroso, A. Puentes, I. Risco, and R. Risco, “Sound waves for solving the problem of recrystallization in cryopreservation,” *Scientific Reports*, vol. 13, no. 1, p. 7603, 2023.
- [258] M. J. Powell-Palm, Y. Zhang, J. Aruda, and B. Rubinsky, “Isochoric conditions enable high subfreezing temperature pancreatic islet preservation without osmotic cryoprotective agents,” *Cryobiology*, vol. 86, pp. 130–133, 2019.
- [259] G.-A. Beșchea, S.-I. Câmpean, M.-B. Tăbăcaru, B.-G. Vuțoiu, A. Șerban, and G. Năstase, “A state of the art review of isochoric cryopreservation and cryoprotectants,” *CryoLetters*, vol. 43, no. 4, pp. 189–199, 2022.
- [260] P. K. Solanki and Y. Rabin, “Is isochoric vitrification feasible?,” *Cryobiology*, vol. 111, pp. 9–15, 2023.
- [261] P. Mazur, “Freezing of living cells: mechanisms and implications,” *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 247, no. 3, pp. C125–C142, 1984.
- [262] M. A. Mensink, H. W. Frijlink, K. van der Voort Maarschalk, and W. L. Hinrichs, “How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions,” 2017.
- [263] J. Elster and E. E. Benson, “Life in the polar terrestrial environment with a focus on algae and cyanobacteria,” in *Life in the frozen state*, pp. 137–176, CRC Press, 2004.
- [264] N. A. Maximov, “Internal factors of frost and drought resistance in plants,” *Protoplasma*, vol. 7, no. 1, pp. 259–291, 1929.
- [265] E. A. Akerman, J. Lindberg, *et al.*, “Studien uber den kaltetod und die kalteresistenz der pflanzen nebst untersuchungen uber die winterfestigkeit des weizens,” 1927.
- [266] G. Tammann, “Ueber die Abhängigkeit der Zahl der Kerne, welche sich in verschiedenen unterkühlten Flüssigkeiten bilden, von der Temperatur,” *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, vol. 25U, no. 1, pp. 441–479, 1898.
- [267] E. L. H. Basile J. Luyet, “Revival of Frog’s Spermatozoa Vitrified in Liquid Air,” *Proc. Soc. Exp. Biol.*, vol. 39, pp. 433–434, 1938.
- [268] B. Luyet and D. Rasmussen, “Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability of rapidly cooled solutions of glycerol, ethylene glycol, sucrose and glucose,” *Biodynamica*, vol. 10, no. 210, pp. 167–191, 1968.
- [269] B. G. Crabo, “Physiological aspects of stallion semen cryopreservation,” *AAEP Proceedings*, vol. 47, no. April, pp. 291–295, 2001.
- [270] C. Polge, A. U. Smith, and A. S. Parkes, “Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures,” *Nature*, vol. 164, no. 4172, pp. 666–666, 1949.
- [271] E. Vayena, P. J. Rowe, P. D. Griffin, *et al.*, *Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a meeting on medical, ethical and social aspects of assisted reproduction, held at WHO Headquarters in Geneva, Switzerland*. World Health Organization, 2002.

- [272] G. D. Elliott, S. Wang, and B. J. Fuller, “Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures,” *Cryobiology*, vol. 76, pp. 74–91, 2017.
- [273] A. Karow, “Cryoprotectants—a new class of drugs,” *J Pharm Pharmacol*, vol. 21, no. 4, pp. 209–223, 1969.
- [274] B. P. Best, “Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions,” *Rejuvenation Research*, vol. 18, no. 5, pp. 422–436, 2015.
- [275] L. E. McGann, “Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents,” *Cryobiology*, vol. 15, no. 4, pp. 382–390, 1978.
- [276] B. M. Guerreiro, F. Freitas, J. C. Lima, J. C. Silva, M. Dionísio, and M. A. Reis, “Demonstration of the cryoprotective properties of the fucose-containing polysaccharide fucopol,” *Carbohydrate polymers*, vol. 245, p. 116500, 2020.
- [277] B. Wowk, “How cryoprotectants work,” *Cryonics*, vol. 3, p. 28, 2007.
- [278] S. Phatak, H. Natesan, J. Choi, K. G. Brockbank, and J. C. Bischof, “Measurement of Specific Heat and Crystallization in VS55, DP6, and M22 Cryoprotectant Systems with and Without Sucrose,” *Biopreservation and Biobanking*, vol. 16, no. 4, pp. 270–277, 2018.
- [279] M. S. Bhattacharya, “A review on cryoprotectant and its modern implication in cryonics,” *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, vol. 10, no. 3, 2016.
- [280] V. I. Castro, R. Craveiro, J. M. Silva, R. L. Reis, A. Paiva, and A. R. Ana, “Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents,” *Cryobiology*, vol. 83, no. April, pp. 15–26, 2018.
- [281] E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, “Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications,” *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 21, pp. 11060–11082, 2014.
- [282] A. R. Jesus, L. Meneses, A. R. C. Duarte, and A. Paiva, “Natural deep eutectic systems, an emerging class of cryoprotectant agents,” *Cryobiology*, vol. 101, pp. 95–104, 2021.
- [283] R. Raju, S. J. Bryant, B. L. Wilkinson, and G. Bryant, “The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability,” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1865, no. 1, p. 129749, 2021.
- [284] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, and A. R. C. Duarte, “Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century,” *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, vol. 2, no. 5, pp. 1063–1071, 2014.
- [285] W. F. Wolkers and H. Oldenhof, “Principles underlying cryopreservation and freeze-drying of cells and tissues,” *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, pp. 3–25, 2021.
- [286] D. Martinetti, C. Colarossi, S. Buccheri, G. Denti, L. Memeo, and L. Vicari, “Effect of trehalose on cryopreservation of pure peripheral blood stem cells,” *Biomedical reports*, vol. 6, no. 3, pp. 314–318, 2017.
- [287] S. Mantri, S. Kanungo, and P. C. Mohapatra, “Cryoprotective Effect of Disaccharides on Cord Blood Stem Cells with Minimal Use of DMSO,” *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, vol. 31, no. 2, pp. 206–212, 2015.

- [288] G. B. Quan, Q. H. Hong, Z. G. Lan, H. Y. Yang, and S. S. Wu, "Comparison of the effect of various disaccharides on frozen goat spermatozoa," *Biopreservation and Biobanking*, vol. 10, no. 5, pp. 439–445, 2012.
- [289] J. L. Chaytor, J. M. Tokarew, L. K. Wu, M. Leclre, R. Y. Tam, C. J. Capicciotti, L. Guolla, E. Von Moos, C. S. Findlay, D. S. Allan, and R. N. Ben, "Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation," *Glycobiology*, vol. 22, no. 1, pp. 123–133, 2012.
- [290] M. Amini and J. D. Benson, "Technologies for vitrification based cryopreservation," *Bioengineering*, vol. 10, no. 5, p. 508, 2023.
- [291] C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, and P. Migliardo, "Anomalous cryoprotective effectiveness of trehalose: Raman scattering evidences," *Journal of Chemical Physics*, vol. 111, no. 1, pp. 281–287, 1999.
- [292] L. M. Crowe, R. Mouradian, J. H. Crowe, S. A. Jackson, and C. Womersley, "Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 769, no. 1, pp. 141–150, 1984.
- [293] L. M. Crowe, "Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis," *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 131, no. 3, pp. 505–513, 2002.
- [294] W. Zhang, J. Rong, Q. Wang, and X. He, "The encapsulation and intracellular delivery of trehalose using a thermally responsive nanocapsule," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 27, 2009.
- [295] W. Rao, H. Huang, H. Wang, S. Zhao, J. Dumbleton, G. Zhao, and X. He, "Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant," *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 7, no. 8, pp. 5017–5028, 2015.
- [296] B. Dovgan, A. Barlič, M. Knežević, and D. Miklavčič, "Cryopreservation of Human Adipose-Derived Stem Cells in Combination with Trehalose and Reversible Electroporation," *Journal of Membrane Biology*, vol. 250, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [297] X. He, A. A. Amin, A. Fowler, and M. Toner, "Thermally induced introduction of trehalose into primary rat hepatocytes," *Cell Preservation Technology*, vol. 4, no. 3, pp. 178–187, 2006.
- [298] M. P. Stewart, R. Langer, and K. F. Jensen, "Intracellular delivery by membrane disruption: Mechanisms, strategies, and concepts," *Chemical Reviews*, vol. 118, no. 16, pp. 7409–7531, 2018.
- [299] B. Dovgan, D. Miklavčič, M. Knežević, J. Zupan, and A. Barlič, "Intracellular delivery of trehalose renders mesenchymal stromal cells viable and immunomodulatory competent after cryopreservation," *Cytotechnology*, vol. 73, no. 3, pp. 391–411, 2021.
- [300] S. Panyaboriban, J. Suwimonteerabut, N. Phutikanit, T. Swangchan-Uthai, T. Tharasanit, and M. Techakumphu, "Effect of various combinations of sugar supplementation in the extender on Frozen-Thawed ram semen quality and fertility," *Thai Journal of Veterinary Medicine*, vol. 45, no. 2, pp. 229–237, 2015.
- [301] I. Yáñez-Ortiz, J. Catalán, J. E. Rodríguez-Gil, J. Miró, and M. Yeste, "Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep," *Animal Reproduction Science*, vol. 246, p. 106904, 2022.

- [302] Y. A. Petrenko, D. Jones, and A. Y. Petrenko, "Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium," *Cryobiology*, vol. 57, no. 3, pp. 195–200, 2008.
- [303] V. Mutsenko, A. Barlič, T. Pezić, J. Dermol-Černe, B. Dovgan, B. Sydykov, W. F. Wolkers, I. I. Katkov, B. Glasmacher, D. Miklavčič, and O. Gryshkov, "Me2SO- and serum-free cryopreservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells using electroporation-assisted delivery of sugars," *Cryobiology*, vol. 91, no. August, pp. 104–114, 2019.
- [304] W. F. Wolkers and H. Oldenhof, *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Springer, 2015.
- [305] M. Tucker and J. Liebermann, *Vitrification in assisted reproduction*. CRC Press, 2015.
- [306] J. G. Day and M. McLellan, *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, Totowa, New Jersey 07512, 2007.
- [307] J. M. Crook and T. E. Ludwig, *Stem cell banking: concepts and protocols*. Springer, 2017.
- [308] J. Donnez and S. S. Kim, *Principles and practice of fertility preservation*. Cambridge university press, 2011.
- [309] J. Radin, *Life on ice: a history of new uses for cold blood*. University of Chicago Press, 2019.
- [310] T. M. Allen and P. R. Cullis, "Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 65, no. 1, pp. 36–48, 2013.
- [311] L. Cui, M. R. Hunter, S. Sonzini, S. Pereira, S. M. Romanelli, K. Liu, W. Li, L. Liang, B. Yang, N. Mahmoudi, *et al.*, "Mechanistic studies of an automated lipid nanoparticle reveal critical pharmaceutical properties associated with enhanced mrna functional delivery in vitro and in vivo," *Small*, vol. 18, no. 9, p. 2105832, 2022.
- [312] R. H Muller, R. Shegokar, and C. M Keck, "20 years of lipid nanoparticles (sln & nlc): present state of development & industrial applications," *Current drug discovery technologies*, vol. 8, no. 3, pp. 207–227, 2011.
- [313] R. W. Malone, P. L. Felgner, and I. M. Verma, "Cationic liposome-mediated rna transfection," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 86, no. 16, pp. 6077–6081, 1989.
- [314] P. R. Cullis and M. J. Hope, "Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies," *Molecular Therapy*, vol. 25, no. 7, pp. 1467–1475, 2017.
- [315] A. Algarni, E. H. Pilkington, E. J. Suys, H. Al-Wassiti, C. W. Pouton, and N. P. Truong, "In vivo delivery of plasmid dna by lipid nanoparticles: the influence of ionizable cationic lipids on organ-selective gene expression," *Biomaterials Science*, vol. 10, no. 11, pp. 2940–2952, 2022.
- [316] S. Yonezawa, H. Koide, and T. Asai, "Recent advances in sirna delivery mediated by lipid-based nanoparticles," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 154, pp. 64–78, 2020.
- [317] X. Huang, N. Kong, X. Zhang, Y. Cao, R. Langer, and W. Tao, "The landscape of mrna nanomedicine," *Nature Medicine*, vol. 28, no. 11, pp. 2273–2287, 2022.
- [318] M. Mehta, T. A. Bui, X. Yang, Y. Aksoy, E. M. Goldys, and W. Deng, "Lipid-based nanoparticles for drug/gene delivery: An overview of the production techniques and difficulties encountered in their industrial development," *ACS Materials Au*, 2023.

- [319] R. Tenchov, R. Bird, A. E. Curtze, and Q. Zhou, “Lipid nanoparticles from liposomes to mrna vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement,” *ACS nano*, vol. 15, no. 11, pp. 16982–17015, 2021.
- [320] B. Kim, R. R. Hosn, T. Remba, D. Yun, N. Li, W. Abraham, M. B. Melo, M. Cortes, B. Li, Y. Zhang, *et al.*, “Optimization of storage conditions for lipid nanoparticle-formulated self-replicating rna vaccines,” *Journal of Controlled Release*, vol. 353, pp. 241–253, 2023.
- [321] T. Wang, T.-C. Sung, T. Yu, H.-Y. Lin, Y.-H. Chen, Z.-W. Zhu, J. Gong, J. Pan, and A. Higuchi, “Next-generation materials for rna–lipid nanoparticles: lyophilization and targeted transfection,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 11, no. 23, pp. 5083–5093, 2023.
- [322] F. Susa, G. Bucca, T. Limongi, V. Cauda, and R. Pisano, “Enhancing the preservation of liposomes: The role of cryoprotectants, lipid formulations and freezing approaches,” *Cryobiology*, vol. 98, pp. 46–56, 2021.
- [323] P. H. Rafael Paz, “Nobel de Medicina 2023 a creadores de las vacunas de ARNm.” <https://www.gaceta.unam.mx/del-rechazo-al-nobel-la-odisea-del-arn-mensajero/>. Accessed: 2023-10-05.
- [324] K. W. Yong, L. Laouar, J. A. Elliott, and N. M. Jomha, “Review of non-permeating cryoprotectants as supplements for vitrification of mammalian tissues,” *Cryobiology*, vol. 96, pp. 1–11, 2020.
- [325] I. Prigogine and R. Defay, *Chemical thermodynamics*. Longmans Green, 1954.
- [326] R. Hentschke, *Thermodynamics: For Physicists, Chemists and Materials Scientists*. Springer, 2022.
- [327] J. W. Schmelzer and A. S. Abyzov, “How do crystals nucleate and grow: Ostwald’s rule of stages and beyond,” *Thermal Physics and Thermal Analysis: From Macro to Micro, Highlighting Thermodynamics, Kinetics and Nanomaterials*, pp. 195–211, 2017.
- [328] W. Ostwald, “Studien über die bildung und umwandlung fester körper: 1. abhandlung: Übersättigung und überkaltung,” *Zeitschrift für physikalische Chemie*, vol. 22, no. 1, pp. 289–330, 1897.

