



UNIVERSIDAD DE SONORA

Caracterización de soluciones de almidón y la acción
de α -amilasa con dispersión de luz

TESIS

Que para obtener el grado de
Licenciado en Física

Presenta:

Ricardo Alberto Armenta Calderón

División de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2006

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

En memoria de
Ramón Andrés Molina Zepeda

Agradecimientos

El primer nombre que se me vino a la cabeza al pensar en agradecer a alguien es el de Heriberto Acuña Campa. Él me ha mostrado la luz, no sólo en física, sino también en muchos otros aspectos de la vida.

A mis padres, por el simple hecho de ser mis padres, nada puede compararse con eso. Y no puedo hablar de mi familia sin pensar en mi hermana, quien ha sido papel importante en mi formación como ser humano y estudiante.

Quiero expresar mi gratitud a Angelina Uribe, Antonio Jáuregui, Laura Yeomans, María Elena Tejeda, Carlos Calcáneo, Adalberto Corella, Rodrigo Rosas, Sergio Gutiérrez y Arnulfo Castellanos, pues aunque la responsabilidad recae principalmente en mi, debo a ellos gran parte de mi formación de licenciado.

No puedo dejar de incluir aquí a mis compañeros de generación: Patricio Ramírez, John Fox, Darío Cuevas, Alfredo Manríquez y Gerardo Galaz, pues siempre me brindaron su apoyo en lo académico y en lo personal. Sin ellos la carrera hubiera sido otra.

Finalmente, quiero dar las gracias al Departamento de Física, pues el apoyo que da al estudiantado es excepcional y no puede encontrarse algún ambiente parecido en toda la Universidad.

Índice General

| | | |
|---------------------|--|----|
| Capítulo I | Introducción..... | 2 |
| Capítulo II | Elementos básicos..... | 5 |
| 2.1 | Dispersión de luz | 5 |
| 2.2 | Transmisión de luz..... | 19 |
| 2.3 | Sistema fisicoquímico..... | 21 |
| 2.4 | Análisis de imágenes..... | 23 |
| Capítulo III | Arreglos experimentales..... | 24 |
| 3.1 | Preparación del sistema..... | 24 |
| 3.2 | Arreglo de transmisión de luz..... | 27 |
| 3.3 | Arreglo DLS..... | 30 |
| 3.4 | Arreglo de SALS..... | 36 |
| Capítulo IV | Resultados experimentales..... | 41 |
| 4.1 | Resultados de transmisión de luz..... | 41 |
| 4.2 | Resultados de DLS..... | 46 |
| 4.3 | Resultados de SALS..... | 52 |
| Capítulo V | Conclusiones y perspectivas..... | 57 |
| Apéndice A | Protocolos de limpieza..... | 59 |
| Apéndice B | Desarrollo en serie de Taylor del factor de forma $P(k)$ | 61 |
| Referencias | | 64 |

I.- Introducción

En este trabajo se reporta un conjunto de resultados de experimentos para hacer una caracterización de almidón de maíz, así como los cambios que sufre al actuar sobre él la enzima α -amilasa. Este sistema fue seleccionado ya que se tenía un estudio previo [1] realizado por M.C Ericka Rodríguez como parte del manual de practicas docentes para el laboratorio de Biofísica utilizando el equipo de dispersión de luz.

En la literatura se han reportado estudios de soluciones de almidón, así como las constituyentes por separado, utilizando diversas técnicas experimentales como dispersión estática de luz (SLS) [2],[3] dispersión dinámica de luz (DLS) [4], y cromatografía de exclusión de tamaños con detección de concentración y dispersión de luz láser en multiángulo (HPSEC-MALLS) [5, 6]. Otros estudios involucran el uso de solventes diferentes del agua, como el Dimetil Sulfóxido, para los cuales se asegura una mejor solubilidad y estabilidad[4].

A grandes rasgos, se sabe que el almidón es un polisacárido compuesto de dos moléculas principalmente, amilasa y amilopectina [7, 8]. A nivel molecular se conoce el efecto de la acción de la enzima α -amilasa que se refleja en un cambio en la distribución de tamaños de la molécula en solución.

(*)La importancia fisiológica del almidón proviene del hecho de que es parte importante de muchos de los alimentos que nos proporcionan energía. En el proceso de ingesta de este polisacárido se liberan unidades de glucosa por medio de procesos enzimáticos para proveer al organismo de energía [9],[1]. Otro dato de relevancia, es que entre el 70% y el 80% de las calorías consumidas por el ser humano es provisto por el almidón [10].

Se utiliza en la industria de los alimentos no sólo en la elaboración de pan, sino que tiene otros usos como adhesivo, ligante, enturbiantes, formador de películas, estabilizante de espumas, agente anti-envejecimiento de pan, gelificante, glaseante, humectante, estabilizante, texturizante y espesante.

El objetivo principal de este trabajo de tesis es el de determinar mediante técnicas de dispersión de luz la distribución de tamaños de las moléculas de

almidón de maíz en suspensión (utilizando como solvente agua), y cómo ésta se ve afectada al agregar a la suspensión la enzima α -amilasa, que hidroliza al almidón.

Un segundo objetivo es el de implementar como técnica de estudio, en conjunto con DLS y SLS, la de dispersión de luz a ángulos pequeños SALS (Small Angle Light Scattering), y en un primer acercamiento contrastar los resultados obtenidos con estas dos técnicas.

Una serie de condiciones debe ser impuesta en el sistema para asegurar confiabilidad en el uso de las técnicas mencionadas, de forma particular, la de homogeneidad del sistema. Para hacer un estudio sistemático del fenómeno de sedimentación, el cual debe ser despreciable en el intervalo de tiempo en el que se realizan las mediciones de dispersión, se realizó un tercer experimento (los primeros fueron DLS y SALS), que es el de Transmisión de Luz y que es complementario a los otros dos.

En el segundo capítulo se enuncian los elementos básicos de teoría en los que están basadas las técnicas experimentales usadas en el trabajo. Se abordan la dispersión dinámica de luz (DLS), dispersión estática de luz (SLS) y la Ley de Beer, para la parte de Transmisión. Se describe brevemente en esta sección una serie de generalidades del sistema en estudio.

En el tercer capítulo se abordan los detalles del desarrollo experimental: preparación del sistema, equipo utilizado, el arreglo experimental y la parte operativa en la realización del experimento.

En el cuarto capítulo se presentan los datos obtenidos con los experimentos, los resultados del análisis de los datos, así como las interpretaciones de los mismos.

En el capítulo de conclusiones y perspectivas se resumen las conclusiones del trabajo, se hace una evaluación de los objetivos planteados al inicio del trabajo y algunas perspectivas para el trabajo futuro.

Finalmente, debe señalarse que sin la disposición mostrada por los responsables de los Laboratorios de Óptica (Jorge Sandoval), Biofísica (Amir Maldonado), Fluidos Complejos (Miguel Valdez), Laboratorio de Espectroscopia

(Mario Enrique Álvarez), así como del Taller de Máquinas y Herramientas (Claudio Delgadillo), ninguno de los experimentos hubiese podido llevarse a cabo, no solo por la disposición de la infraestructura del laboratorio y equipo, sino también por su constante ayuda y orientación en el uso de éstos.

Dado que el presente trabajo es experimental, es necesario establecer que en el proceso de medición de propiedades de sistemas, suelen surgir aspectos complejos o que no tienen una solución trivial. Es por ello que surge la necesidad de realizar estudios experimentales sencillos que permitan esclarecer estos aspectos y darle validez o confiabilidad a la solución al problema originalmente planteado.

II.- Elementos Básicos

2.1 Dispersión de luz

2.1.1 Introducción

La dispersión de luz es un fenómeno de interacción entre luz y materia. A escala microscópica, es cuando fotones inciden en una partícula, ésta absorbe energía y después emite parte de la energía. En el caso particular en que la energía emitida es la misma que incide, se dice que la dispersión es cuasi-elástica.

Dos marcos teóricos describen el proceso, la Teoría de Rayleigh-Gans-Debye para partículas pequeñas (los tamaños son del orden de $1/20$ de la longitud de onda de la luz incidente) y dieléctricas; y la Teoría de Mie, aplicable a partículas de tamaño mayor que la longitud de onda de la luz incidente y que pueden ser o no absorbentes.

El presente trabajo se fundamenta en la Teoría de Rayleigh Gans Debye [11-15], cuyos elementos básicos se abordan a continuación.

Considérese el caso en que una onda electromagnética plana $E_0(\vec{r}, t)$ de vector de onda \vec{k}_0 y frecuencia angular ω incide en un conjunto de partículas dispersoras puntuales en un punto \vec{r} al tiempo t , ver figura 2a. Se representa la onda con

$$E(\vec{r}, t) = E_0 e^{i(\vec{k}_0 \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (1)$$

donde E_0 es la amplitud del campo incidente.

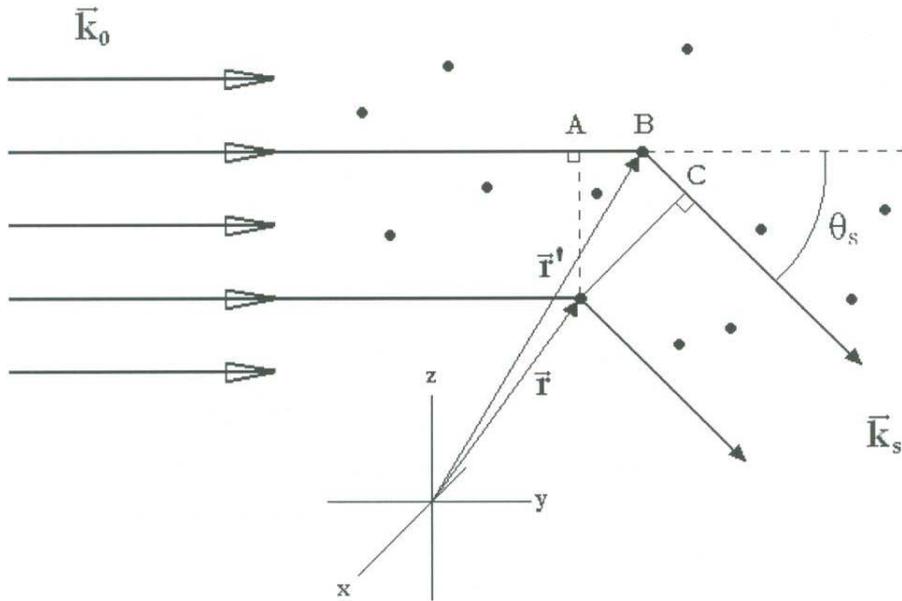


Figura 2a . Esquema de dispersión de luz por un conjunto de partículas puntuales.

La diferencia de fases $\Delta\Phi$ entre los campos eléctricos dispersados por dos puntos localizados en \vec{r} y en \vec{r}' es $2\pi\Delta/\lambda$, donde Δ es la diferencia en la distancia recorrida por los dos fotones: $\Delta = AB + BC$ (ver figura 2a). Ahora, $AB = (\vec{r}' - \vec{r}) \cdot \frac{\vec{k}_0}{|\vec{k}_0|}$

y $BC = (\vec{r} - \vec{r}') \cdot \frac{\vec{k}_s}{|\vec{k}_s|}$, luego entonces

$$\Delta\Phi = (\vec{r}' - \vec{r}) \cdot (\vec{k}_0 - \vec{k}_s) \quad (2)$$

Se asocia una fase de $\vec{r} \cdot (\vec{k}_0 - \vec{k}_s)$ a cada elemento de volumen que se encuentre en la posición \vec{r} . El campo dispersado total \vec{E}_s es la suma de $e^{i\vec{r} \cdot (\vec{k}_0 - \vec{k}_s)}$ sobre todos los elementos de volumen, pesados por la fuerza dispersora de los elementos de volumen, la cual es proporcional a la fracción del campo incidente que es dispersada. Se denota la fuerza dispersora por unidad de volumen en \vec{r} por $f(\vec{r})$.

Se supone que las diferencias de fase dado que el campo incidente atraviesa el solvente son despreciables, así como también se considera que el campo incidente no es atenuado por dispersión o por absorción. Se supone además que la dirección del campo incidente es la misma en todo el volumen dispersor, también se desprecia la dispersión múltiple, esto es, cada fotón es dispersado sólo una vez al atravesar el sistema. Estas hipótesis son válidas cuando sólo una pequeña fracción de la luz incidente es dispersada. Con estas consideraciones, el campo total dispersado \vec{E}_s se expresa como

$$\vec{E}_s = \sum_{j=1}^N \int_{V_j} d\vec{r} f(\vec{r}) e^{i(\vec{k}_0 - \vec{k}_s) \cdot \vec{r}} \vec{E}_0 \quad (3)$$

El intervalo de integración V_j es el volumen ocupado por la j -ésima partícula coloidal. La sumatoria es sobre las N partículas coloidales en el volumen dispersor. Si se denota con \vec{r}_j la posición de la j -ésima partícula y se hace el cambio de variable $\vec{r}' = \vec{r} - \vec{r}_j$, para partículas esféricas con centro en el origen y cuyo volumen es V_j^0 , la expresión anterior queda

$$\vec{E}_s = \sum_{j=1}^N e^{i(\vec{k}_0 - \vec{k}_s) \cdot \vec{r}_j} \int_{V_j^0} d\vec{r}' f(\vec{r}') e^{i(\vec{k}_0 - \vec{k}_s) \cdot \vec{r}'} \vec{E}_0 \quad (4)$$

Las exponenciales en \vec{r}_j describen la interferencia del campo dispersado debido a la presencia de diferentes partículas coloidales, mientras que la integral describe la interferencia dado que hay diferentes elementos de volumen en cada partícula.

Por otro lado, si se sigue una obtención formal de una expresión para el campo dispersado, con las Ecuaciones de Maxwell para campos electromagnéticos como punto de partida, se tiene para el campo eléctrico dispersado

$$E_s(\vec{r}, \vec{k}_0 - \vec{k}_s) = \frac{k_0^2}{4\pi r} e^{ik_0 r} T(\vec{k}_s) \cdot \sum_{j=1}^N B_j(\vec{k}_0 - \vec{k}_s) e^{i(\vec{k}_0 - \vec{k}_s) \cdot \vec{r}_j} \cdot E_0 \quad (5)$$

donde

$$T(\vec{k}_s) = \hat{I} - \hat{k}_s \hat{k}_s$$

con $\hat{k}_s \equiv \frac{\vec{k}_s}{|\vec{k}_s|}$ el vector unitario en la dirección de \vec{k}_s . B_j se define como

$$B_j(\vec{k}_0 - \vec{k}_s) \equiv \int_{V_j^0} d\vec{r}' \frac{\varepsilon(\vec{r}') - \hat{I}\varepsilon_f}{\varepsilon_f} e^{i(\vec{k}_0 - \vec{k}_s) \cdot \vec{r}'} \quad (6)$$

Se refiere a la matriz B_j como *amplitud de dispersión de la j-ésima partícula coloidal*, donde $\varepsilon(\vec{r}')$ es la constante dieléctrica en el punto \vec{r}' , mientras que ε_f es la constante dieléctrica del solvente.

Existe una dependencia explícita de la magnitud del campo dispersado en la posición del detector \vec{r} y la diferencia en los vectores de onda incidente y dispersado $\vec{k}_0 - \vec{k}_s$, que se denota en la expresión para E_s .

Al comparar las expresiones para E_s que se obtienen de forma heurística y formal, se concluye que $f(\vec{r})$ es

$$f(\vec{r}) = \frac{\varepsilon(\vec{r}') - \hat{I}\varepsilon_f}{\varepsilon_f} \quad (7)$$

En la expresión (5) se calcula el campo eléctrico dispersado para una configuración de partículas fija. En realidad, dichas partículas exhiben movimiento browniano, ya sea traslacional o rotacional. Sin embargo, este movimiento sucede en tales escalas de tiempo que muchos fotones son dispersados en un intervalo

de tiempo en que la configuración espacial de las partículas no cambia de manera que afecte significativamente las fases de los campos dispersados. La intensidad instantánea en la escala de tiempo difusiva es entonces una intensidad promediada sobre muchos intervalos de tiempo $2\pi/\omega$ (ω es la frecuencia angular de la luz) y está dada por

$$i(t) = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_f}{\mu_0}} (\vec{E}_s(t) \cdot \hat{n}_s) (\vec{E}_s^*(t) \cdot \hat{n}_s) \equiv \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_f}{\mu_0}} |\vec{E}_s(t) \cdot \hat{n}_s|^2 \quad (8)$$

donde el asterisco denota conjugación compleja y el vector unitario \hat{n}_s es la dirección de polarización de la luz detectada. Como se mencionó, las partículas presentan movimiento browniano y es por ello que la intensidad i fluctúa alrededor de un valor promedio I (Figura 2b).

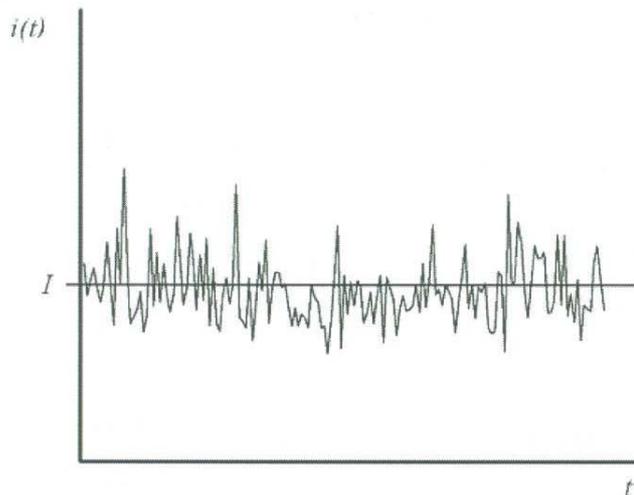


Figura 2b. Fluctuaciones de la señal de intensidad medida.

Para partículas esféricas, para las cuales la amplitud del campo dispersado no depende de la orientación, la intensidad dispersada instantánea es proporcional
a

$$i(\vec{k}, t) \propto \sum_{i,j=1}^N e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_i(t) - \vec{r}_j(t))} = |\rho(\vec{k}, t)|^2 \quad (9)$$

donde $\vec{k} = \vec{k}_0 - \vec{k}_s$. $\rho(\vec{k}, t)$ es la transformada de Fourier de la densidad microscópica $\rho(\vec{r}, t)$, la cual está dada por

$$\rho(\vec{r}, t) = \sum_{j=1}^N \delta(\vec{r} - \vec{r}_j(t)) \quad (10)$$

Es posible estudiar con dispersión de luz, para partículas esféricas, la estadística de las fluctuaciones de la densidad. Estas fluctuaciones determinan las propiedades de transporte y equilibrio del sistema. La componente de Fourier sondeada en un experimento de dispersión de luz depende directamente de la longitud de onda λ y el ángulo de dispersión θ , pues

$$k = |\vec{k}_o - \vec{k}_s| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (11)$$

Los experimentos de dispersión de luz se separan en dos tipos: dispersión estática de luz (SLS) y dispersión dinámica de luz (DLS). En el primero de ellos se mide la intensidad promedio I en el ensemble, mientras que en el segundo se mide la dependencia en el tiempo de la intensidad fluctuante. En SLS se determinan propiedades de las fluctuaciones de la densidad, promediadas en el ensemble. En DLS se estudia la dinámica de las fluctuaciones en la densidad. Los elementos de teoría aquí descritos corresponden al caso de estudio de partículas esféricas.

2.1.2 Dispersión estática de luz (SLS)

La intensidad promedio $I(\vec{k}) = \langle i(\vec{k}, t) \rangle$ se mide como una función del ángulo de dispersión, que a una longitud de onda específica, fija la magnitud del vector de onda $\vec{k} = \vec{k}_0 - \vec{k}_s$. El promedio sobre el tiempo denotado por los corchetes angulares se obtiene al medir la intensidad en un intervalo de tiempo mayor que el tiempo requerido para las que partículas brownianas hayan estado en todas sus configuraciones posibles.

Se define la Razón de Rayleigh como

$$R = I r^2 / I_0 V_s \quad (12)$$

que no depende de las constantes del aparato sino de las propiedades del sistema en estudio, las cuales influyen directamente en el valor de I .

I_0 es la intensidad incidente, V_s es el volumen de dispersión y r es la distancia de V_s al detector.

La dependencia de R en k se explicita en

$$R(k) = \frac{k_0^4}{(4\pi)^2} \bar{\rho} (\hat{n}_s \cdot \hat{n}_0)^2 V_p^2 \left| \frac{\bar{\epsilon}_p - \epsilon_f}{\epsilon_f} \right|^2 P(k) \left[1 + \bar{\rho} \int_{V_s} d\vec{r} g(r) e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} \right] \quad (13)$$

Donde $V_p = \frac{4}{3} \pi a^3$ es el volumen de la partícula esférica de radio a , $\bar{\rho} = N/V_s$ es el número de partículas por unidad de volumen. $\bar{\epsilon}_p$ es la constante dieléctrica promedio de las partículas, dada por

$$\bar{\epsilon}_p = \frac{1}{V_p} \int d\vec{r} \epsilon(\vec{r}) = \frac{4\pi}{V_p} \int_0^a r^2 \epsilon(r) dr \quad (14)$$

Además, se ha definido el factor de forma $P(k)$ como

$$P(k) = \left[\frac{\int_0^a r^2 \frac{\varepsilon(r) - \varepsilon_f}{\varepsilon_f} \frac{\sin(kr)}{kr} dr}{\int_0^a r^2 \frac{\varepsilon(r) - \varepsilon_f}{\varepsilon_f} dr} \right]^2 \quad (15)$$

La función $g(r)$ es la llamada función de correlación de pares (función de distribución radial), que para el caso de fluidos isotrópicos, homogéneos y en equilibrio depende sólo de $r = |\vec{r}_1 - \vec{r}_2|$, y que puede ser desarrollada en serie de potencias de $\bar{\rho}$ como

$$g(r) = g_0(r) + \bar{\rho}g_1(r) + \bar{\rho}^2 g_2(r) + \dots \quad (16)$$

El término $g_0(r)$ describe interacciones entre dos partículas sin considerar los efectos de las demás que componen el ensemble. Las interacciones de mayor orden se consideran en los otros términos.

La ecuación (13) puede ser rescrita como (con $k \neq 0$)

$$R(k) = \frac{k_0^4}{(4\pi)^2} \bar{\rho} (\hat{n}_s \cdot \hat{n}_0)^2 V_p^2 \left| \frac{\bar{\varepsilon}_p - \varepsilon_f}{\varepsilon_f} \right|^2 P(k) S(k) \quad (17)$$

donde el factor de estructura $S(k)$ se define

$$\begin{aligned} S(k) &\equiv \frac{1}{N} \sum_{i,j=1}^N \langle e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j)} \rangle \\ &= 1 + \bar{\rho} \int d\vec{r} [g(r) - 1] e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} \\ &= 1 + 4\pi\bar{\rho} \int_0^\infty r^2 [g(r) - 1] \frac{\sin(kr)}{kr} dr \end{aligned} \quad (18)$$

El factor de forma $P(k)$ en $R(k)$ describe la interferencia de campos eléctricos dispersados de diferentes elementos de volumen dentro de una misma partícula, mientras que el factor de estructura $S(k)$ proporciona información acerca de la interferencia de campos de diferentes partículas brownianas. Es precisamente el factor de estructura la cantidad que permite obtener propiedades termodinámicas del sistema coloidal, pues es la transformada de Fourier de $g(r) - 1$. Para partículas ópticamente homogéneas, es decir, para las cuales $\varepsilon(r) = \text{const.}$, se tiene para el factor de forma

$$P(k) = \left[3 \frac{ka \cos(ka) - \sin(ka)}{(ka)^3} \right]^2 \quad (19)$$

El factor

$$C = \left| \frac{\bar{\varepsilon}_p - \varepsilon_f}{\varepsilon_f} \right|^2 \quad (20)$$

es el llamado *contraste óptico* del sistema de partículas brownianas. Se determina experimentalmente esta cantidad de acuerdo a la expresión

$$C = \left(\frac{2n}{n_f} \frac{dn}{d\Phi} \right)^2 \approx \frac{4}{n_f^2} \left(\frac{dn}{d\Phi} \right)^2 \quad (21)$$

donde $\Phi = \frac{4}{3} \pi a^3 \bar{\rho}$ es la fracción de volumen de partículas brownianas, que es proporcional a la concentración. n es el índice de refracción de la mezcla solvente+partículas y n_f es el índice de refracción del solvente. Las expresiones anteriores para C son válidas siempre y cuando la diferencia entre n y n_f sea pequeña.

2.1.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

En un experimento de DLS se mide la dependencia en el tiempo de una intensidad que fluctúa. Se define entonces, la función de autocorrelación de intensidades

$$g_I(\vec{k}, t) \equiv \langle i(\vec{k}, t_0) i(\vec{k}, t + t_0) \rangle \quad (22)$$

Para un sistema en equilibrio, $g_I(\vec{k}, t)$ es independiente de t_0 , por lo que se toma $t_0 = 0$. En términos del campo eléctrico dispersado \vec{E}_s , la función de autocorrelación es

$$g_I(\vec{k}, t) = \frac{1}{4} \frac{\epsilon_f}{\mu_0} \langle (\vec{E}_s(0) \cdot \hat{n}_s) (\vec{E}_s^*(0) \cdot \hat{n}_s) (\vec{E}_s(t) \cdot \hat{n}_s) (\vec{E}_s^*(t) \cdot \hat{n}_s) \rangle \quad (23)$$

Definiendo la función de autocorrelación de campos g_E

$$g_E(\vec{k}, t) \equiv \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_f}{\mu_0}} \langle (\vec{E}_s(0) \cdot \hat{n}_s) (\vec{E}_s^*(t) \cdot \hat{n}_s) \rangle \quad (24)$$

$g_I(\vec{k}, t)$ puede escribirse como (relación de Siegert)

$$g_I(\vec{k}, t) = I^2 + |g_E(\vec{k}, t)|^2 \quad (25)$$

Las funciones de autocorrelación normalizadas con la intensidad promedio son

$$\begin{aligned} \hat{g}_I(\vec{k}, t) &\equiv g_I(\vec{k}, t) / I^2 \\ \hat{g}_E(\vec{k}, t) &\equiv g_E(\vec{k}, t) / I \end{aligned} \quad (26)$$

La relación de Siegert se puede escribir entonces como

$$\hat{g}_I(\vec{k}, t) = 1 + \left| \hat{g}_E(\vec{k}, t) \right|^2 \quad (27)$$

La función de autocorrelación de campos se relaciona con el factor de estructura $S(k)$ como

$$\hat{g}_E(\vec{k}, t) = \frac{1}{S(k)} \frac{1}{N} \sum_{i,j=1}^N \left\langle e^{i\vec{k} \cdot (r_i(0) - r_j(t))} \right\rangle \quad (28)$$

2.1.4 Dispersión de luz por suspensiones diluidas de partículas esféricas

(i) SLS

La razón de Rayleigh en el límite diluido $\bar{\rho} \rightarrow 0$ es

$$R(k) = \frac{k_0^4}{(4\pi)^2} \bar{\rho} V_p^2 \left| \frac{\bar{\epsilon}_p - \epsilon_f}{\epsilon_f} \right|^2 P(k) \quad (29)$$

El factor de forma se desarrolla en serie de Taylor alrededor de kr (ver Apéndice B) y queda

$$P(k) = \left[1 - \frac{1}{3} k^2 R_g^2 + O((ka)^4) \right] \approx e^{-\frac{1}{3} k^2 R_g^2} \quad (30)$$

donde se define el radio de giro R_g como

$$R_g \equiv \left[\frac{\int_0^a r^4 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr}{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr} \right]^{1/2} \quad (31)$$

Para partículas esféricas homogéneas, el radio de la partícula se relaciona con el radio de giro como

$$a = \sqrt{\frac{5}{3}} R_g \quad (32)$$

(ii) DLS

En el caso que se estudia, las interacciones entre las partículas brownianas son despreciadas. El factor de estructura para partículas no interactuantes es igual a 1, por lo que escribimos la siguiente relación.

$$\hat{g}_E(k, t) = \frac{1}{N} \sum_{i,j=1}^N \langle e^{i\vec{k} \cdot (r_i(0) - r_j(t))} \rangle = e^{-D_0 k^2 t} \quad (33)$$

Para escribir la segunda igualdad, se ha usado una transformación de Fourier de una función de densidad de probabilidad gaussiana. El coeficiente de difusión D_0 se relaciona de una manera sencilla con el radio a de una partícula browniana usando la relación de Stokes-Einstein

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 a} \quad (34)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y η_0 la viscosidad del fluido. Se llama radio hidrodinámico a aquél determinado de esta forma. La técnica de dispersión de luz, para el caso cuasielástico, permite determinar tamaños de

partículas entre 50 y 3000 nm, aproximadamente. Sin embargo, el límite inferior no siempre se logra alcanzar por las propiedades ópticas del sistema y la forma en que decae la eficiencia con que las partículas dispersan la luz. El límite superior del rango de tamaños depende de la longitud de onda de la luz incidente.

Los experimentos realizados se basan en las siguientes dos expresiones [16, 17] para el coeficiente de difusión aparente y la Razón de Rayleigh, respectivamente

$$D_{app} = D_z(1 + k_D c + \dots)(1 + C \langle S^2 \rangle q^2 + \dots) \quad (35)$$

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M_w P_z(q)} + 2A_2 c + \dots \quad (36)$$

En (35), k_D es el coeficiente del virial de difusión, análogo al coeficiente del virial A_2 ; q es el vector de onda dispersado y $C \langle S^2 \rangle$ es una constante dependiente de la estructura que depende de la polidispersidad y el modo interno de movimiento más lento de la partícula dispersora

En (36) c es la concentración de la solución, R la razón de Rayleigh, M_w el peso molecular y $P_z(q)$ es el factor de forma de las partículas que componen al fluido. El término K tiene la siguiente forma

$$K = \frac{4\pi^2 \left(\frac{dn}{dc} n_{solvente} \right)^2}{N_A \lambda^4} \left(\frac{n_{\text{standard}}}{n_{solvente}} \right)^2 \quad (37)$$

donde n es el índice de refracción, λ es la longitud de onda del láser, θ es el ángulo de dispersión, N_A es el número de Avogadro y dn/dc es el cambio en el índice de refracción al variar la concentración.

Más detalle acerca de las cantidades medidas e información obtenida se especifica en la sección de Arreglos Experimentales.

Para obtener resultados confiables de los experimentos de dispersión de luz realizados con el equipo ALV, así como en el arreglo de SALS, es necesario asegurar la condición de homogeneidad y estabilidad de la muestra en estudio. En sistemas complejos no es extraño que estas condiciones sean difíciles de establecer. Un indicio de que no hay estabilidad es el fenómeno de sedimentación, cuyos efectos pueden observarse a simple vista después de un intervalo de tiempo del orden de una hora. Para caracterizar con mayor precisión los tiempos en los cuales es posible hablar de que se tiene un sistema estable y homogéneo, se realizaron experimentos de transmisión de luz a través del fluido, con un arreglo experimental que permite caracterizar gradientes de concentración, así como los cambios de la misma en el tiempo. Se presentan a continuación los elementos básicos del marco teórico en que se basa este experimento.

2.1 Transmisión de luz

En un experimento de transmisión de luz se estudia cómo cambia intensidad de la luz al viajar una distancia conocida a través de un fluido. El sistema en cuestión es una solución de almidón de maíz con agua como solvente y la propiedad medida es la intensidad de la luz transmitida. Conociendo la intensidad de la luz que incide en el fluido, se define la transmitancia T como

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (38)$$

donde I es la intensidad de la luz transmitida después de pasar a través de la muestra de fluido, e I_0 es la intensidad de la luz incidente en la muestra [18].

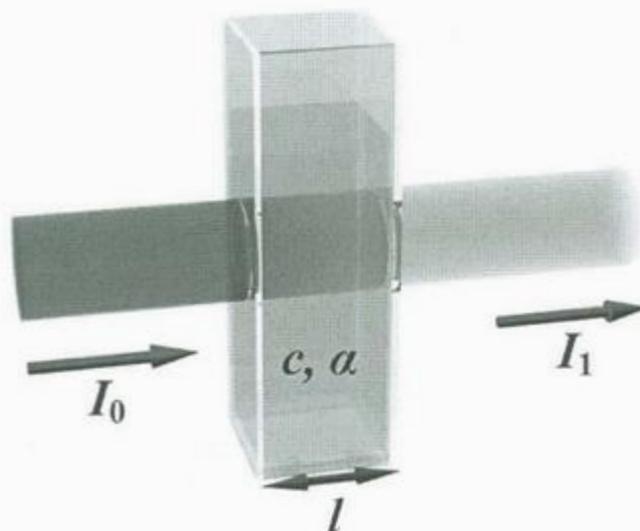


Figura 2c. Transmisión de luz a través de un fluido.

Se encontró empíricamente (La ley de Beer fue descubierta independientemente y de distintas maneras por Pierre Bouguer en 1729, Johann Heinrich Lambert en 1760 y August Beer en 1852) que la absorbencia A , la longitud del camino que atraviesa la luz dentro del fluido b y la concentración de la muestra c , están relacionados de acuerdo a la expresión

$$A = \alpha bc \quad (39)$$

donde α es el coeficiente de absorción y depende de la longitud de onda de la luz incidente como

$$\alpha = 4\pi \frac{\kappa}{\lambda} \quad (40)$$

con κ el coeficiente de extinción.

La relación entre absorbencia y transmitancia se expresa como

$$A = -\ln(T) = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (41)$$

o bien

$$I = I_0 e^{-\alpha bc}$$

De tal forma que al medir la intensidad de la luz transmitida y conocer el valor de I_0 es posible obtener información de los parámetros en la exponencial. Como se mencionó en la sección anterior, el comportamiento de c en el tiempo es el objeto clave de estudio del experimento realizado.

La geometría del arreglo es tal que la luz incidente es perpendicular a la interfase aire-muestra, por ello se utilizó una celda de placas paralelas. La luz utilizada es blanca y como detector se utilizó una videocámara 8mm. El manejo de los datos se hizo con el software de imágenes Image J.

Los detalles del arreglo experimental se abordan en la sección de Arreglos Experimentales, en la parte referente a Transmisión de Luz. Las particularidades del manejo de los datos se especifican en la sección de Resultados.

2.3 Sistema fisicoquímico

El almidón está compuesto por dos polímeros, amilosa y amilopectina. La amilopectina es una cadena de unidades de glucosa, unidas por enlaces α -1,4 lineal y α -1,6 ramificado. La amilosa es una cadena lineal con enlaces α -1,4, de aproximadamente $\frac{1}{4}$ de la longitud de la amilopectina.

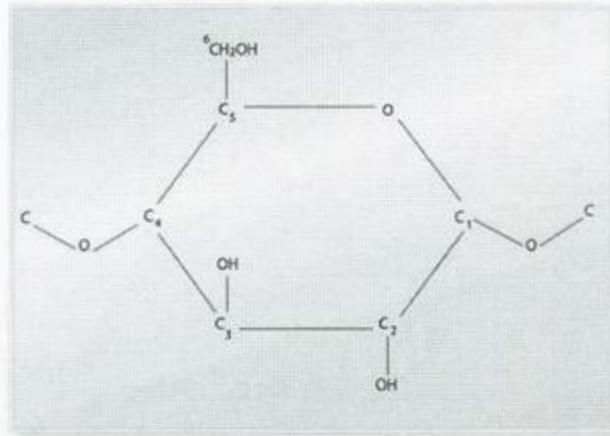


Figura 2d. Molécula de glucosa C₆H₁₂O₆

La proporción de amilosa-amilopectina en la molécula de almidón no es fija, sino que depende del tipo de almidón. Hay aquéllos que promedian de 16 al 30% de amilosa y el resto de amilopectina; los hay otros que son hasta 90% de amilosa y por el contrario, los hay de 100% de amilopectina. El más común es el primero que se menciona [19]. El almidón usado en los experimentos (Sigma Starch from Corn) que se reportan en este trabajo está compuesto aproximadamente por 73% de amilopectina y 27% de amilosa.

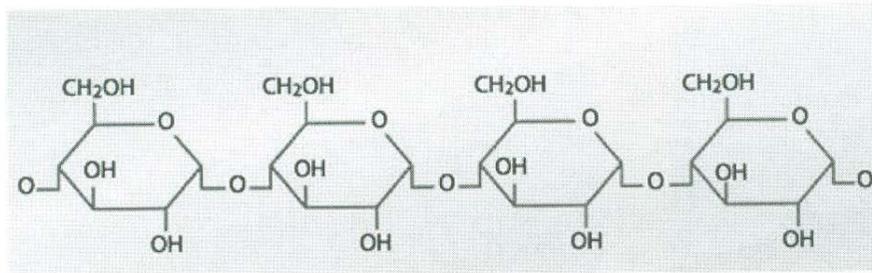


Figura 2e. Molécula de amilosa.

En las plantas se encuentran las enzimas α - y β -amilasa, y aunque atacan a ambas amilosa y amilopectina en los enlaces α -1,4, no pueden hidrolizar el enlace α -1,6, de manera que la amilosa puede ser completamente degradada mientras que la amilopectina sólo parcialmente [7].

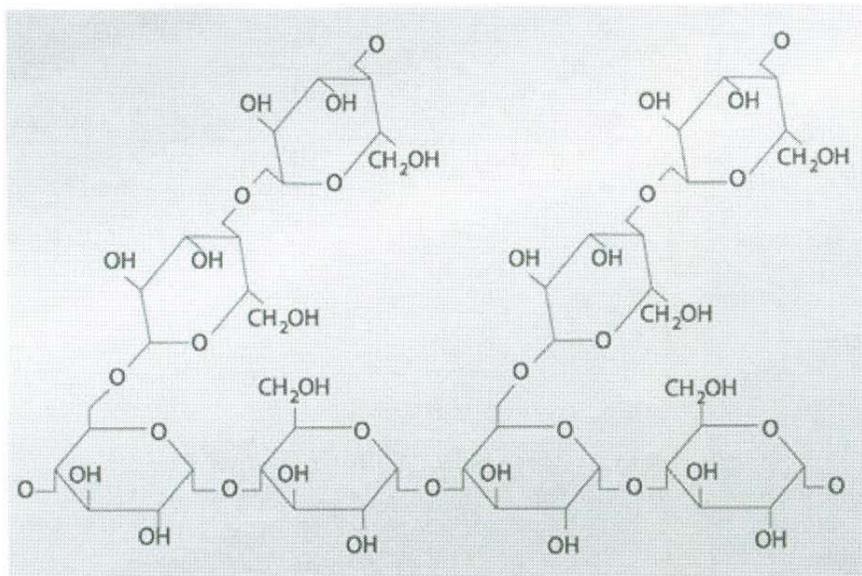


Figura 2f. Molécula de amilopectina

Ahora bien, desde el punto de vista físico, si se agrega un elemento al sistema que lo 'corta' en pedazos, lo que se tiene es que las cadenas disminuyen en longitud, produciéndose un número de moléculas de menor tamaño. Este efecto debe reflejarse en la distribución de tamaños y corroborar esta hipótesis es uno de los objetivos del trabajo.

2.4 Análisis de imágenes

El detector utilizado en los arreglos de dispersión de luz a ángulos pequeños y transmisión de luz es una cámara de video. Las características de la cámara le permiten tomar 30 cuadros por segundo, de manera que en un video de 30 segundos se tienen 900 fotos.

Para hacer el análisis cuantitativo se digitalizaron todos los videos tomados conectando la videocámara a una PC con un cable IEEE 1394. Con el programa Studio 8 se tiene la opción de grabar los videos en diferentes formatos, por defecto se capturaron en formato .AVI.

Una vez los videos en disco duro, se utilizó el software Frameshots para separarlos en imágenes; para estos videos, se tomaron tantas fotos como la resolución de la cámara lo permite, aunque Frameshots es capaz de separar los videos en imágenes con resolución de hasta 1000 cuadros por segundo, además, es posible grabar las imágenes en varios formatos. Se optó por usar el formato .jpeg.

Con el software Image J se cargaron secuencias de imágenes, previamente seleccionadas del conjunto obtenido con Frameshots. Una vez cargada la secuencia, se toma una selección de la imagen, en una localización y tamaño representativos de la imagen. Se exporta entonces un archivo de datos, correspondiente al perfil de intensidades de los píxeles que componen la imagen. Los perfiles usados son de dos tipos, dependiendo del tipo de experimento.

Para SALS se usó el Perfil Radial, que es un promedio sobre todos los píxeles a una distancia r del centro de la selección. El centro y radio de la selección se indica en el software. El archivo de datos tiene dos columnas, una para distancias radiales y la otra para el valor de intensidad asignado, que va de 0 (negro) hasta 255 (blanco).

El perfil analizado en los experimentos de transmisión de luz es el Vertical, que para una altura dada, promedia las intensidades sobre todos los valores de x de la selección.

III.- Arreglos experimentales

3.1.- Preparación del sistema

El sistema está formado por dos componentes, agua ultrapura y almidón de maíz. El almidón utilizado es Sigma Starch from Corn, mientras que el agua es ultrapura, obtenida con el equipo Milli-Q de Millipore, además, fue filtrada con filtro (montado en jeringa esterilizada) de 0.22 μm , en este caso de marca Acrodisc. Las diluciones del sistema se hicieron con micropipeta y puntas esterilizadas, en frascos de 20 ml.

Para hacer las mediciones de masas se utilizó una balanza de precisión Sartorius, con precisión de 10^{-4} gramos.

Para la preparación de volúmenes grandes de solución se usó un vaso de precipitado con capacidad de 5 lt. El agua se calentó en vasos de 1 y 2 lt de capacidad.

Para preparar 150 mililitros de solución se siguió el siguiente procedimiento [1].

1. Se abre una portezuela de la balanza y se apalean pequeñas cantidades del polvo de almidón con espátula desde el frasco contenedor hasta el centro del papel para pesar, observando la pantalla en cada apaleada, hasta que se llegue una masa lo más aproximada posible al número que se busca (0.250 g). Si es necesario retirar polvo del papel, se usa la espátula misma para no contaminar el sistema. Se cierra la portezuela de la balanza de nuevo y se esperan 5 minutos aproximadamente hasta que la lectura en pantalla se estabilice.

2. Es necesario contar con dos vasos de precipitado de 250 ml de capacidad limpios y secos. En uno de ellos, se vierte el almidón previamente pesado y se agrega un poco de agua, tan poco como para que la solución que se forme sea lo más espesa posible. El agua y el polvo deben mezclarse con ayuda de una espátula.

3. Mientras tanto, en el otro vaso de precipitado, se calientan unos 180 ml de agua a 60° C, con el vaso tapado con papel aluminio, para evitar la entrada de

contaminantes al agua, como el polvo, por ejemplo. La temperatura se monitorea con termopar.

4. Enseguida se vierte agua caliente al vaso que tiene la solución, hasta 100 ml. Se agrega al líquido un agitador magnético, se tapa el vaso con papel aluminio y se coloca en una placa agitadora-calentadora. Una vez homogénea la solución en calentamiento y agitación, se agrega agua hasta completar 150 ml. Se continúa el calentamiento y la agitación permanente, hasta que la solución alcance una temperatura de 99.2° C. Esta temperatura debe mantenerse durante 5 minutos. Es deseable tener una placa que caliente lentamente.

5. Finalmente, la solución se deja enfriar con agitación permanente en una placa fría a temperatura ambiente. Es muy importante que la agitación permanente hasta antes de utilizar el sistema, pues así es como se logra que la solución sea homogénea; sin este proceso, siempre se tenían gránulos al final del proceso. La solución agua-almidón preparada es útil por 24 horas.

El procedimiento descrito en párrafos anteriores se implementó tanto para preparar el sistema para experimentos de dispersión de luz, ya sea en ángulos pequeños o en su modalidad de dispersión dinámica, así como para experimentos de transmisión.

Para preparar 3 lt de solución de concentración 3.3×10^{-3} g/ml, se pesaron 10 gramos de almidón, separados en 4 partes de 2.5 gramos cada una. Los 10 gramos se colocaron en el vaso de 5 lt, limpio y seco, mientras que en los vasos de 1 y 2 litros, se calentó agua ultrapura hasta aproximadamente 62 °C (esta vez no se filtró el agua con filtro de 0.22 μ m).

La muestra preparada para DLS/SLS tenía una concentración de 1.72×10^{-3} g/ml. La lectura de la balanza para el almidón pesado fue de 0.2580 g. Para los experimentos de transmisión, la masa pesada fue de 10.0071 gramos y el volumen del solvente fue de 3600 ml; la concentración de esta solución fue de 2.779×10^{-3} g/ml.

Una fuente significativa de error en la exactitud de este valor es el margen de error de las marcas de volumen de los vasos de precipitado pequeños, que es de 5%. La incertidumbre en el volumen para la muestra para experimentos de

transmisión se redujo al medir el volumen final con probeta graduada de capacidad de 1000 ml.

Se preparó una solución con una concentración de 1.718×10^{-3} g/ml y diluyendo ésta, se obtuvieron muestras de menor concentración. Se midió el índice de refracción para cada concentración con el refractómetro Mettler-Toledo RE40D, y ajustando una recta a los datos de la gráfica de índice de refracción vs. concentración, se obtuvo el parámetro $\frac{dn}{dc}$, para la técnica de dispersión de luz a ángulos pequeños.

Las diluciones se hicieron vertiendo 1, 2, 3, 4 y 5 mililitros en 5 diferentes frascos con capacidad de 20 ml. Los 20 ml se completaban con el volumen faltante de agua ultrapura y filtrada. Las concentraciones de almidón de las diluciones son, en orden ascendente,

$$c_1 = 8.60 \times 10^{-5} \text{ g/ml}$$

$$c_2 = 1.72 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$$

$$c_3 = 2.58 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$$

$$c_4 = 3.44 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$$

$$c_5 = 4.30 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$$

Para el estudio del sistema modificado con la enzima α -amilasa, durante el experimento se agregó una gota de solución de enzima en agua, con una concentración de 3.0×10^{-3} g/ml al portamuestras con solución de almidón, posteriormente se homogenizó el nuevo sistema. Se repetía el proceso cuando en el experimento se requería más enzima en el sistema.

3.2 Arreglo de transmisión de luz

El arreglo experimental usado en este caso difiere de los otros dos en que la luz utilizada no es un láser, sino una lámpara de Xenón de una potencia fija de 450 W. Se usó esta fuente porque al hacer pruebas con una lámpara de halógeno y posteriormente con una lámpara de mercurio conectada a un regulador de voltaje, se determinó que las fluctuaciones en intensidad de la luz emitida por ambas fuentes suceden en un rango tan amplio que los resultados obtenidos del análisis de los datos no es confiable. Puede usarse una fuente que no cumpla con coherencia, algún perfil específico o longitud de onda única, pues el análisis de la intensidad de luz transmitida no depende de estos parámetros, como es el caso del análisis que se hace en dispersión de luz. Además, se requiere que la luz incida sobre un área considerable del portamuestras, lo que sería imposible con el uso de un láser como fuente. Sin embargo, en este caso se hace hincapié en que la fuente debe ser estable en el tiempo, para dar factibilidad a la hipótesis de que la luz incidente tiene una magnitud I_0 que no cambia en el tiempo.

La distancia de la fuente al portamuestras fue medida con cinta métrica y fue de 162 cm, mientras que la distancia de la cámara al portamuestras fue de 30 cm. En la Figura 3a se ilustra el arreglo utilizado.

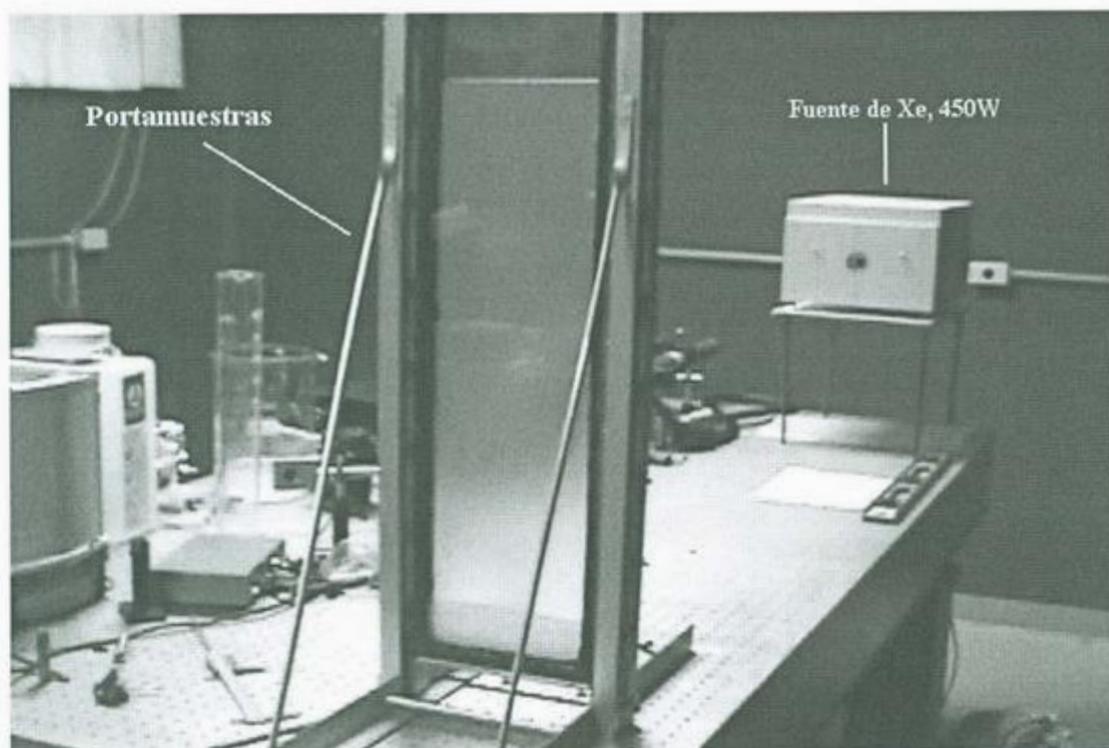


Figura 3a. Arreglo usado en experimentos de Transmisión de Luz

El portamuestras es una celda hecha con dos placas de vidrio de dimensiones de $20 \times 100 \text{ cm}^2$ con grosor de 6mm, separadas una de otra 1.5 cm. Las partes laterales y la base están selladas con pegamento negro. Las últimas partes mencionadas cuentan además con mariposas que permiten ajustar más el recipiente, en caso de que se presenten fugas de líquido.

Sobre la cara que será iluminada se coloca papel albanene para homogenizar la luz que llega al fluido en cuestión. Del otro lado del portamuestras y enfocando la cara del mismo que no está siendo expuesta directamente a la luz, se posiciona la cámara de detección, que una vez más es una videocámara SONY 8mm, modelo DCR-TRV740. El enfoque se hizo de manera similar a como se hizo en el experimento de SALS.

Como es necesario tener la medida en tamaño real de la imagen en el video, se midió con un vernier la altura de la imagen vista en la pantalla de la cámara. La altura medida fue de 15.11 cm. Con el dato que la medida digital de

la altura es de 480 pixeles en medidas digitales, se hace posteriormente en el análisis de los datos una conversión con la proporción respectiva.

La fuente de Xe debe encenderse 30 minutos antes de iniciar con los experimentos para asegurar estabilidad en la intensidad incidente en el portamuestras. Previo a hacer realizar los experimentos con el sistema, se tomó un video con luz a través de agua destilada. Se vació y escurrió el recipiente, para posteriormente verter en él el sistema a estudiar, con ayuda de un embudo, y cuidando que el líquido se deslizara por las paredes del recipiente para que no se formaran burbujas por la caída brusca desde la boca del recipiente hasta el fondo del mismo.

Se tomó una serie de 7 videos de 30 segundos después de vertida la solución. En la siguiente tabla se indica el tiempo transcurrido entre el instante en que se fijó el origen temporal y el instante en que se inició el video #.

| Video | Tiempo de inicio del video, $t_0 = 0$ (minutos) |
|-------|--|
| 1 | 0 |
| 2 | 30 |
| 3 | 60 |
| 4 | 90 |
| 5 | 120 |
| 6 | 180 |
| 7 | 240 |

3.3 Arreglo de DLS

Para los experimentos de DLS se utilizó el equipo ALV/DLS/SLS-5000, que se ilustra en la siguiente imagen

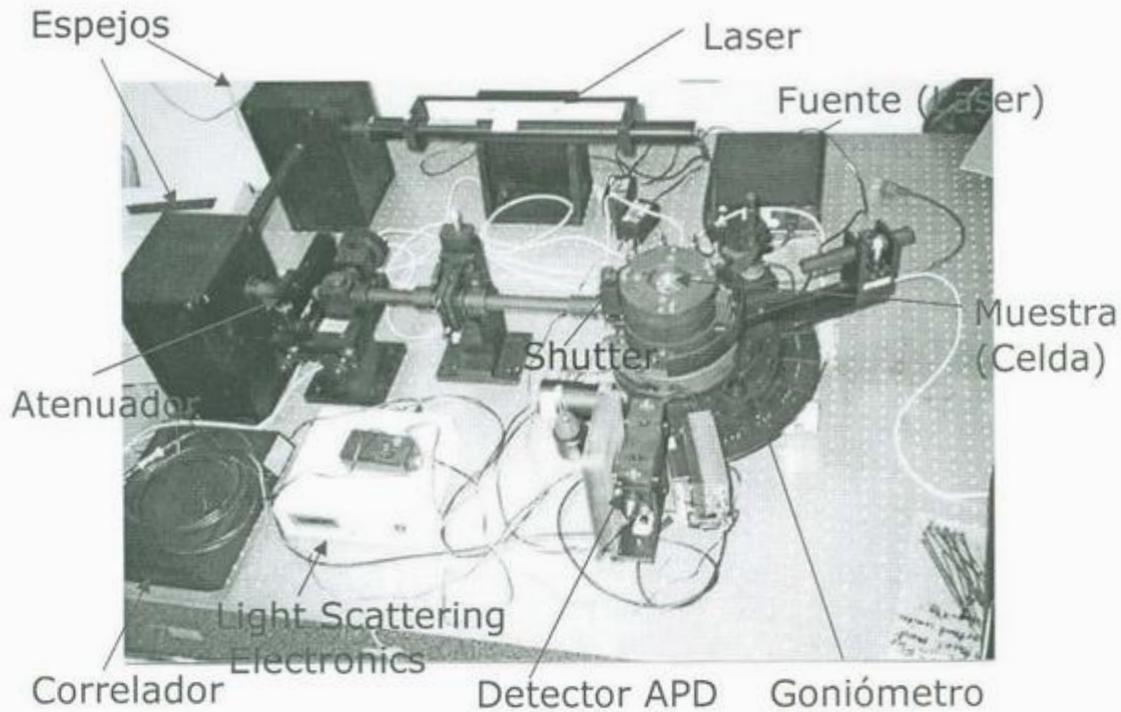


Figura 3b. Imagen del equipo ALV para DLS/SLS.

El láser usado tiene una longitud de onda de 632.8 nm, Los espejos se usan para redirigir al haz simplemente, adaptando el arreglo al espacio que la mesa de laboratorio provee.

Se tiene a continuación un atenuador que permite variar la intensidad de luz incidente. Este dispositivo es importante porque una intensidad demasiado alta dañaría al detector permanentemente.

El siguiente elemento de importancia en el arreglo es el shutter u obturador, que controla la llegada o no de luz hacia el siguiente elemento, la celda donde se coloca el portamuestras.

El detector APD (Avalanche Photodiode) está montado en un goniómetro que permite controlar electrónicamente, mediante el componente indicado en la imagen como Light Scattering Electronics, el ángulo de detección de luz dispersada. El detector está conectado además con el correlador digital ALV-5000/EPP, que es un dispositivo electrónico cuya función fundamental es el de calcular la función de correlación.

El equipo se controla con PC, con el Software ALV-5000/E para Windows.

Al hacer un experimento ó corrida se graba una función de correlación en la memoria. Se hace con esta función de correlación un análisis de cumulantes, ajustando un polinomio de hasta tercer orden de la función $\ln(g_2(t) - 1)$. Los coeficientes del polinomio se convierten a los coeficientes del desarrollo de cumulantes de la función de correlación de campos [16]

$$\ln(g_1(t)) = \ln(A) - \bar{\Gamma}t + \frac{\mu_2}{2}t^2 - \frac{\mu_3}{6}t^3 \quad (42)$$

Los parámetros del ajuste se despliegan en una tabla, primero la amplitud A , seguida por μ_2 y μ_3 , la desviación estándar y el coeficiente de regresión polinomial a primer orden, que se calculan como

Residuos
$$r_{i,j} = \ln(g_2(t_i) - 1) - \sum_{n=0}^j a_n t_i^n \quad (43)$$

Desviación estándar
$$\text{StdDev} = \left(\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (r_{i,j})^2 \right)^{1/2} \quad (44)$$

Coeficiente de regresión a primer orden

$$r_j^2 = 1 - \frac{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} r_{i,j} r_{i+1,j}}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N r_{i,j}^2} \quad (45)$$

donde i es el índice de canales de correlación, N es el número de canales incluidos en el ajuste, j el orden del ajuste polinomial y a_n los coeficientes del polinomio. El radio hidrodinámico medio aparente $\bar{\Gamma}$ se calcula del término lineal en el tiempo en los ajustes de orden desde 1 a 3. El ancho de la distribución de radios y por tanto el índice de polidispersidad PD.I se calculan del segundo momento μ_2 del ajuste a segundo o tercer orden en el ajuste, de acuerdo a las siguientes expresiones (relación de Stokes-Einstein)

$$\text{radio} = \frac{kT}{6\pi\eta\bar{\Gamma}} q^2 \quad D_{app} = \frac{\bar{\Gamma}}{q^2} \quad (47)$$

$$\text{ancho} = \frac{\sqrt{\mu_2}}{\bar{\Gamma}} \text{radio} \quad (48)$$

$$\text{PD.I} = \frac{\mu_2}{\bar{\Gamma}^2} \quad (49)$$

T es la temperatura, η la viscosidad, D el coeficiente de difusión y k la constante de Boltzmann. q es la magnitud del vector de onda dispersado de la medición correspondiente.

El software basa los cálculos en las siguientes expresiones

$$q = \frac{4\pi n \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda}$$

$$K = \frac{4\pi^2 \left(\frac{dn}{dc} n_{\text{solvente}} \right)^2}{N_A \lambda^4} \left(\frac{n_{s \text{ tan dard}}}{n_{\text{solvente}}} \right)^2$$

$$R_{\text{es tan dar / solvente}} = \frac{CR_{\text{es tan dar / solvente}} \sin(\theta)}{I_{\text{mon}}}$$

$$R_{\text{solucion}} = \frac{CR_{\text{solucion}} \sin(\theta)}{I_{\text{mon}}}$$

$$R = \frac{R_{\text{solucion}} - R_{\text{solvente}}}{R_{s \text{ tan dard}}}$$

$RR_{s \text{ tan dard}}$ se almacena como Kc/R

$$Rad = \frac{kT}{6\pi\eta\Gamma} q^2$$

Las siglas CR son alusivas a Count Rate, es decir, la frecuencia a la que llegan fotones al fotomultiplicador, que es la intensidad de la luz dispersada medida. I_{mon} es el valor de intensidad medida en el diodo monitor, es decir, la intensidad de la luz incidente.

Las ecuaciones (35) y (36) son los modelos en que se basa el software para obtener la información física del sistema, en los experimentos de SLS.

$$D_{\text{app}} = D_z (1 + k_D c + \dots) (1 + C \langle S^2 \rangle q^2 + \dots)$$

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M_w P_z(q)} + 2A_2 c + \dots$$

Los parámetros de la ecuación (35) se determinan usando las siguientes funciones polinomiales. El orden del polinomio se deja a discreción.

$$D_{app}|_{c=const.} = a_1 + a_2q^2 + a_3q^4 + \dots$$

$$D_{app}|_{q^2=const.} = b_1 + b_2c + b_3c^2 + \dots$$

Así, los valores de a_i son función de la concentración c , mientras que los valores de b_i dependen de q^2 . Luego entonces se tienen las correspondencias

$$\begin{aligned} D_z(q^2) &= a_1 \\ D_z(c) &= b_1 \\ C(S^2) &= \frac{a_2}{D_z(q^2)} \\ k_D &= \frac{b_2}{D_z(c)} \end{aligned}$$

Para determinar los parámetros involucrados en la ecuación (36), se manejan 3 tipos de gráficas, las de tipo Zimm, Berry y Guinier.

En las de tipo Zimm, se grafica Kc/R vs $q^2 + kc$, con base en la expresión

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M_w \left(1 - \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right)} + 2A_2c$$

y se ajustan a la ecuación anterior los polinomios

$$\frac{Kc}{R}|_{c=const.} = a_1 + a_2q^2 + a_3q^4 + \dots$$

$$\left. \frac{Kc}{R} \right|_{q^2 = \text{const.}} = b_1 + b_2c + b_3c^2 + \dots$$

De tal forma que el ajuste polinomial determina los parámetros

$$\begin{aligned} M_w(q^2) &= 1/a_1 \\ M_w(c) &= 1/b_1 \\ R_g &= \sqrt{3a_2 M_w(q^2)} \\ A_2 &= b_2/2 \end{aligned}$$

En las gráficas tipo Berry se grafica $\sqrt{Kc/R}$ vs $q^2 + kc$ y el análisis se basa en la expresión

$$\left(\frac{Kc}{R} \right)^{1/2} = \left(\frac{1}{M_w \left(1 - \frac{1}{6} R_g^2 q^2 \right)} + 2A_2c \right)^{1/2}$$

mientras que en las gráficas tipo Guinier lo que se grafica es $\ln\left(\frac{Kc}{R}\right)$ vs $q^2 + kc$ y el análisis está basado en

$$\ln\left(\frac{Kc}{R}\right) = \ln\left(\frac{1}{M_w \exp\left(-\frac{1}{3} R_g^2 q^2\right)} + 2A_2c \right)$$

Puede obtenerse la misma información con los tres tipos de gráficas arriba mencionados. El software ALV además calcula los errores de los ajustes, así es posible tener un criterio de qué ajuste es el más adecuado para las mediciones efectuadas.

3.4 Arreglo de SALS

Los experimentos de dispersión de luz a ángulos pequeños se realizaron con el montaje esquematizado en la figura 3c e ilustrado en la figura 3d

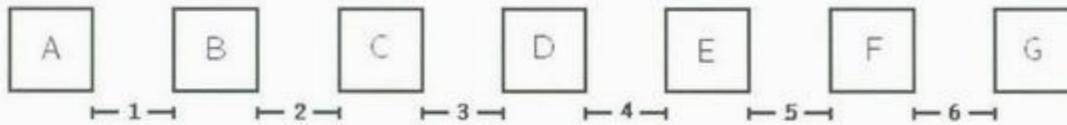


Figura 3c. Esquema del arreglo de SALS

| | | | |
|---|------------------|---|---------------------|
| A | Fuente | E | Portamuestras |
| B | Filtro Espacial | F | Pantalla |
| C | Lente Colimadora | G | Cámara de detección |
| D | Lente de Enfoque | | |

Se especifican a continuación las distancias relevantes usadas en el experimento. Las no especificadas son libres o no pueden fijarse.

| | |
|---|---------|
| 1 | Libre |
| 2 | 30 cm |
| 3 | Libre |
| 4 | 30 cm |
| 5 | 36.5 cm |
| 6 | 21 cm |

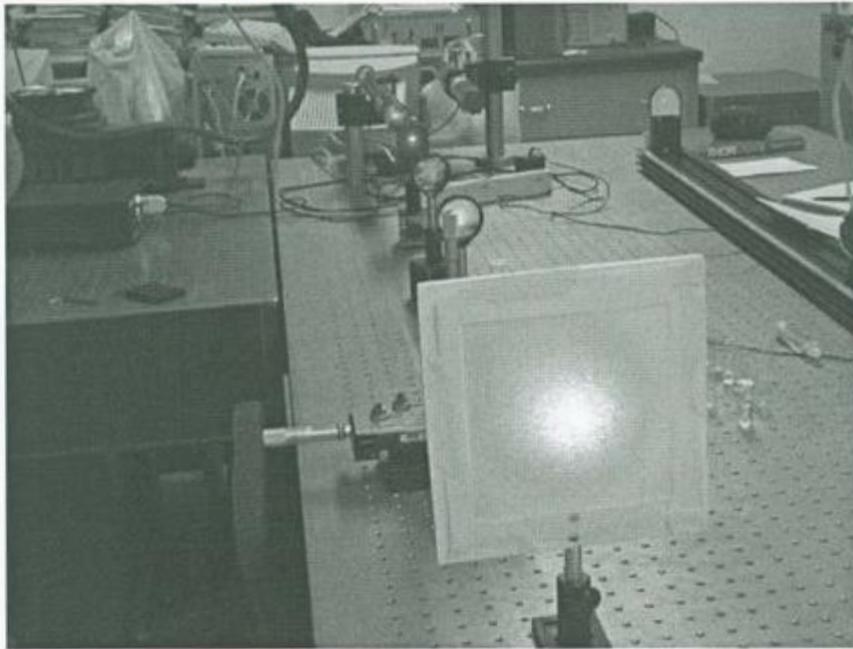


Figura 3d. Arreglo usado en los experimentos de SALS

Como fuente se utilizó un láser de 35 mW de potencia y de longitud de onda $\lambda_0 = 632.8 \text{ nm}$. La alineación del haz se hace de manera que la línea descrita por éste sea paralela a la mesa de laboratorio, para lo cual se coloca un objeto a la salida del mismo, descansando sobre la mesa y observando la altura a la que el rayo incide en el objeto, luego, se recorre el mismo objeto a lo largo de la línea hasta llegar al final de la mesa y se verifica que el rayo incida a la misma altura que al inicio del camino del haz. En caso de que haya una diferencia entre estas alturas, se modifica la inclinación de la fuente hasta corregir la oblicuidad entre el camino del rayo y la mesa.

El objeto B (Figura 3e), es un montaje de fábrica marca Edmund Optics, que consta de dos elementos, uno es un objetivo de 40X de magnificación que modifica el frente de onda de plano a circular y concentra la luz en un punto y el otro, el principal, es un filtro espacial con ranura de $20 \mu\text{m}$, cuya función es la de eliminar el ruido en la distribución de intensidades. La distancia entre el objetivo

cuya distancia focal es desconocida y el filtro espacial se manipula por medio de un tornillo micrométrico que el montaje tiene integrado.

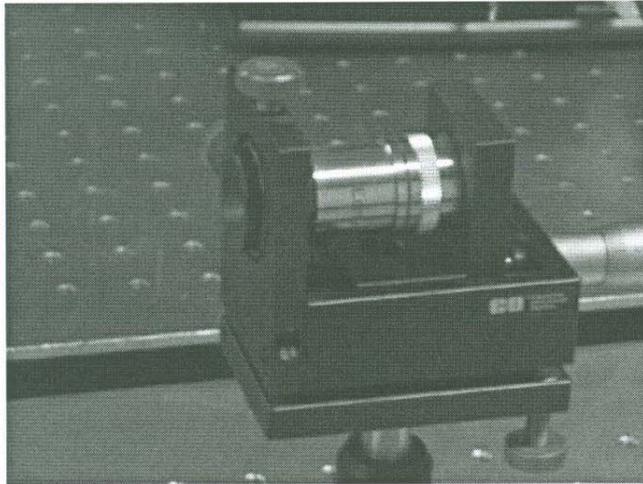


Figura 3e. Montaje de objetivo de 40X y filtro espacial

Una vez que el haz está 'limpio', se abre con una divergencia no conocida pero no lo suficientemente grande como para superar el tamaño de la lente C que se coloca a una distancia del filtro igual a la focal de dicha lente (30 cm). Se coloca C a esta distancia para que el haz transmitido por ésta no tenga divergencia, es decir, esté formado por rayos paralelos, al menos en las escalas de espacio que se manejan en la mesa de laboratorio. La 'limpieza' del haz filtrado se verificó en un punto en que el haz es paralelo.

Como portamuestras E se usaron cubetas de acrílico transparente de base cuadrada de 12 mm de lado y una altura de 44 mm, con capacidad de 4 ml, pero llenados con 3mm.

Los portamuestras van montados en un goniómetro de precisión cuya orientación era manipulada cada vez que se colocaba un portamuestras, para cuidar que el haz fuese perpendicular a la cara de E, en la dirección controlable con el goniómetro, a su vez montado sobre una base con control de altura respecto a la mesa, así como control de movimientos perpendicular y paralelo al

haz, ambos sobre un plano paralelo a la mesa. Véase figura 3f. El paralelismo entre la base de control XYZ y la mesa se verificó al hacer el montaje, con un nivel de gota de agua.

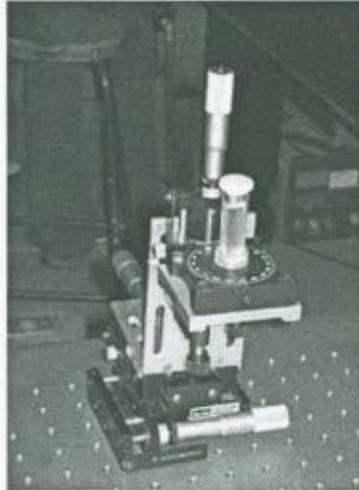


Figura 3f. Base con control en XYZ, goniómetro y portamuestras.

En el arreglo, E se colocó a una distancia de aproximadamente 90 cm de C, una vez hecho esto, se colocó una lente similar a C a una distancia igual a la focal (30 cm, nuevamente) del centro del portamuestras, de tal manera que se lograra tener el mínimo volumen en esta región. La pantalla, denotada en el diagrama por F consta de un rectángulo de papel albanene de $21 \times 20 \text{ cm}^2$ con marco de acrílico blanco, además de un mango metálico para su montaje en la mesa de laboratorio. F se colocó después del portamuestras a una distancia de 36.5 cm. Se escogió esta distancia con base en el detalle apreciable a simple vista de las fluctuaciones en el patrón de dispersión.

Como detector G usó una videocámara comercial 8 mm Digital Handycam marca SONY, modelo DCR-TRV740 (Figura 3g). Como es común en videocámaras comerciales, la resolución temporal es de 1/30 de segundo, es decir, 30 cuadros por segundo.



Figura 3g Cámara de detección G

Para enfocar la cámara de video se utilizó el siguiente procedimiento. Se dibuja con un utensilio de escritura (de punta fina, de preferencia) y una regla una cruz en una hoja de papel. Dicho dibujo se coloca sobre la pantalla a la que llega la luz dispersada por el portamuestras, de tal manera que la hoja sea vista en la cámara. El control de enfoque se manipula hasta tener una imagen nítida de la cruz.

Con tal de aprovechar la totalidad de la resolución espacial de la cámara (720 x 480 pixeles) la opción de 'zoom' de la cámara no fue utilizada.

Los experimentos realizados referentes a la técnica de dispersión de luz a ángulos pequeños constan de 10 videos de duración de 30 segundos cada uno, dos videos para cada concentración de la muestra en estudio, además de 1 video para el agua usada como solvente. Para una concentración dada, el primer video se toma inmediatamente después de homogenizar la solución en el portamuestras. Después, se agregó 1 gota de solución de enzima α -amilasa al sistema, se homogenizó y se tomó un segundo video. Se repitió el procedimiento con cada concentración de solución de almidón-agua.

IV.- Resultados experimentales

A continuación se presentan por separado, los resultados obtenidos utilizando los tres arreglos descritos en el capítulo anterior.

4.1.- Resultados de transmisión de luz

Como se mencionó en la parte de Análisis de Imágenes en la sección de Arreglos Experimentales, cada video de los 7 tomados se separó en imágenes, a razón de 30 cuadros por segundo, sin embargo, se tomó el primero de cada set de 30 cuadros, es decir, se monitoreó el perfil de intensidades cada segundo.

La selección del área de análisis abarca todas las alturas posibles (0-479) y el ancho de la selección es de 24 pixeles. El rectángulo tiene esquina superior izquierda en las coordenadas (346,0).

En la siguientes gráfica se presentan los perfiles verticales de intensidades para los tiempos $t = 0$, $t = 2$ horas, $t = 4$ horas.

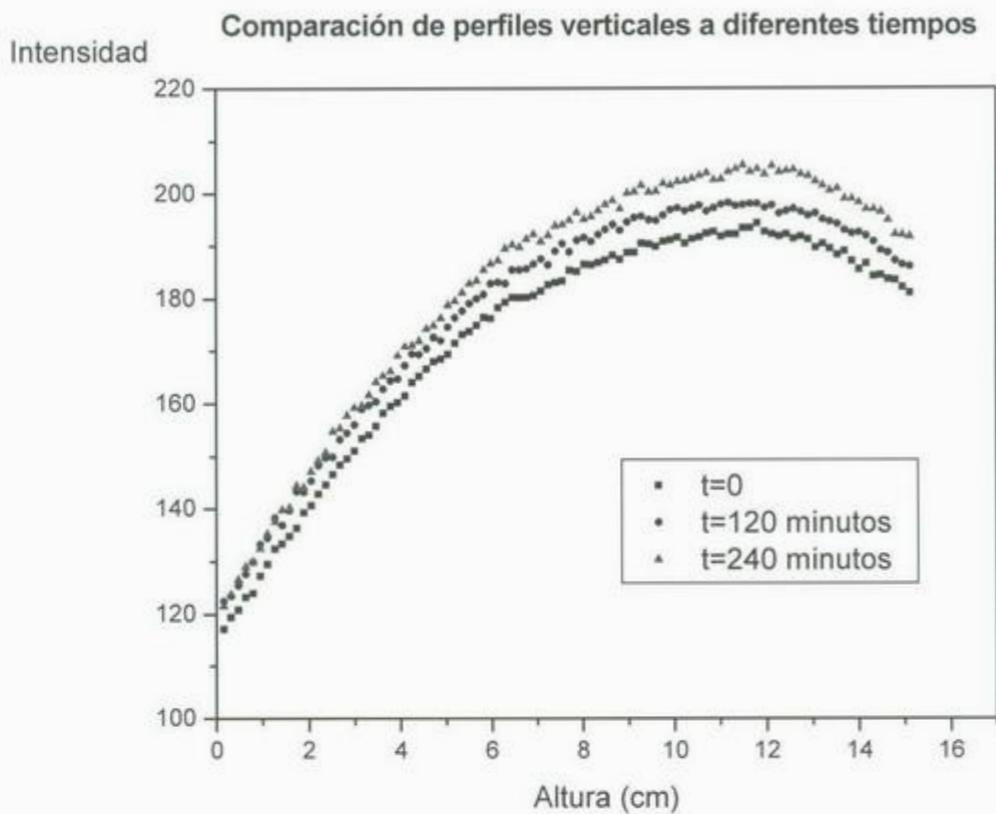


Figura 4a. Comparación de perfiles verticales.

Antes de realizar el experimento, se esperaba que las curvas de intensidad transmitida crecieran para todo incremento en la altura, pues como resultado del proceso de sedimentación se tiene que a mayor altura en el portamuestras, la concentración es menor. El hecho de que la curva del perfil de intensidades empiece a decaer después de una altura de 12 cm puede deberse a que la intensidad de la luz que incide en el portamuestras no es la misma para todas las alturas. No obstante, se observa que para todas las alturas las intensidades aumentan conforme el tiempo pasa. Esto es evidencia de que la concentración disminuye en cada zona del portamuestras a medida que transcurre el tiempo.

Se muestran dos de las fotos analizadas para contrastar de manera visual la transmisión de luz a inicio y al final del experimento. Obsérvese cómo la tonalidad de la segunda foto es notablemente más blanca que en la primera. Cualitativamente es claro que en la segunda se refleja un cambio en la concentración tan grande que a simple vista es posible apreciar la diferencia en la intensidad de la luz transmitida, lo cual es congruente con lo concluido en la gráfica anterior.

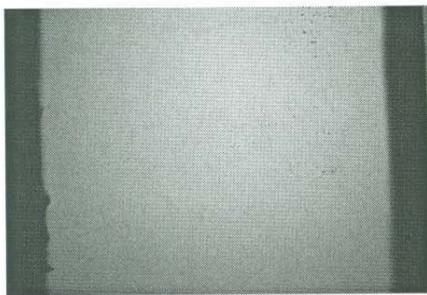


Foto a $t=0$

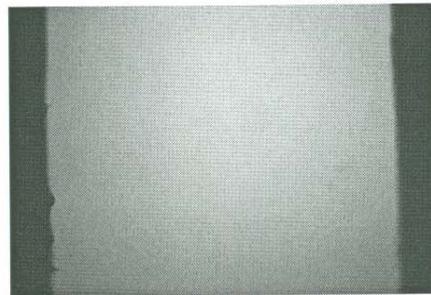


Foto a $t=240$ minutos

Figura 4b. Contraste visual entre fotos del experimento de transmisión.

Es posible caracterizar cómo cambia el valor de la intensidad en una región, en el tiempo. Para ello se grafica contra el tiempo los valores que toma la intensidad localmente.

Los siguientes datos corresponden a los valores medios de la intensidad transmitida promediada en el intervalo de tiempo que dura el video, para los 7 videos tomados, en una región cuadrada centrada en la imagen. La selección digital tomada es de 24×24 píxeles cuadrados, con esquina superior izquierda en las coordenadas (346,228). Así, cada punto corresponde a un promedio en el tiempo que dura el video y en el área de la selección.

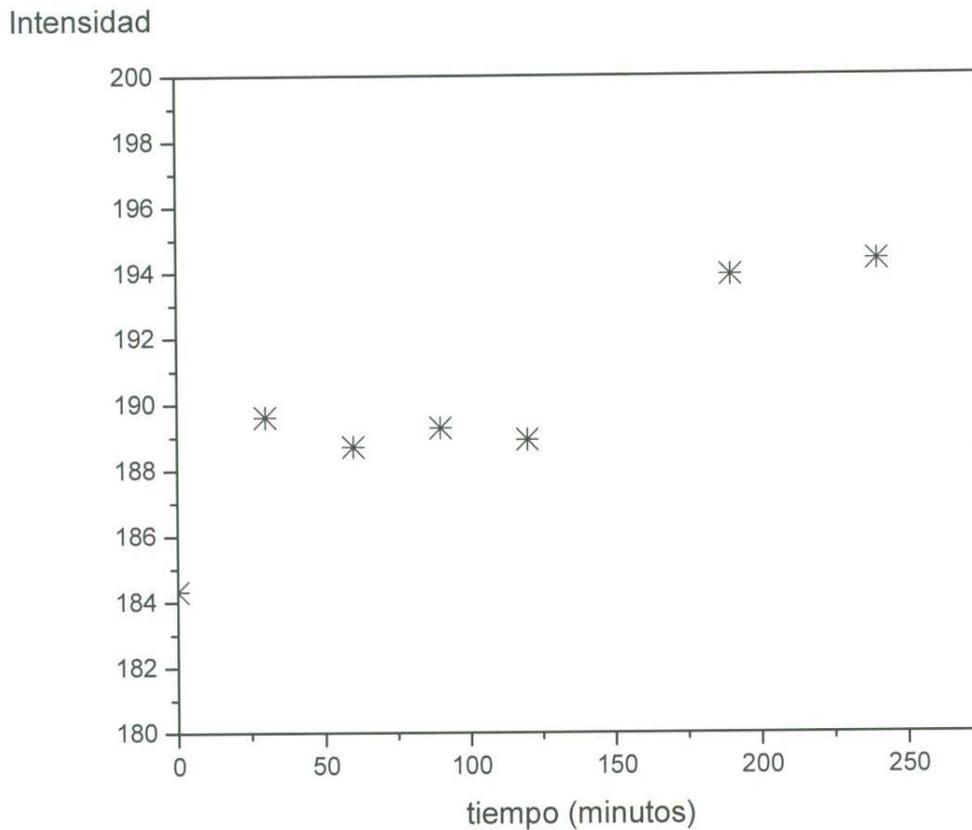


Figura 4c. Evolución temporal de la intensidad promedio en intervalos de 30 segundos

En la Figura 4c, el comportamiento es algo errático si se ve a primera vista: un aumento en la intensidad en la primera media hora, una estabilidad aparente entre los tiempos $t=30$ y $t=120$, un nuevo aumento en la intensidad hacia el siguiente punto y estabilidad aparente en el intervalo de la última hora. Sin embargo, una conclusión de precisión no puede hacerse con estos datos.

Por ejemplo, si se consideran intervalos iguales de 2 horas, puede verse un aumento gradual en los puntos en $t=0$, $t=120$ y $t=240$, pero la ausencia de puntos intermedios impide que pueda asegurarse que se trata de un comportamiento lineal.

Una tendencia similar se observa al considerar los puntos espaciados por intervalos de 90 minutos, con $t=0$ como punto inicial.

Al observar los datos en un conjunto no puede establecerse un ajuste adecuado a los puntos que se tienen. Un monitoreo más fino en cuanto a la escala temporal y en la de intensidades, así como un control preciso de todo lo involucrado en el montaje experimental proporcionarían un conjunto de datos más confiable en cuanto al análisis cuantitativo se refiere.

Una conclusión de los experimentos realizados es la afirmación de la factibilidad de estudiar el fenómeno de sedimentación mediante técnicas de transmisión de luz.

Al observar los primeros dos puntos de la gráfica de la figura 4c, se aprecia un incremento de aproximadamente 6 unidades en la escala normalizada de intensidades, lo que permite concluir que después de 30 minutos de homogenizado el sistema, la concentración ha cambiado considerablemente. Así, Para experimentos de DLS/SLS y SALS, en los cuales debe asegurarse equilibrio del sistema, debe homogenizarse el sistema antes de cada medición, pues no se tiene información más precisa respecto a los tiempos en que cambia la concentración de manera apreciable.

4.2.- Resultados de DLS

Con el equipo ALV se hicieron 5 repeticiones de 30 segundos de duración cada una para una solución de almidón en agua con una concentración de 3.22×10^{-3} g/ml a un ángulo de 90 grados, que es el más usado en experimentos de DLS. Se repitió el experimento agregando a las muestras una solución de la enzima α -amilasa con concentración de 3.0×10^{-3} g/ml. La enzima se agregó por gotas, primero 1, luego 4 más, después 5 más y finalmente 5 más, acumulando un total de 15 gotas de la solución de enzima al final del experimento. Antes de hacer alguna medición después de agregar α -amilasa, se homogenizó el sistema durante 3 minutos aproximadamente. La Figura 4c está tomada directamente del software ALV y sintetiza los resultados gráficos de las mediciones.

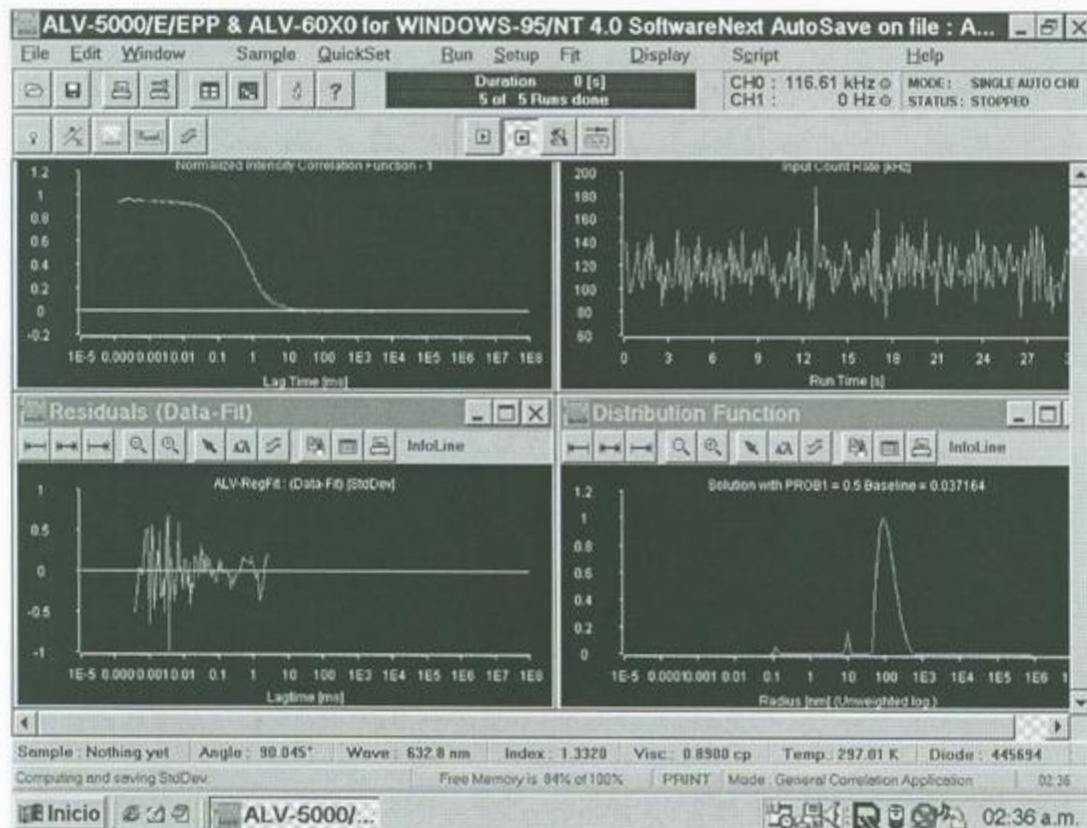


Figura 4d. Pantalla del Software ALV para experimentos de DLS con solución de almidón

De manera cualitativa, después de haber agregado 15 gotas de la solución de enzima al portamuestras con el sistema en cuestión, se observó que la apariencia del líquido era mucho más transparente, como agua, y no azul lechoso como antes de agregar la enzima. Este es un indicio del proceso químico que tuvo lugar al mezclar los componentes mencionados. Sin embargo, aunque se esperaba que en promedio el radio de las partículas disminuyera, no se observó un cambio significativo en la curva correspondiente a la distribución de tamaños no pesada, ni tampoco en el valor del máximo de la misma.

Se presenta a continuación el detalle numérico de la distribución de tamaños no pesada, que es la que aparece en la gráfica inferior derecha de la figura 4d.

radio (no pesado):

Primer máximo de 1.189×10^{-1} [nm] a 1.401×10^{-1} [nm] (**0.77242** %) con posición media de 1.222×10^{-1} [nm] y anchura relativa de $\pm 6.191 \times 10^{-2}$

Segundo máximo: de 8.554 [nm] a 10.08 [nm] (**2.63486** %) con posición media de 9.664 [nm] y anchura relativa de $\pm 7.200 \times 10^{-2}$

Tercer máximo: de 4.430×10^1 [nm] a 5.222×10^2 [nm] (**96.59272** %) con posición media de 1.131×10^2 [nm] y anchura relativa $\pm 4.929 \times 10^{-1}$

Se realizaron repeticiones de 60 segundos y los resultados no difieren en forma apreciable de los obtenidos con repeticiones de 30 segundos. Las señales de intensidad (count rate) exhiben un promedio temporal estable en los tiempos de medición.

Los radios hidrodinámicos y coeficientes de difusión a diferentes órdenes en el análisis de cumulantes se muestran a continuación.

"1er orden en cumulantes"

coeficiente de difusión [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] 1.4889E+000

radio hidrodinámico [nm] 1.6410E+002

"2do orden en cumulantes "

| | |
|--|-------------|
| coeficiente de difusión [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] | 2.0129E+000 |
| radio hidrodinámico [nm] | 1.2138E+002 |
| parámetro de expansión μ^2 | 2.2328E-001 |

"3er Orden en cumulantes "

| | |
|--|-------------|
| coeficiente de difusión [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] | 2.1389E+000 |
| radio hidrodinámico [nm] | 1.1422E+002 |
| parámetro de expansión μ^2 | 3.6329E-001 |
| parámetro de expansión μ^3 | 1.3326E-001 |

Para calcular éstos parámetros, el software usa las ecuaciones (42) y siguientes.

La distribución de tamaños pesada con masa se muestra en la siguiente figura:

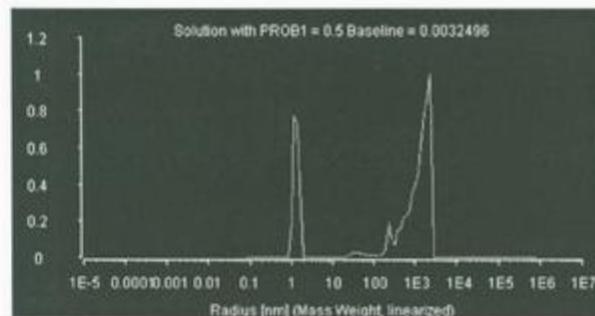


Figura 4e. Distribución de tamaños pesada con masa

Puede interpretarse la existencia de dos máximos como la presencia de dos tipos de estructuras con proporción porcentual similar (1 y 0.8), con tamaños alrededor de 1 y 1000 nm. El tamaño mayor es un reflejo de la aglomeración de moléculas de almidón en estructuras más complejas.

Punto siguiente es el análisis de los experimentos de DLS en los cuales se agregó la enzima α -amilasa.

Para 5 repeticiones de 60 segundos de duración, después de agregar 1 gota (~.05 ml) de la solución de enzima y homogenizar, los datos gráficos tomados del software son

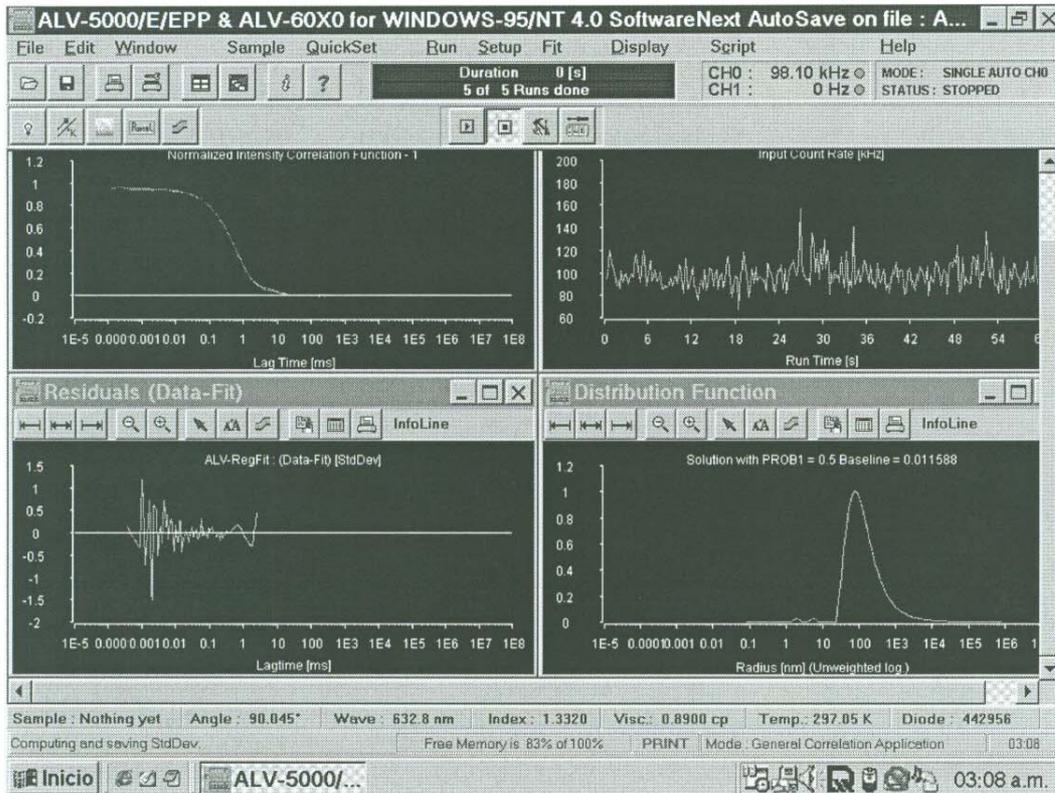
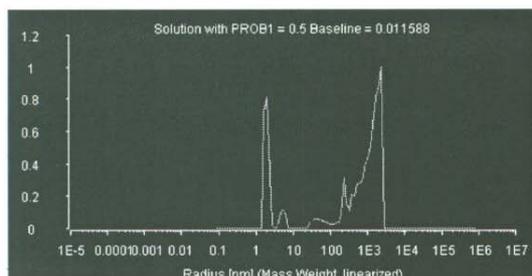
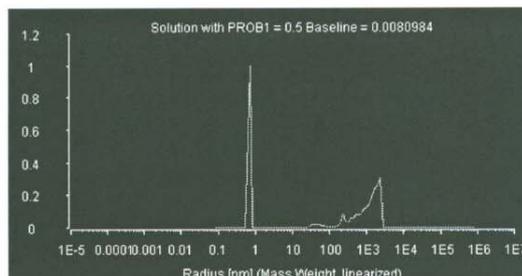


Figura 4f. Pantalla de software ALV para experimentos de DLS con solución de almidón+ α -amilasa

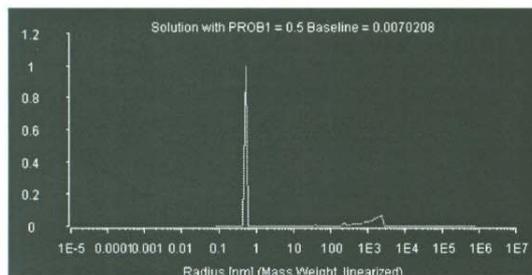
Las distribuciones de tamaño no pesado después de haber acumulado 5, 10 y 15 gotas de enzima agregada al almidón no variaron en ancho ni en número de picos. Se procedió entonces a un análisis de las distribuciones de tamaños de partículas pesadas con masa, que para las diferentes cantidades de enzima agregada, tomaron las formas siguientes



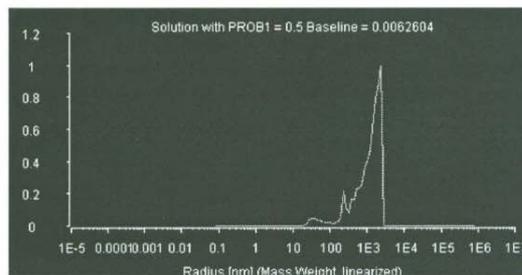
Una gota de α -amilasa



5 gotas de α -amilasa



10 gotas de alfa-amilasa



15 gotas de alfa-amilasa

Figura 4g. Evolución de la distribución de tamaños pesada masa en experimentos de DLS de almidón+enzima.

Teniendo en consideración que la acción de la enzima α -amilasa es de 'cortar' las cadenas de almidón en sitios específicos [7], disminuyendo así el tamaño de las moléculas, se interpreta la secuencia de distribuciones de la figura anterior. La hipótesis hecha es que conforme aumenta la cantidad de esta enzima en la muestra, la proporción de las partículas más masivas disminuye, mientras que aumenta la proporción de las menos masivas. Esto concuerda con la hipótesis hecha en la descripción del sistema. En las gráficas para 1, 5 y 10 gotas puede constatarse esto, Sin embargo, la última de las distribuciones presentadas no coincide con esta interpretación, por lo que una explicación complementaria es necesaria.

Una posible interpretación es que a partir de cierta concentración aun no determinada de la enzima α -amilasa en la muestra de estudio, los 'segmentos' del almidón se reagrupan, formando nuevamente estructuras masivas.

Los resultados cuantitativos referentes al coeficiente de difusión y radio hidrodinámico a primer orden en el análisis correspondiente a distribuciones de la Figura 4g se muestran a continuación.

Para 1 gota de α -amilasa:

| | |
|--|-------------|
| coeficiente de difusión [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] | 1.6313E+000 |
| radio hidrodinámico [nm] | 1.4979E+002 |

Para 5 gotas de α -amilasa:

| | |
|--|-------------|
| coeficiente de difusión [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] | 1.7885E+000 |
| radio hidrodinámico [nm] | 1.3654E+002 |

Para 10 gotas de α -amilasa:

| | |
|--|-------------|
| coeficiente de difusión [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] | 1.6447E+000 |
| radio hidrodinámico [nm] | 1.4850E+002 |

Para 15 gotas de α -amilasa:

| | |
|--|-------------|
| coeficiente de difusión [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] | 1.6749E+000 |
| radio hidrodinámico [nm] | 1.4580E+002 |

En todos los casos (con y sin α -amilasa) el radio hidrodinámico está contenido en la distribución de tamaños no pesada. Nótese que el cambio (disminución) más significativo es en el radio hidrodinámico al pasar de la solución con puro almidón al caso de almidón con la enzima.

Con los experimentos de DLS realizados y los resultados obtenidos, se cumple con el primer objetivo de este trabajo de tesis.

4.3.- Resultados de SALS

Como se mencionó en Arreglos Experimentales, con la técnica de SALS se hizo un estudio de las soluciones de almidón en agua a diferentes concentraciones, antes y después de agregar la enzima α -amilasa.

Las siguientes son imágenes de los patrones de dispersión correspondientes a soluciones de almidón en agua, a concentraciones c_1 , c_2 y c_5 .

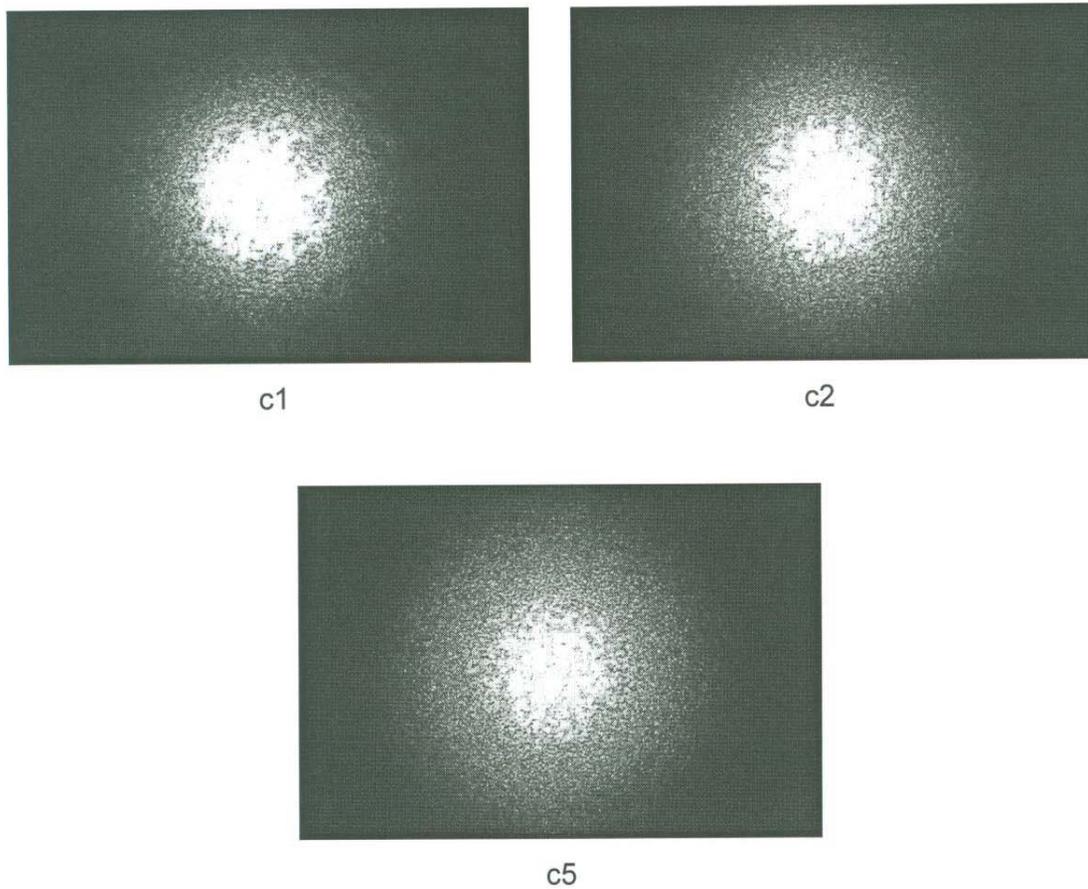


Figura 4h. Comparación cualitativa de los patrones de dispersión de almidón a 3 concentraciones

Diferencias cualitativas notables pueden puntualizarse a partir de éstas imágenes. A medida que la concentración aumenta, el halo correspondiente a luz

dispersada se hace más grueso. Es también detectable a simple vista que la intensidad transmitida en la parte central del patrón disminuye conforme la concentración es mayor (Ley de Beer).

Se presenta a continuación una gráfica donde se comparan los perfiles radiales de intensidades de los patrones de dispersión de las 5 concentraciones utilizadas en el experimento. Los ángulos en que se mide la intensidad varían entre 0 y 7 grados, siendo la línea de incidencia la referencia.

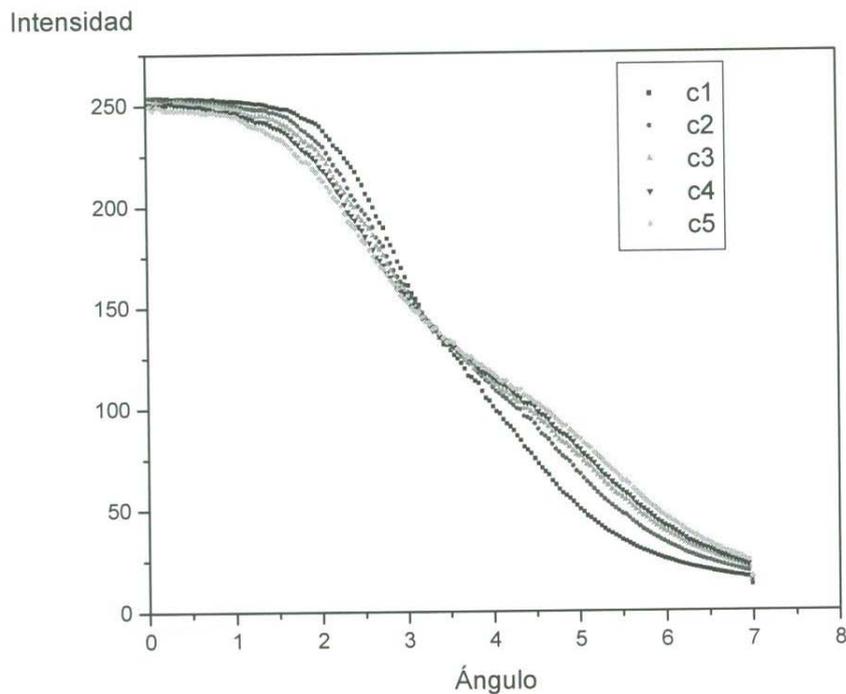


Figura 4i. Perfiles radiales de intensidad para 5 concentraciones de almidón en solución con agua

Nótese como los perfiles radiales de intensidad de las concentraciones convergen en el rango de ángulos entre 3 y 3.5. Podemos dividir el perfil de intensidades en dos partes, la primera es antes de esta región de transición, que es donde el fenómeno de transmisión es predominante. La segunda división del

perfil es la correspondiente a ángulos de 3.5 y mayores, que es donde el fenómeno de dispersión se hace patente.

A manera de prueba y sin la capacidad de hacer un estudio cuantitativo en lo que la cinética enzimática se refiere, se tomó un video en el cual se refleja que procesos químicos ocurren al agregar la enzima. El patrón de dispersión original se distorsiona al agregar α -amilasa, no sólo por la perturbación mecánica al agregar la(s) gota(s), sino también después de un tiempo suficiente para que las vibraciones cesaran. Una imagen de cómo es el patrón de dispersión mientras los procesos ocurren se presenta a continuación

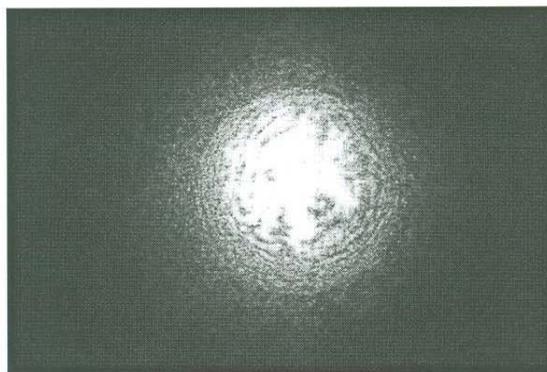


Figura 4j. Imagen de dispersión de la solución con enzima.

Con un promedio en el tiempo para cada ángulo en los perfiles de intensidad y restringiendo el análisis a ángulos entre 6.13954 y 6.94523, se obtuvo un radio de giro R_g y con éste el radio hidrodinámico R_h para cada concentración. Se denotan con c_x las concentraciones de las soluciones, y con $c_{y-\alpha}$ aquellas soluciones las que se les agregó una gota de la solución de enzima.

El siguiente es un ejemplo de cómo se calculó el valor de R_g para las diferentes concentraciones. Se hace un ajuste lineal de la forma $A + BX$, de acuerdo a las gráficas tipo Guinier, $B = (-1/3)R_g^2$. En el ejemplo, $B = -9.30894 \times 10^{-13}$. En la tabla posterior a la figura 4k, se muestran los parámetros calculados en cada caso de concentración.

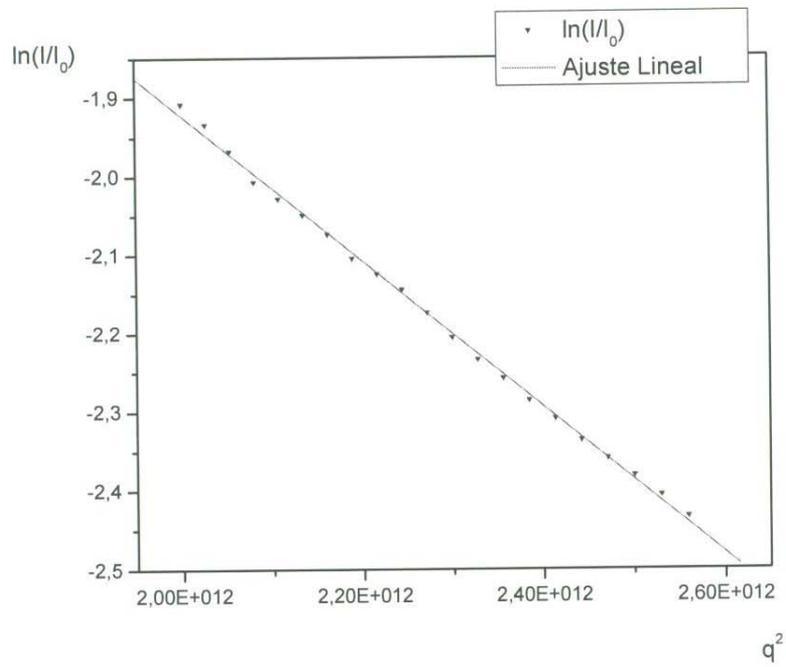


Figura 4k. Ajuste lineal para el cálculo de R_g para la concentración c_4 .

| Solución | R_g (nm) | R_h (nm) |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| C ₁ | 1.36×10^3 | 1.76×10^3 |
| C _{1-α} | 1.32×10^3 | 1.70×10^3 |
| C ₂ | 1.56×10^3 | 2.02×10^3 |
| C _{2-α} | 1.55×10^3 | 2.00×10^3 |
| C ₃ | 1.63×10^3 | 2.10×10^3 |
| C _{3-α} | 1.65×10^3 | 2.13×10^3 |
| C ₄ | 1.67×10^3 | 2.15×10^3 |
| C _{4-α} | 1.65×10^3 | 2.14×10^3 |
| C ₅ | 1.68×10^3 | 2.16×10^3 |
| C _{5-α} | 1.67×10^3 | 2.16×10^3 |

Con el equipo ALV, sin embargo, se obtuvo que el valor del radio hidrodinámico es de 1.64×10^2 nm. Los resultados presentados en la tabla anterior, obtenidos con SALS difieren hasta en un orden de magnitud lo cual refleja que el arreglo macromolecular no es esférico y se incluyó solamente como una referencia, es decir, la información más relevante en estos resultados es la correspondiente al radio de giro. Para una comparación más fundamentada deben hacerse experimentos de SLS con el equipo ALV. La concentración del sistema con que se determinó este valor es de 3.22×10^{-3} g/ml. Los parámetros obtenidos con la técnica de SALS pierden precisión por diferentes motivos.

El primero de ellos es que el sistema debe estar en un límite de dilución. A medida que la concentración es menor, el radio de giro obtenido también disminuye, pero existe una concentración a partir de la cual, al seguir diluyendo, se obtiene un valor para R_g constante. Es entonces cuando es más viable hacer comparación entre una técnica y otra.

Un segundo factor que influye en los resultados obtenidos es la precisión con que se monta el arreglo experimental. Algunos de los detalles que deben observarse son: la regulación de la fuente, las características del filtro espacial y lentes, la determinación de las distancias entre los elementos del arreglo, el control de alineación, el portamuestras utilizado, el control de perpendicularidad entre el haz y el portamuestras, el detector utilizado, la escala de intensidades, etc.

No obstante los resultados numéricos obtenidos como una primera aproximación al método, se ha logrado una introducción al desarrollo experimental de una técnica confiable de estudio cuando es desarrollada con el equipo y experiencia necesarios.

V.- Conclusiones y perspectivas

El trabajo realizado involucra varios aspectos en lo que desarrollo experimental se refiere. Se han abordado el diseño y construcción de dispositivos, adecuación y/o modificación de aquéllos con que se cuenta de antemano, así como familiarización con el equipo estandarizado.

Aún que los resultados numéricos obtenidos no sean satisfactorios en sí mismos, al comparar con un estándar, se logró un primer acercamiento lo que a métodos experimentales de estudio se refiere. En un enfoque particular, se han sentado bases para sistematizar el uso de la técnica de transmisión en la caracterización de procesos de sedimentación, así como para utilizar la técnica de dispersión de luz a ángulos pequeños para caracterizar un sistema antes y después de la acción de la acción enzimática que repercute directamente en la distribución de tamaños.

Se alcanzó además una familiarización en el uso del equipo SLS/DLS para determinar distribuciones de tamaños con diferentes criterios, que pueden ser la masa o el número de partículas presentes en el sistema. En específico se usó el primero de los criterios, dando sustento a la información que se tiene de antemano sobre los procesos que ocurren en la hidrólisis del almidón. Efectivamente, los tamaños de las moléculas disminuyen al agregar la enzima, hasta tener en la muestra sólo macromoléculas cuya masa es mucho menor que al inicio. Un efecto inesperado se observó en la etapa final de agregación de enzima y consiste en el reagrupamiento macromolecular ilustrado en la figura 4g.

En cuanto a las perspectivas del trabajo, será útil llevar a cabo experimentos de DLS para determinar cuantitativamente la concentración a partir de la cual se forman estas estructuras.

Existen aspectos prácticos del arreglo de dispersión de luz a ángulos Pequeños que pueden ser mejorados. Lo más relevante al respecto son: el uso de una cámara de detección con resolución temporal y espacial superiores a las que se usaron en este trabajo. Una cámara con resolución de 1 milisegundo permitiría estudiar la dinámica de sistemas de este tipo. Se mejoraría la técnica también con

la cuantificación de la potencia de entrada de la luz al sistema y la salida del haz de la misma, así como el uso de atenuador y polarizador, para tener un mayor control sobre la luz incidente y dispersada, respectivamente.

En lo que al control de las condiciones del sistema se refieren, pueden mencionarse el de temperatura, cuantificación precisa de la cantidad de enzima presente y el uso de otros solventes, que garanticen o prolonguen la homogeneidad y estabilidad del sistema.

Para efectos de comparación con otras técnicas es necesario estandarizar el uso de portamuestras, es decir, uno cilíndrico de borosilicato ó cuarzo usado en SALS, daría más sentido a que los resultados obtenidos con las técnicas de SLS/DLS y SALS puedan compararse.

El uso de una mesa de laboratorio con control de estabilidad (absorción de vibraciones mecánicas) aseguraría en mayor medida que el sistema no se modifique por perturbaciones externas. La alineación del arreglo se lograría con mayor precisión montando los elementos en un riel con control micrométrico de distancias.

El arreglo de placas paralelas para experimentos de transmisión de luz puede mejorar en precisión de datos obtenidos haciendo uso de una fuente con control de intensidad y mejorando el portamuestras en los siguientes aspectos: que sea desmontable para superar las condiciones de limpieza existentes, así como que la separación de las placas sea controlable.

Con el fin de que puedan efectuarse repeticiones de experimentos de transmisión, es necesario un dispositivo mecánico de homogenización, el cual permitiría reproducir las condiciones iniciales del sistema.

Apéndice A

Protocolo de limpieza para portamuestras de vidrio (cuarzo suprasil y/o borosilicato)

Método I

Para portamuestras de cuarzo suprasil:

- 1.- Enjuagar con agua corriente los portamuestras.
- 2.- Precalentar en horno los portamuestras a 50-60 °C.
- 3.- En una dilución de hellmanex II (al 2% en volumen con agua ultrapura) a 50-60 °C, sumergir los portamuestras por un tiempo de 10-15 minutos.
- 4.- Enjuagar de 10 a 20 veces los portamuestras con agua ultrapura.
5. Enjuagar con etanol.
- 6.- Introducir los portamuestras en el horno (previamente limpio y calibrado) a 60 °C por 1 hora. La colocación de los portamuestras debe ser en gradilla de metal con la boca de los tubos hacia arriba).

Para portamuestras de borosilicato u otro tipo de vidrio:

- 1.- Enjuagar con agua corriente los portamuestras.
- 2.- Precalentar en horno los portamuestras a 25-30 °C.
- 3.- En una dilución de hellmanex II (al 2% en volumen con agua ultrapura) a 25-30 °C, sumergir los portamuestras por un tiempo de 20-180 minutos.
- 4.- Enjuagar de 10 a 20 veces los portamuestras con agua ultrapura.
5. Enjuagar con etanol.
- 6.- Introducir los portamuestras en el horno (previamente limpio y calibrado) a 60 °C por 1 hora. La colocación de los portamuestras debe ser en gradilla de metal con la boca de los tubos hacia arriba).

Método II

portamuestras de borosilicato u otro tipo de vidrio:

- 1.- Enjuagar con agua corriente los portamuestras.
- 2.- Remojo y agitación manual del portamuestras con dilución de agua-alconox (10 gramos por litro en agua tibia a $t < 55\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- 3.- Enjuagar con agua ultrapura los portamuestras.
- 4.- Enjuagar con etanol.
- 5.- Introducir los portamuestras en el horno (previamente limpio y calibrado) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. La colocación de los portamuestras debe ser en gradilla de metal con la boca de los tubos hacia arriba).

Apéndice B

Desarrollo en serie de Taylor del factor de forma $P(k)$

El factor de forma $P(k)$, definido por la ec. (15) puede escribirse en términos de los índices de refracción como

$$P(k) = \left[\frac{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} \frac{\sin(kr)}{kr} dr}{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr} \right]^2$$

donde n_p y n_f son los índices de refracción de las partículas y solvente, respectivamente.

El desarrollo en serie de Taylor de una función $f(x)$ alrededor de un punto x_0 es

$$f(x) = f(x_0) + \frac{1}{1!} f'(x_0)(x - x_0) + \frac{1}{2!} f''(x_0)(x - x_0)^2 + \dots + \frac{1}{n!} f^{(n)}(x_0)(x - x_0)^n + \dots$$

de manera que para desarrollar el factor de forma en serie, alrededor de $kr = 0$ debemos calcular las derivadas de la función y evaluarlas en $kr = 0$.

Tenemos entonces

$$P(0) = \left[\frac{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} \lim_{kr \rightarrow 0} \frac{\sin(kr)}{kr} dr}{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr} \right]^2 = 1$$

La primera derivada de $P(k)$

$$P'(k) = 2 \left[\frac{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} \frac{d}{d(kr)} \left(\frac{\sin(kr)}{kr} \right) dr}{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr} \right] = 2 \left[\frac{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} \left(\frac{\cos(kr)}{kr} - \frac{\sin(kr)}{(kr)^2} \right) dr}{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr} \right]$$

y como

$$\lim_{kr \rightarrow 0} \frac{\cos(kr)}{kr} = \lim_{kr \rightarrow 0} \frac{-\sin(kr)}{1} = 0$$

y

$$\lim_{kr \rightarrow 0} \frac{-\sin(kr)}{(kr)^2} = -\frac{1}{2} \lim_{kr \rightarrow 0} \frac{\cos(kr)}{kr} = 0$$

tenemos

$$P'(0) = 0$$

Calculamos ahora $P''(k)$

$$P''(k) = 2 \left[\frac{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} \frac{d}{d(kr)} \left(\frac{\cos(kr)}{kr} - \frac{\sin(kr)}{(kr)^2} \right) dr}{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr} \right]$$

$$= 2 \left[\frac{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} \left(-\frac{\sin(kr)}{kr} - 2 \frac{\cos(kr)}{(kr)^2} - 2 \frac{\sin(kr)}{(kr)^3} \right) dr}{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr} \right]$$

al tomar el límite $kr \rightarrow 0$,

$$P''(0) = -\frac{2}{3}$$

Con esto, el desarrollo de Taylor de $P(k)$ lo escribimos como

$$P(k) = 1 - \frac{1}{2!} \left(\frac{2}{3} \right) \left[\frac{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} (kr)^2 dr}{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr} \right] + \dots$$

definiendo el radio de giro como

$$R_g \equiv \left[\frac{\int_0^a r^4 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr}{\int_0^a r^2 \frac{n_p(r) - n_f}{n_f} dr} \right]^{1/2}$$

Se obtiene finalmente la forma

$$P(k) = 1 - \frac{1}{3} k^2 R_g^2 + \dots$$

Referencias

1. Rodríguez, Ericka., *Manual de practicas para laboratorio de Biofísica., Propuesta de.* 2005.
2. Zime Bu, A.P., Gerald E. Johnson, Gerald Olack, Donald Engleman and Harold and Harold Wyckoff, *A Small Angle X-Ray Scattering Apparatus for Studying Biological Macromolecules in Solution.* Journal of Applied Crystallography, 1998. **31**: p. 533-543.
3. Sun, Y., *Size Information Obtained Using Static Light Scattering Technique.* 2004.
4. Sylvia Radosta, M.H., and Waltraud Vorweg, *Characteristics of Amylose and Starch in Dymethyl Sulfoxide.* Biomacromolecules, 2001. **2**: p. 970-978.
5. Lim, S.Y.a.S.-T., *Molecular Characterization of Corn Starch Using an Aqueous HPSEC-MALLS-RI System Under Various Dissolution and Analytical Conditions.* Cereal Chemistry, 2000. **77**(3): p. 303-308.
6. Marshall Fishman, L.R.a.H.K.C., *Molar Masses and Sizes of Starches by High-Performance Size-Exclusion Chromatography with On-Line Multi-Angle Laser Light Scattering Detection.* J. Agric. Food Chem., 1996. **44**: p. 3182-3188.
7. Bohinsky, Robert C., *Bioquímica. Addison Wesley Iberoamericana (1987)*
8. Lehninger, Albert L. *Biochemistry Worth Publishers, Inc. (1975).*
9. RF. Tester, J.K.a.X.Q., *Starch structure and digestibility Enzyme-Substrate relationship.* World's Poultry Science Journal, 2004. **60**: p. 186-195.
10. <http://es.wikipedia.org/wiki/Almid%C3%B3n>. Almidón. [cited.
11. Ackerson, B.J., *Lectures Notes.Selected Topics in Static and Dynamic Light Scattering (1986)*
12. Aleksey Iomakin, D.B.T., and George B. Benedek, *Chapter 10 Quasielastic Light Scattering for Protein Assembly Studies, 153-174.* Methods in Molecular Biology Amyloid Proteins: Methods and Protocols vol. 299
13. Dohnt, Jan K.G. *An Introduction to Dynamics of Colloids.* Elsevier Science B. V. (1996)
14. B.J. Berne, R. Pecora,, *Dynamic Light Scattering, Applications of Photon Correlation Spectroscopy, Plenum Press, New York, 1985.*
15. Stuhrmann, H.B., *Solution Scattering, an Overview, in EMBO Practical Course on Solution Scattering from Biological Macromolecules.* 2001.
16. *Manual ALV.*

17. Zimm, B.H., *The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions*. The Journal of Chemical Physics, 1948. **16**(12): p. 1093-1099.
18. http://es.wikipedia.org/wiki/Ley_de_Beer-Lambert. *Ley de Beer-Lambert*. [cited.
19. <http://food.oregonstate.edu/starch/lecture.html>, *Factors Affecting Starch Paste and Gel Strength*.