

**Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada**



**DAÑO CAUSADO A LIPOSOMAS TENIDOS  
POR EXPOSICION DE LUZ LASER**

**TESIS  
MAESTRIA EN CIENCIAS**

**MARTHA OFELIA RIVERA HERNANDEZ**

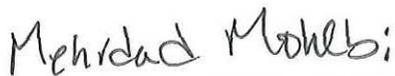
Ensenada, Baja California, Mexico. Junio de 1998.

TESIS DEFENDIDA POR  
MARTHA OFELIA RIVERA HERNÁNDEZ  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE



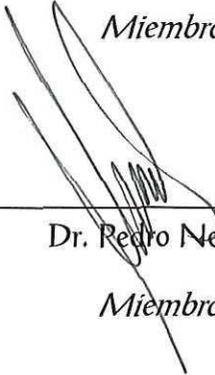
Dra. Nooshin Jamasbi Jahromi

*Director del Comité*



Dr. Mehrdad Mohebi Aftahi

*Miembro del Comité*



Dr. Pedro Negrete Regagnon

*Miembro del Comité*



Dra. Elena Tchaikina Kolesnikova

*Miembro del Comité*



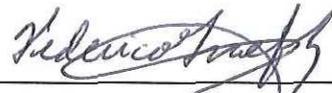
Dr. José Valenzuela Benavides

*Miembro del Comité*



Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez

*Jefe del Departamento de Optica*



Dr. Federico Graef Ziehl

*Director de Estudios de Posgrado*

30 de junio de 1998

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE  
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA



División de Física Aplicada  
Departamento de Optica

**DAÑO CAUSADO A LIPOSOMAS TEÑIDOS POR  
EXPOSICION DE LUZ LASER**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener  
el grado de MAESTRO EN CIENCIAS presenta:

MARTHA OFELIA RIVERA HERNANDEZ

Ensenada, Baja California, México. 30 de Junio de 1998.

RESUMEN de la tesis de MARTHA OFELIA RIVERA HERNANDEZ, presentada en el CENTRO DE ESTUDIOS DE EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS en OPTICA. Ensenada, Baja California, México. 30 de Junio de 1998.

## DAÑO CAUSADO A LIPOSOMAS TEÑIDOS POR EXPOSICION DE LUZ LASER

Resumen aprobado por:



Dra. Nooshin Jamasbi Jahromi.  
Directora de tesis.

En éste trabajo se ha estudiado el efecto que causa la radiación láser sobre liposomas. Estas estructuras son un modelo de las membranas que protegen las células vivas, debido a que tienen características similares en comportamiento y estructura. Por ello es posible asociar los efectos que causa la radiación láser en muestras de liposomas, a los efectos en biomembranas. El trabajo consiste básicamente en preparar liposomas en forma rutinaria y teñirlos con una tintura altamente absorbente a la longitud de onda láser, con el objeto de aumentar el calor localizado al momento de radiarlos a una potencia específica del láser que cause la ruptura de las membranas. Finalmente este daño se detecta por la técnica de correlación de fotones.

Palabras clave: liposomas, membranas celulares, tinturas, daño por exposición de luz láser, correlación de fotones

ABSTRACT of the thesis of MARTHA OFELIA RIVERA HERNANDEZ, submitted to CENTRO DE ESTUDIOS DE EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA in partial fulfillment of the requirements to obtain the MASTER IN SCIENCES degree in OPTICS. Ensenada, Baja California, México, 30<sup>th</sup> June 1998.

## LASER-INDUCED DAMAGE TO STAINED LIPOSOMES

Abstract approved by:



Dra. Noshin Jamasbi Jahromi.  
Tesis adviser

In this work we have studied the damaging effect of laser light on cell membrane using single bilayer liposomes as model systems. Liposomes, because of their structural similarities to membrane of biological cells, are the best model system used for the investigation of the effect of laser radiation on membranes. Samples of liposomes were routinely prepared and stained in our laboratory. For efficient localized heating of the membrane by laser light, we stained liposomes with a membrane dye with strong absorption at a laser wavelength. Irradiated by the laser beam, the membrane breakdown occurred at a particular laser power for samples of stained liposomes. The laser-induced damage was detected using photon correlation technique. The power threshold for this damage was measured.

Key words: liposomes, cell membrane, membrane dyes, laser-induced damage, photon correlation technique.

Con todo mi amor  
a Jaime

A mis padres Moisés y Ofelia  
y mis hermanos: Moy, Mario, Ceci y Gonzalo

A los seres que están siempre presentes en mi memoria

## AGRADECIMIENTOS

A los doctores **Nooshin Jamasbi** y **Merhdad Mohebi** por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo y por su inapreciable amistad y confianza.

Al Dr. **José Valenzuela** por la ayuda brindada al inicio del proyecto y sus aportaciones al escrito.

A los doctores **Elena Tchaikina** y **Pedro Negrete** por sus observaciones y correcciones al escrito.

A **Carolina Amador**, **Ofelia Pardo**, **Rosy Rodríguez** y **Marcia Padilla** por su gran disponibilidad, amistad y grata compañía.

A **Maria Luisa Argote**, **Anita Hirales**, **Margarita Jauregui**, **Ivon Best** y **Citlali Romero** por brindar siempre la ayuda necesaria.

A las chicas de la biblioteca: **Blanca Muñoz**, **Cecilia González** y **Lupita Morales** por su valiosa ayuda.

A **Miguel García**, **René Torres**, **Carlos Carballo**, **Javier Dávalos**, **Javier López de los Ríos**, **Miguel Farfán**, **Juan Peralta** y **Don Nieto** por su valioso apoyo técnico.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada** por otorgar el privilegio de pertenecer a ésta institución.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo otorgado.

## AGRADECIMIENTOS

A mi esposo **Jaime** por su infinito amor y comprensión a tantas horas de ausencia.

A **Gladys Paéz** por compartir aquellas noches interminables de estudio durante nuestra estancia en el CICESE y por su amistad.

A mis compañeros de no-generación **Néstor Valles, Salomé Canepa, Pablo Loza, Victor Coello, Rodolfo Cortéz y Amparo Rodríguez** por su amistad y por compartir aquellos gratos momentos en la maldita vecindad.

A mis compañeros de cubo **Juan Carlos Martínez, Manuel May y Julio Rodríguez** por su agradable compañía.

A **maestros, amigos y compañeros**, testigos de éxitos y fracasos.

# CONTENIDO

	Página
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
I.1    Introducción.....	1
I.2    Objetivos.....	4
I.3    Estructura de la tesis.....	4
<b>II. AGREGADOS MOLECULARES: MICELAS Y LIPOSOMAS</b>	<b>6</b>
II.1    Antecedentes.....	7
II.2    Importancia de los liposomas unilaminares.....	8
II.3    Estructura de la molécula lípida phosphatydil-choline.....	9
II.4    Fuerzas que permiten la estabilidad de micelas y liposomas.....	11
II.5    Técnica de preparación de liposomas unilaminares teñidos con moléculas colorantes.....	14
II.5.1    Características de los reactivos.....	14
II.5.2    Preparación de la solución buffer.....	16
II.5.3    Preparación del colorante para teñir liposomas.....	16
II.5.4    Preparación de la muestra para el experimento.....	17
II.5.5    Coloración de los liposomas unilaminares.....	19
<b>III. MEDICION DEL TAMAÑO DE LIPOSOMAS POR LA TECNICA DE CORRELACION DE FOTONES</b>	<b>23</b>
III.1    Introducción.....	23
III.2    Ecuaciones que determinan el tamaño de partículas esféricas.....	25

<b>IV. EXPERIMENTO</b>	32
IV.1 Arreglo experimental.....	33
IV.2 Selección de parámetros.....	36
<b>V. RESULTADOS</b>	38
V.1 Calibración del sistema .....	39
V.2 Medición del tamaño de los liposomas.....	41
V.3 Resultados experimentales de daño.....	43
V.3.1 Daño químico.....	43
V.3.2 Daño por exposición de luz láser.....	45
V.4 Medición indirecta de la temperatura en una muestra radiada.....	47
V.5 Resumen de resultados.....	48
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	52
<b>LITERATURA CITADA</b>	54
<b>APENDICE A</b>	57
A.1 Teoría de esparcimiento de luz.....	57
A.2 Esparcimiento Rayleigh.....	67
<b>APENDICE B</b>	72
B.1 Proceso de correlación digital.....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1	Estructura molecular de la molécula lípida phosphatidyl-choline.....10
2	Sección transversal de una micela.....11
3	Estructura de un liposoma unilaminar.....12
4	Liposomas unilaminares de phosphatidyl-choline Fotografía tomada del artículo de [Zumbuehl y Weder, 1981].....13
5	Sistema de diálisis.....19
6	Absorbancia de una solución de oxanol VI.....21
7	Absorbancia de una muestra de liposomas teñidos con oxanol VI.....22
8	Diagrama del vector de esparcimiento.....25
9	Curva de correlación: $g^{(2)}(\tau)$ .....31
10	Arreglo experimental utilizado en la técnica correlación de fotones .....34
11	Detección de la imagen del punto $P_1$ .....35
12	Curva de autocorrelación de fotones de esferas de polietileno de tamaño conocido.....40
13	Función de autocorrelación de fotones de una muestra de liposomas.....42
14	Curvas de autocorrelación experimentales y ajustadas de: (a) lipo- somas y (b ) liposomas dañados químicamente con metanol.....44
15	Curvas de experimentales y ajustadas de fotones: (a) liposomas teñidos y (b) liposomas teñidos expuestos a luz láser (120 mW).....46
16	Volumen de esparcimiento.....62
17	Esfera Gaussiana.....68

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
18 Este esquema muestra el proceso digital de correlación de fotones. El proceso inicia con el esparcimiento de luz de una muestra iluminada. La señal esparcida se colecta a un ángulo $\theta$ en un sistema de detección formado por un fotomultiplicador; PMT, un amplificador; AMP y un discriminador de señales; DISC. Los fotones contados $n(t_i)$ en el intervalo de tiempo de muestra ( $\Delta t \equiv T$ ) al tiempo $t_i$ . La correlación se lleva a cabo multiplicando los fotones de los diferentes intervalos $n(t_i), n(t_i - \Delta t), \dots$	74

# DAÑO CAUSADO A LIPOSOMAS TEÑIDOS POR EXPOSICION DE LUZ LASER

## Capítulo I

### INTRODUCCION

#### I.1 Introducción

Las membranas que protegen las células biológicas han sido objeto de estudio en diversas áreas. Son importantes porque se comportan como un filtro altamente selectivo de iones, permitiendo llevar a cabo procesos fisicoquímicos de biosíntesis. Algún defecto o rompimiento de esta estructura es catastrófico para la funcionalidad de la célula. Actualmente los liposomas formados de moléculas lípidas son ampliamente aceptados como el mejor modelo de esta biomembrana protectora, [Knight, 1981; Shibata-Seki *et al.*, 1996; Jamasbi *et al.*, 1996]. Su uso en pruebas de laboratorio comprueban que existe más ventajas al trabajar con ellas que con membranas biológicas, debido a que son sistemas menos complejos y fácilmente manipulables. Además, su preparación en laboratorio es relativamente fácil.

A pesar de la importancia que tienen las membranas, existen muy pocos estudios que relacionan el efecto que tiene la exposición de luz coherente sobre biomembranas y

liposomas a nivel molecular. Estos estudios de irradiación láser permiten entender las modificaciones causadas por una exposición selectiva y controlada. En estudios previos se ha demostrado la posibilidad de destruir estas membranas cuando se les expone a luz láser pulsada. Estos estudios combinan liposomas con altas concentraciones de moléculas colorantes altamente absorbentes a la luz, las cuales se filtran hacia el espacio libre interno de los liposomas [Vander *et al.*, 1993, Khoobehi *et al.*, 1990]. En este trabajo se muestra la posibilidad de que las membranas se rompan por excitación de las moléculas colorantes adheridas a su arreglo bimolecular, cuando se les expone a un haz de luz láser de onda continua. También se mencionan las ventajas de trabajar con pequeñas concentraciones de moléculas colorantes y controlar bajas potencias de exposición de luz láser. Esencialmente se trabaja con liposomas teñidos, con moléculas que presentan un pico de máxima absorción muy cercano a la longitud de onda láser radiada. Estas moléculas forman una unión estable y fuerte que les permite permanecer unidas a las moléculas lípidas de la membrana. Controlando con un atenuador la potencia de luz enfocada a la muestra se causa la ruptura de la membrana, a una potencia específica. Esto resulta como consecuencia de la excitación térmica y se manifiesta como un cambio en el tamaño de las partículas suspendidas. Finalmente estos cambios son detectados con un correlador digital de fotones.

La correlación de fotones es una técnica rápida, exacta y no intrusiva que permite obtener el tamaño de partículas esféricas suspendidas a partir de su coeficiente de difusión [Schulz-DuBois, 1983]. Es especialmente útil para detectar o monitorear alteraciones en el tamaño de partículas debidas a reacciones químicas, estados de agregación, etc. Su principio se basa en analizar fluctuaciones de intensidad promedio de luz esparcida,

causadas por movimientos aleatorios de pequeñas partículas suspendidas en un medio acuoso. La señal fluctuante detectada se procesa como una función de autocorrelación  $g^{(2)}(\tau)$ , la cual describe un comportamiento exponencial decayente:

$$g^{(2)}(\tau) \propto e^{-2k^2 D \tau}, \quad (1)$$

donde la cantidad  $2Dk^2$  representa el tiempo de decaimiento de la función exponencial (también llamado tiempo de correlación de la función). El parámetro  $D$  es el coeficiente de difusión y  $k$  es la magnitud del vector de onda del esparcimiento, cuyo valor depende del ángulo de esparcimiento  $\theta$ , del índice de refracción del líquido  $n$ , y de la longitud de onda de la luz láser incidente  $\lambda_i$ . Este último parámetro está dada por la siguiente expresión

$$k = \left( \frac{4\pi n}{\lambda_i} \right) \text{sen} \left( \frac{\theta}{2} \right), \quad (2)$$

donde el coeficiente de difusión  $D$  para partículas esféricas es:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d}, \quad (3)$$

y donde  $k_B$  es la constante de Boltzman,  $T$  la temperatura,  $\eta$  la viscosidad del medio

líquido y  $d$  el diámetro de partícula. Estas ecuaciones se explicaran con más detalle en el capítulo III.

## **II.2 Objetivos**

- Utilizar la técnica de diálisis para preparar muestras de liposomas unilaminares.
- Teñir los liposomas con una tintura especial para membranas.
- Detectar el efecto que causa la radiación de luz láser en muestras de liposomas teñidos con una tintura de alta absorción a la longitud de onda láser.
- Detectar el daño causado, como resultado de la excitación térmica de las moléculas de tintura, usando la técnica de correlación de fotones.

## **I.3 Estructura de la tesis**

En el capítulo II se menciona la importancia que tienen los liposomas como modelo de biomembranas y la importancia de caracterizarlos por métodos confiables. Se mencionan también las características de la molécula lípida phosphatidyl-choline y de su capacidad para formar liposomas unilaminares de estructura bimolecular. La segunda parte del capítulo describe a detalle la técnica de diálisis que se utilizó para obtener este tipo de membranas. En el capítulo III se describe la teoría de correlación de fotones. En el capítulo IV se describe el arreglo experimental, el procedimiento de las mediciones y se mencionan

los parámetros usados. En el capítulo V se muestran los resultados experimentales más relevantes y su ajuste a una curva exponencial. Estos resultados incluyen curvas de liposomas dañados químicamente y por exposición de luz láser. Finalmente en el capítulo VI se dan las conclusiones del trabajo.

## Capítulo II

### AGREGADOS MOLECULARES: MICELAS Y LIPOSOMAS

Existen dos factores importantes que determinan la forma y estructura de los agregados moleculares: micelas y liposomas. El primero de ellos se debe a fuerzas débiles de tipo electrostático e hidrofóbico que interactúan entre moléculas lípidas. El segundo factor se debe al tipo de molécula lípida usada y a la manipulación de la técnica de preparación (control sobre las concentraciones electrolíticas, el pH de la solución, la temperatura, etc.) que permite la estabilidad de una estructura coloidal u otra. En éste capítulo se mencionan específicamente las características de la molécula fosfolípida más importante que conforma las membranas celulares y se mencionan los dos tipos de agregados moleculares que pueden formar en medio líquido: micelas y liposomas. De manera especial se menciona la importancia y características de los liposomas unilaminares de phosphatidyl-choline y su método de preparación.

## II.1 Antecedentes

Con apoyo de la técnica de monocapa de Langmuir, el modelo de membrana unilaminar fue propuesto en el año 1925 por Gorter y Grendel. En 1935 Danielli y Davison propusieron el modelo teórico de la membrana compuesta por lípidos en arreglos bimoleculares. En los inicios, las pruebas para obtener lípidos en arreglos bimoleculares en forma estable fueron poco fructíferos, pero mucho se aprendió de las propiedades de los lípidos y de las interacciones lipo-proteicas [Burton, 1968, Schwendener *et al.*, 1981]. En el año de 1960 los conocimientos de las propiedades de lípidos bimoleculares era un poco más amplia y, en 1961 Rudin *et al.* reportaron la constitución y propiedades eléctricas de una membrana bimolecular de lípidos, extraída del cerebro de un bovino, que media entre 6 y 9 nm de espesor.

Actualmente se estudian por diferentes métodos físicos las propiedades de membranas sintéticas bimoleculares y se caracterizan por su tamaño, composición y laminaridad. Los liposomas multilaminares, estudiados inicialmente por Baghman *et al.* [Ostro, 1983], están formados por múltiples esferas concéntricas bimoleculares de lípidos. Los liposomas unilaminares están formados de una sola esfera bimolecular de lípidos que miden entre 25 y 500 nm de diámetro. La obtención de una estructura u otra depende del tipo de molécula lípida que se utilice y el método de preparación. En ambos casos es posible prepararlas en el laboratorio, bajo condiciones controladas.

## II.2 Importancia de los liposomas unilaminares

Las células son la unidad fundamental de vida y, combinadas forman tejidos y órganos de todo organismo vivo. En ellas se llevan a cabo funciones físicas y fisicoquímicas importantes de biosíntesis, metabolismo químico, almacenamiento, transformación, regulación y transporte de iones y moléculas, etc. Todas las células biológicas están limitadas por una membrana bimolecular de lípidos, llamada biomembrana, la cual se comporta como un filtro altamente selectivo de iones y moléculas que mantienen una diferencia de potencial entre sus componentes y el medio que le rodea. El arreglo bimolecular de lípidos sirve como barrera semipermeable al flujo de moléculas solubles en agua y para ensamblar moléculas proteicas, unidas por interacciones no covalentes, que sirven para catalizar reacciones asociadas. Esto significa que las moléculas lípidas son el componente principal de las membranas celulares y que, aunque varíen de un tipo de membrana a otro, su estructura básica y funcionalidad son comunes en términos generales a todas las biomembranas. Actualmente las biomembranas son tema de estudio en diversas áreas de investigación científica tales como: física, biología, biofísica, medicina y farmacología. De ello deriva, el interés de producir membranas sintéticas que tengan características muy semejantes. Hoy en día existen métodos que sintetizan membranas bimoleculares de estructura unilaminar y multilaminar, de moléculas lípidas, llamados "liposomas". Estas estructuras son especialmente útiles por dos razones:

- es posible utilizar su compartimiento libre para transportar y liberar droga a zonas específicas del cuerpo.

- y porque son un modelo simple que permite entender complejos mecanismos de membranas celulares.

Por su simplicidad, los liposomas unilaminares son universalmente aceptados como el mejor modelo para estudiar las propiedades físicas y fisicoquímicas de las membranas celulares [Gregoriadis, 1984; Ostro, 1983; Knight, 1981]. Este es el modelo que se describe a detalle en la siguiente sección.

### **II.3 Estructura de la molécula lípida phosphatidyl-choline**

Existe un grupo muy importante de fosfolípidos extraídos de lecitina de yema de huevo, conocidas químicamente como phosphatidyl-choline. Estas moléculas forman la estructura básica de las membranas celulares de todos los vegetales y animales y por ello es común usarlas para preparar membranas sintéticas que simulen perfectamente su comportamiento. Las lecitinas son moléculas amifáticas neutras formadas por un grupo polar hidrofílico “cabeza” y un grupo no polar hidrofóbico “cola” de cadenas carbonadas [Mimms *et al.*, 1981; Zumbuehl, 1981; Chen, 1976; Gahwiller, 1980]. La figura 1 muestra la estructura molecular de la molécula phosphatidyl-choline.

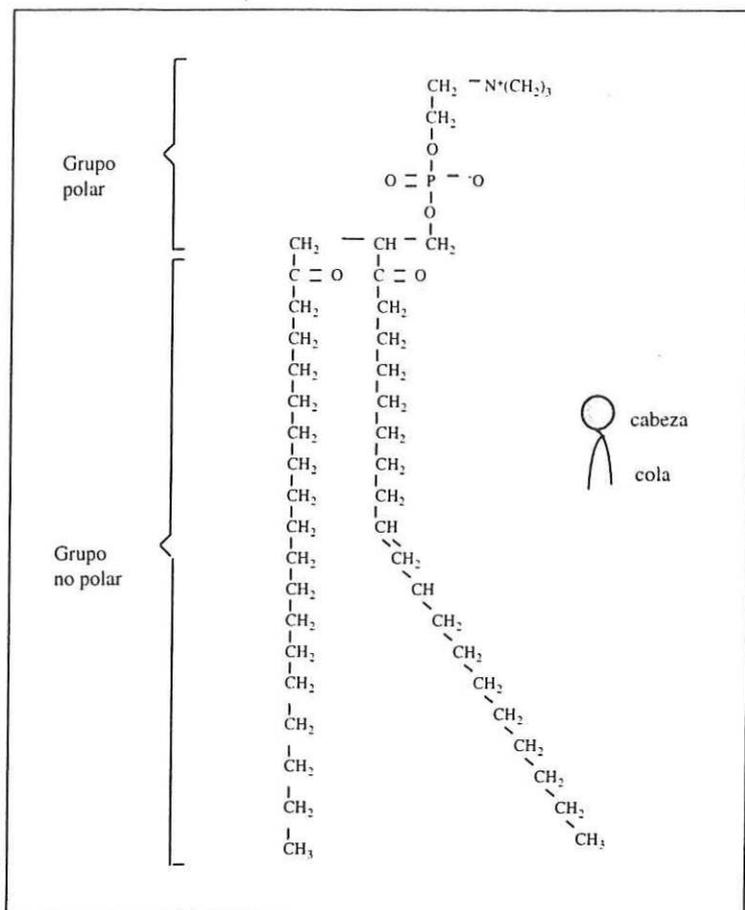


Figura 1. Estructura molecular de la molécula lípida phosphatidil-choline

Bajo factores importantes que definen la dinámica y estructura en un medio acuoso, estas moléculas se empaquetan en arreglos bimoleculares formando esferas unilaminares. Su temperatura de transición de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  determina los cambios de transición termotrópica entre una estructura coloidal u otra. Esta temperatura es la mínima que se requiere para que las moléculas de agua se difundan dentro de una estructura coloidal. A temperaturas más bajas que la temperatura de transición, las cadenas hidrocarbonadas se encuentran ordenadas en paquetes bimoleculares formando un estado llamado gel, mientras que a

temperaturas mayores que la temperatura de transición las moléculas que se encuentran en estructura laminar se fragmentan y se dispersan formando un fluido.

#### II.4 Fuerzas que permiten la estabilidad de micelas y liposomas

Las moléculas lípidas no permanecen de manera individual cuando se les disgrega en medio acuoso, sino que se integran formando agregados llamados micelas. En esta estructura, los grupos hidrofílicos altamente polares se orientan para interactuar con moléculas de agua, y los grupos hidrofóbicos no polares, se orientan para interactuar entre sí, como se muestra la figura 2.

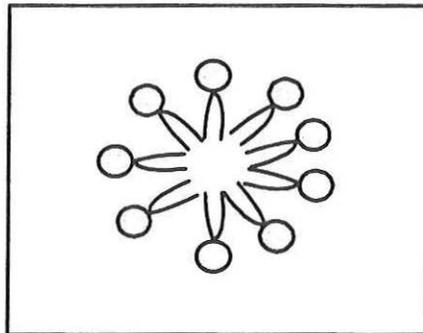


Figura 2. Sección transversal de una micela.

Las micelas tienden a solubilizarse y formar nuevas estructuras cuando existe algún elemento que interrumpa su estabilidad. Si se cambia la concentración de la molécula lípida, o se adiciona algún tipo de molécula (iónica o no iónica) que permita la formación a una nueva estructura o bien, se cambien las condiciones del medio como pH y temperatura,

la organización de los lípidos puede transformarse de una organización micelar a una organización bimolecular lineal o bimolecular esférica. En condiciones de laboratorio se debe tener especial control de todos éstos parámetros, ya que de no tenerlos, se evoluciona hacia una estructura indeseable. Los detergentes al igual que los lípidos también son moléculas amifáticas iónicas y/o no iónicas que permiten la evolución de micelas a liposomas. La figura 3 muestra la estructura de un liposoma unilaminar.

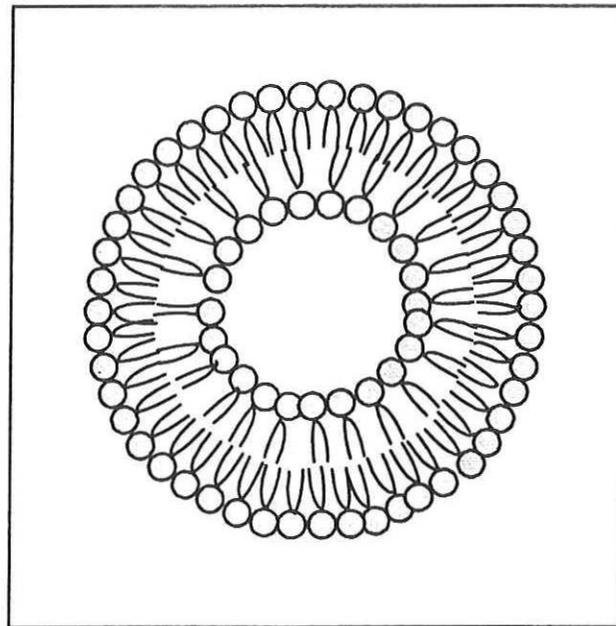


Figura 3. Estructura de un liposoma unilaminar

Las fuerzas que mantienen unidas a micelas y liposomas son principalmente interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals. Las fuerzas de van der Waals son fuerzas atractivas entre átomos y moléculas que actúan a distancias cortas (del orden de diámetros atómicos). Las interacciones hidrofóbicas también son fuerzas atractivas que

unen las cadenas carbonadas, no polares, de las moléculas lípidas. También existen otro tipo de fuerzas repulsivas de origen electrostático entre cabezas polares y fuerzas atractivas intermoleculares dadas por interacciones ion-dipolo y dipolo-dipolo [Manku, 1988].

La ventaja de trabajar con membranas de fosfolípidos puros radica en que las moléculas lípidas de una estructura coloidal bimolecular, no migran de una cara a otra, como sucede en una membrana natural, sino que rotan libremente alrededor de las cadenas hidrocarbonadas y se mueven lateralmente. La distancia de equilibrio entre grupos polares de un liposomas obtenido de lecitina pura, es de 3.7 nm [Mimms *et al.*, 1981].

La figura 4 muestra la forma y tamaño de liposomas unilaminares de phosphatidylcholine congelados y cubiertos con un complejo de oro (Interferron, 2.5 mg de oro/ml), observados a través de un microscopio electrónico.

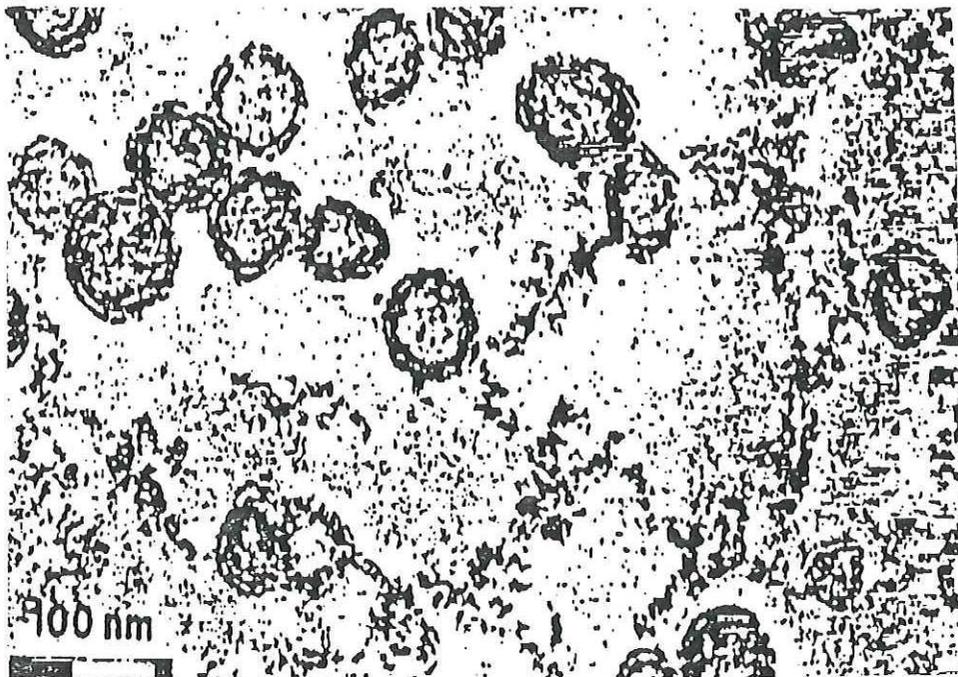


Figura 4. Liposomas unilaminares de phosphatidyl-choline. Fotografía tomada del artículo de [Zumbuehl y Weder, 1981].

En la siguiente sección se describe la técnica de preparación para obtener liposomas de PC.

## **II.5 Técnica de preparación de liposomas unilaminares teñidos con moléculas colorantes.**

Existe un gran variedad de métodos para preparar liposomas unilaminares [Gregoriadis, 1984, Lasic, 1995]. La técnica que se utilizó en este experimento consiste en remover un detergente de una solución micelar, por diálisis, a una temperatura mayor que la temperatura de transición del lípido. Esta técnica estándar permite producir liposomas estables de tamaño uniforme. Controlando factores importantes como: el tipo de detergente, el tipo de lípidos, la relación molar lípido/detergente, la temperatura y el pH, se pueden obtener liposomas con diámetros controlados entre 25 y 500 nm. En nuestro caso se obtuvieron liposomas unilaminares con un diámetro entre 150 y 160 nm. A continuación se describen las características de los reactivos usados y el proceso de preparación de los liposomas unilaminares.

### **II.5.1 Características de los reactivos**

- El lípido L- $\alpha$ -phosphatidyl-choline, de peso molecular igual a 760.09 umas, comprado a los laboratorio Avanti polar lipids, Inc. (80051 Alabaster Alabama, USA), se presenta en ampolletas que contienen 15 mg de L- $\alpha$ -phosphatidyl-choline disueltos en 1 ml de

etanol, los cuales deben ser refrigerados a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta antes de su uso. El etanol es un solvente que tiene la característica de ser fácilmente evaporado en vacío, gracias a su bajo punto de ebullición.

- El detergente n-octyl  $\beta$ -D-gluco-pyranoside, comprado a los laboratorios Sigma Chemicals Co. (Saint. Luis Mo. USA), debe ser almacenado a  $-10^{\circ}\text{C}$ , hasta antes de su uso. Este detergente no iónico tienen dos características importantes que permiten su fácil remoción una vez que ha contribuido a la formación de liposomas: posee alta concentración micelar crítica (CMC) y bajo número de agregación [Allen *et al.*, 1980, Rhoden, 1979]. La CMC es la concentración a la cual existen agregados coloidales estables, y el número de agregación es un parámetro que determina la cantidad de moléculas que se pueden unir para formar una estructura coloidal (en otras palabras, determina el tamaño y peso de una estructura estable) [Banham *et al.*, 1965, Allen *et al.*, 1980].
- El oxonol VI ( $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_6$ ) de peso molecular igual a 316.36 umas fue comprado a los laboratorios Molecular Probes (Oregon, USA). Es una tintura especial para teñir membranas. Presenta máxima absorción en 600 nm de longitud de onda. Tiene muy baja solubilidad en agua y alta en solventes orgánicos. Debe ser protegido de la luz, especialmente cuando se encuentra en solución. Presenta gran afinidad por la molécula phosphatidyl-choline y una alta sensibilidad a cambios espectrales [Bashford *et al.*, 1979].
- La mezcla de las sustancias  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (fosfato y bifosfato de sodio) de alta pureza fueron compradas a los laboratorios Molecular Sigma Biology (Saint. Luis Mo.

USA). Son sustancias que deben permanecer en un lugar fresco y seco. Se usaron en la preparación de solución reguladora de pH (10 mM).

- Las membranas de celulosa de 6.3 cm de diámetro fueron compradas a los laboratorios Diachema Ag. Lab (Langnau/Zurich Switzerland). Tienen alta permeabilidad a moléculas cuyo peso molecular máximo es igual a 10000 umas. Se usaron básicamente para la dialización de las muestras. Antes de su uso fue necesario remover sus impurezas, enjuagando en agua destilada durante 5 minutos y sumergiéndolas después por 20 minutos en solución reguladora.

### **II.5.2 Preparación de la solución buffer**

La solución buffer es una mezcla de sales de fosfato de sodio;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2.3 mM y bifosfato de sodio;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7.7 mM, disueltas en agua destilada. Esta solución se prepara a un pH de 7.25 y se utiliza para dializar la muestra de liposomas

### **II.5.3 Preparación del colorante para teñir liposomas**

En la sección II.5.5 se explican los dos métodos de coloración de los liposomas, en esta sección solo se menciona a que concentración se preparó el colorante para cada uno de ellos y cómo se calculó.

Para teñir los liposomas en forma directa se preparó oxonol VI en concentración 5  $\mu\text{M}$ , y para teñir liposomas en forma indirecta se preparó oxonol VI en concentración 0.1

M. Estas concentraciones fueron calculadas mediante la ecuación;  $C = \frac{m}{PM \times V}$ , donde  $m$  representa la masa de oxonol VI, PM su peso molecular y V el volumen de solvente (en este caso metanol).

#### II.5.4 Preparación de la muestra para el experimento

Los compuestos básicos que se utilizan para preparar la muestra de liposomas son: el lípido L- $\alpha$ -phosphatidyl-choline y el detergente n-octyl $\beta$ -D-gluco-pyranoside. Este detergente tiene dos características importantes que determinan la estructura laminar de los liposomas: alta CMC y bajo número de agregación. Además su remoción de la solución detergente/fosfolípido es relativamente fácil una vez que ha contribuido a la formación de liposomas [Allen *et al.*, 1980, Schwendener *et al.*, 1981, Mimms *et al.*, 1981].

En un procedimiento típico de preparación de liposomas [Mimms *et al.*, 1981, Zumbuehl, 1981] se mezclan 15 mg de lecitina L- $\alpha$ -phosphatidyl-choline disueltos en etanol y 0.027 mg del detergente n-octyl $\beta$ -D-gluco-pyranoside. Estas cantidades nos dan una relación molar de lípido/detergente igual a 0.2/0.8, óptima para tener una solución micelar estable y homogénea. Después es necesario remover todas las trazas de solvente orgánico, evaporando la solución en vacío durante 1 o 2 horas en un evaporador rotatorio a una temperatura de 30°C. Como resultado de la evaporación queda en el fondo del recipiente una película de lípidos y detergente, que se disuelve en 1.5 ml de solución buffer, la cual se agita hasta quedar completamente clara. La solución micelar formada se inyecta al

portamembranas, donde queda en contacto con una membrana de celulosa semipermeable que permite el paso a moléculas con peso molecular menor a 10000 umas. Enseguida se coloca el portamembranas dentro de la solución buffer para iniciar la diálisis. Este proceso se lleva a cabo debido a la diferencia en concentración de ambas soluciones. La membrana semipermeable permite que las moléculas de agua se difundan libremente de la solución buffer hacia la solución micelar, ejerciendo así una presión sobre la membrana que permite la salida de las moléculas de detergente hacia la solución buffer. Este intercambio de moléculas de una solución a otra da lugar a la remoción total del detergente, necesario para la formación de liposomas.

En el extremo superior del portamembranas se coloca un motor que rota a 14 revoluciones por minuto. El nuevo sistema motor-portamembranas se colocan en posición inclinada en 1000 ml de solución buffer, de tal modo que la mitad de la celda del portamembranas quede en el interior de la solución y la mitad fuera, esto con el propósito de que pueda salir el aire que quedo en la solución micelar, como se muestra en la figura 5. Finalmente, la solución reguladora se reemplaza cada 6 u 8 horas, durante un período de 24 horas, para asegurar que los liposomas formados queden libres de detergente.

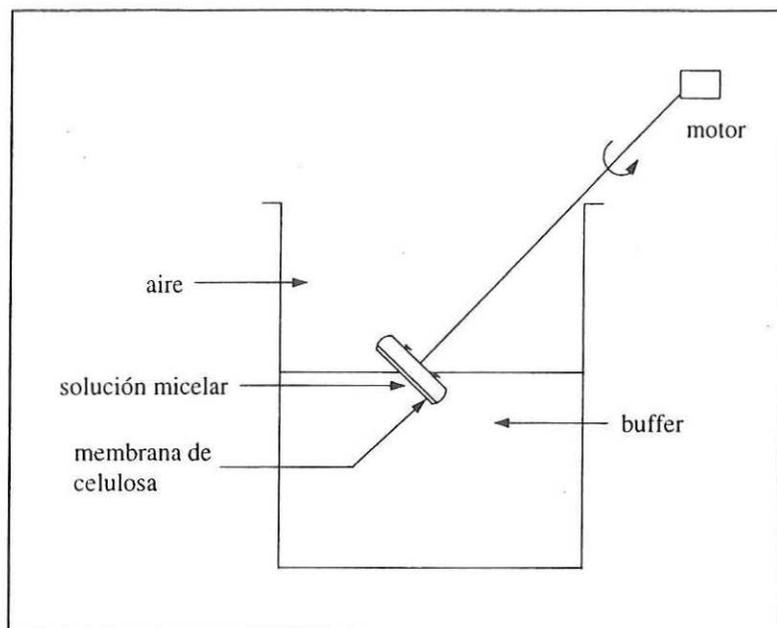


Figura 5. Sistema de diálisis

### II.5.5 Coloración de liposomas unilaminares

Una vez preparados los liposomas se deben teñir con un colorante que absorba luz a cierta longitud de onda. Este proceso se llevo a cabo de dos maneras: en forma directa y en forma indirecta. La manera directa consiste en agregar 10  $\mu\text{l}$  de oxonol VI en concentración 5  $\mu\text{M}$  a una muestra de 300  $\mu\text{l}$  de liposomas suspendidos en solución buffer (agitando previamente y esperando a que la solución estabilice por espacio de un minuto). De los resultados de la medición por correlación se demostró que esta técnica no fue la más adecuada para teñir las muestras, debido a que la polaridad del metanol destruye las estructuras coloidales formadas. Estudios previos muestran que concentraciones mayores al 1% de solvente orgánico bastan para destruir las estructuras coloidales. Por esta razón se procedió a teñir las membranas de manera indirecta. El objeto del método indirecto es lograr que las moléculas de colorante permanezcan adheridas a la membrana de los

liposomas sin que ésta se destruya. En ésta técnica se agregaron 10  $\mu$ l de oxonol VI (en concentración 0.1 M) al 1.5 ml de la mezcla micelar (formada después de la evaporación del etanol) y por diálisis se eliminó el solvente orgánico de oxonol VI junto con el detergente de la solución micelar. Durante este proceso se observó que el colorante atravesó la membrana de celulosa relativamente fácil, por ésta razón al termino de la diálisis se realizaron pruebas de transmisión para estimar su concentración final. De esta manera se verificó que solo permaneció en los liposomas el 10 % de la concentración inicial del colorante.

De acuerdo con el método de cálculo realizado por Huang y Mason [1978] se estimó que en 1.5 ml de muestra preparada, había aproximadamente  $2 \times 10^{14}$  liposomas. También se estimó que en una muestra teñida con oxonol VI permanecían una concentración final de aproximadamente 200 moléculas de colorantes en cada liposoma. Esto significa que en una membrana, por cada 300 moléculas lípidas había una molécula de oxonol VI.

La coloración de las membranas permiten absorber parte de la energía de radiación a la cual se someten. Por eso es importante conocer los espectros de absorción de la tintura y de los liposomas teñidos.

La figura 6 muestra el espectro de absorción del oxonol VI, obtenido del espectrofotómetro Perkins Elmer 300. Este espectro presenta un pico de absorción máxima en 600 nm de longitud de onda.

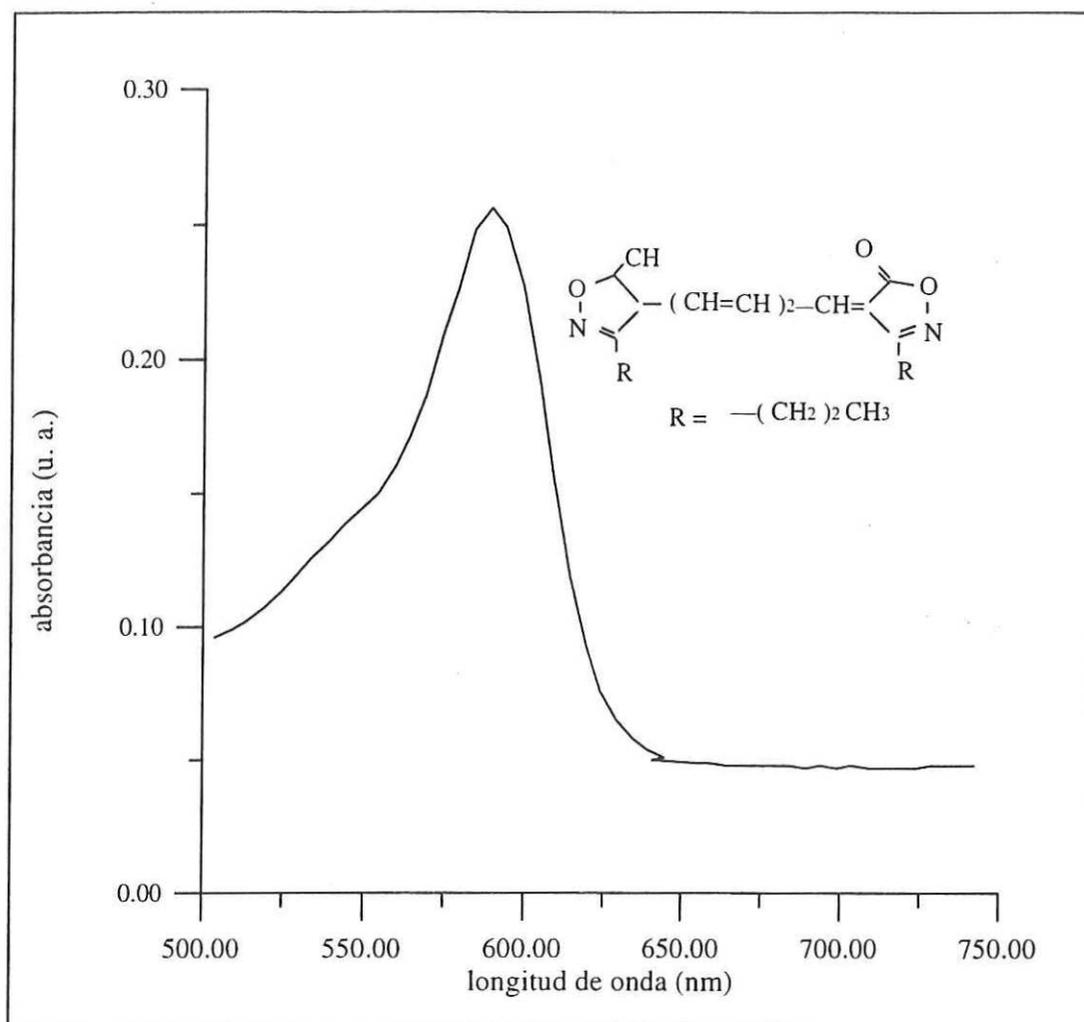


Figura 6. Absorbancia de una solución de oxonol VI

El espectro de absorción de la figura 7 corresponde a una muestra de liposomas teñidos con 300 nM de oxonol VI, obtenido del espectrofotómetro Perkins Elmer 300. Este espectro presenta en 620 nm de longitud de onda un pico de máxima absorción. Con el espectro de transmisión de la misma muestra, se obtuvo mediante la ecuación:  $T = e^{-\alpha d}$  el coeficiente de absorción  $\alpha$  igual a  $0.36 \text{ cm}^{-1}$ . En esta expresión  $T$  representa la transmitancia y  $d$  el ancho de la celda.

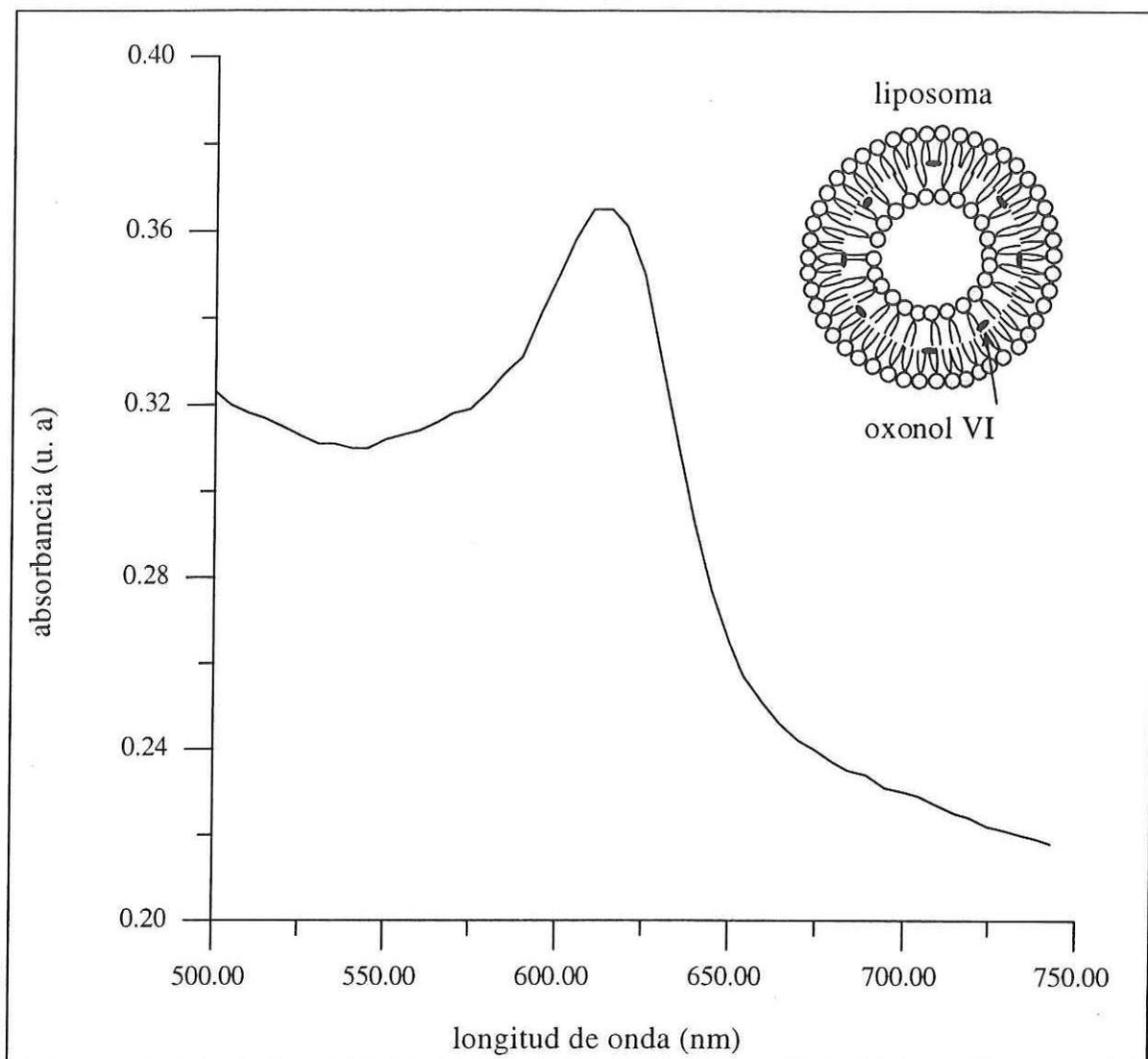


Figura 7 Absorbancia de una muestra de liposomas teñidos con oxonol VI

Al comparar el espectro de liposomas teñidos (figura 7) con el espectro de tinte (figura 6), se observa que existe un corrimiento del pico de máxima absorción de aproximadamente 20 nm hacia el rojo. Este corrimiento es un buen indicador de que las moléculas de tinte se han adherido a las membranas de liposomas.

## Capítulo III

### MEDICION DEL TAMAÑO DE LIPOSOMAS POR LA TECNICA DE CORRELACION DE FOTONES

#### III.1 Introducción

La técnica de correlación de fotones es una técnica de medición indirecta, desarrollada gracias a los avances tecnológicos de láseres, fotomultiplicadores, circuitos integrados y electrónica digital. Se basa en el procesamiento de datos estadísticos relacionados con fenómenos de esparcimiento. Del resultado de este procesamiento se obtiene información de parámetros que caracterizan a materiales dispersos en medio líquido.

La teoría de esparcimiento que fundamenta el comportamiento de sistemas dispersos fue descrita por Rayleigh, descrita en el apéndice A. Esta teoría supone tener partículas en solución suficientemente diluida para evitar que interactúen entre sí y, además que sean lo suficientemente pequeñas comparadas con la longitud de onda de la luz incidente. El proceso inicia cuando se hace incidir luz sobre las partículas que se encuentran en medio líquido. El campo eléctrico de la luz incidente induce a los electrones y moléculas a que

oscilen, obligándolas a comportarse como una fuente secundaria de radiación, solo que ahora lo harán con diferente intensidad, polarización y frecuencia, determinadas por el tamaño y forma del material dispersor. Estos nuevos parámetros que describen la luz esparcida, contienen información de las características y de la dinámica del material dispersor. Cuando se tiene un sistema al cual resulta difícil medir sus dimensiones, el método de correlación de fotones es una buena alternativa siempre y cuando se encuentran en el orden de micras a nanómetros. El objetivo es captar en un fotodetector parte de la intensidad radiada por el medio dispersor y procesarla para obtener información de las dimensiones de las partículas. En fenómenos de esparcimiento que involucran sistemas dispersos, se da lugar a fluctuaciones en la intensidad promedio radiada, debido al movimiento Browniano de las partículas. La frecuencia de estas fluctuaciones está relacionada con la velocidad de las partículas y, por ende, con su tamaño. La técnica de correlación está diseñada especialmente para identificar cambios de frecuencia y amplitud de la intensidad radiada de este tipo de sistemas. Consiste básicamente en medir intensidades de luz esparcida en términos de fotoeventos convertidos a una señal de pulsos eléctricos en un tubo fotomultiplicador (o fotodetector). La señal de salida del fotomultiplicador se procesa en tiempo real en un correlacionador y el resultado es una función de correlación en el dominio de tiempo que contiene la información espectral de las partículas suspendidas.

En la siguiente sección se describe brevemente la teoría de correlación a partir del campo eléctrico y de la intensidad de luz fluctuante esparcida por un sistema de partículas

con movimiento aleatorio, detectada en el tubo fotomultiplicador. Del resultado de correlación se obtiene el tamaño de las partículas a partir de su coeficiente de difusión.

### III.2 Ecuaciones para calcular el tamaño de partículas esféricas

En experimentos de autocorrelación de fotones se hace incidir luz monocromática polarizada sobre un medio dispersor [Schultz-DuBois, 1983]. Parte de la luz esparcida se enfoca a un detector, cuya posición define el ángulo de esparcimiento  $\theta$ . El vector de esparcimiento  $\vec{k}$  está definido en función del vector  $\vec{k}_i$  (dirección del vector de la intensidad incidente y transmitida), del vector de intensidad esparcida  $\vec{k}_s$  y del ángulo de esparcimiento  $\theta$ , como lo muestra la figura 8.

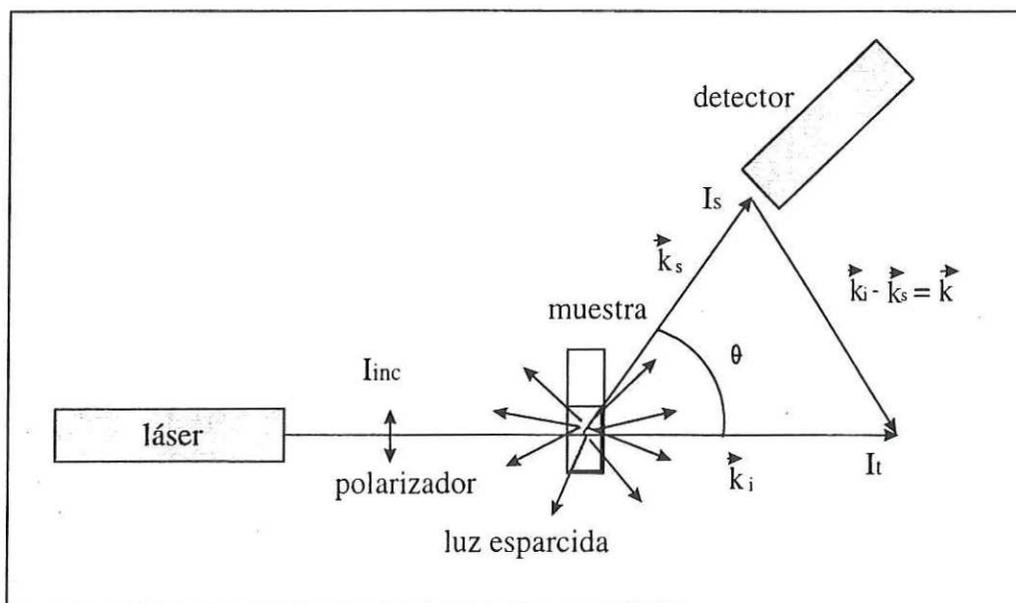


Figura 8. Diagrama del vector de esparcimiento

La magnitud del vectores de onda incidente  $\vec{k}_i$ , está definido en función del índice de refracción del medio dispersor  $n$ , y la longitud de onda  $\lambda_0$  en el vacío a través de la expresión

$$\vec{k}_i = \frac{2\pi n}{\lambda_0},$$

Si se considera la longitud de onda incidente  $\lambda_i$  igual a la longitud de onda esparcida  $\lambda_s$

$$\lambda_i \approx \lambda_s = \frac{\lambda_0}{n},$$

entonces la magnitud del vector de onda incidente  $|\vec{k}_i|$  es igual a la magnitud del vector de onda esparcido  $|\vec{k}_s|$ ,

$$|\vec{k}_i| \cong |\vec{k}_s| = \frac{2\pi n}{\lambda_0}.$$

Aplicando ley de cosenos entre los vectores  $\vec{k}_i$  y  $\vec{k}_s$ , obtenemos la magnitud del vector esparcimiento  $|\vec{k}| = k$  igual a

$$k = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \text{sen} \frac{\theta}{2} \quad (4)$$

El vector de esparcimiento  $\vec{k}$  esta relacionado con el campo eléctrico  $E(t)$  de la luz esparcida que llega al detector, a través de la expresión

$$E(t) = \sum_j^N E_j \exp[i\phi_j(t)], \quad (5)$$

donde  $E_j$  representa la amplitud del campo eléctrico de la luz esparcida por las  $j$  partículas iluminadas y  $\phi_j(t) = \vec{k} \cdot x_j(t)$  el cambio de fase del campo eléctrico de las  $j$  partículas distribuidas con igual probabilidad. El parámetro  $\vec{k}$  representa el vector de onda de la luz esparcida y  $x_j(t)$  el vector de posición de las partículas.

Las fluctuaciones de un medio dispersor con movimiento Browniano matemáticamente se definen por medio de la función de correlación del campo eléctrico  $g^{(1)}(\tau)$ . La correlación se define como el promedio del producto de una función A evaluada a un tiempo  $t$ , multiplicada por una función B evaluada a un tiempo  $t + \tau$ . La autocorrelación es definida como el promedio del producto de una función evaluada a un tiempo  $t$ , multiplicada por el conjugado de si misma pero evaluada a un tiempo  $t + \tau$ . Bajo esta definición podemos expresar las fluctuaciones del medio como

$$g^{(1)}(\tau) = \langle E(t)E^*(t + \tau) \rangle$$

Sustituyendo el cambio de fase  $\varphi_j(t)$  de la ecuación (5) en función del vector de onda  $\vec{k}$  y del vector de posición  $x_j(t)$  de las  $j$  partículas, obtenemos

$$\langle E(t)E^*(t+\tau) \rangle = \sum_j^N \sum_l^M \langle E_j E_l \exp\{i\vec{k} \cdot [x_j(t) - x_l(t+\tau)]\} \rangle . \quad (6)$$

Esta ecuación representa la función de autocorrelación del campo eléctrico de la luz esparcida.

Cundo se tiene un sistema que involucra señales con distribución Gaussiana [Chu, 1991], como el nuestro, los términos cruzados  $j \neq l$  no contribuyen a la función de autocorrelación (o correlación)

$$\langle E(t)E^*(t+\tau) \rangle = \sum_j^N \langle E_j^2 \exp\{i\vec{k} \cdot [x_j(t) - x_j(t+\tau)]\} \rangle , \quad (7)$$

lo que significa que sólo hay cambios en la amplitud del campo eléctrico

La teoría de Einstein que describe el comportamiento de partículas con movimiento Browniano [Schultz-DuBois, 1983] establece que el coeficiente de difusión  $D$  de las partículas suspendidas es función del desplazamiento cuadrático medio

$$\langle [\Delta x(t) \equiv x(t+\tau) - x(t)]^2 \rangle = 2D\tau , \quad (8)$$

De acuerdo con teoremas estadísticos [Schultz-DuBois, 1983], el promedio de una función con distribución normal es posible definirla en términos de la varianza  $\sigma^2$  mediante la expresión

$$\langle e^{i\varphi} \rangle = e^{-\sigma^2/2}.$$

Esto permite que la ecuación (7) pueda expresarse como

$$\langle e^{i\bar{k}\{x_j(t)-x_j(t+\tau)\}} \rangle = e^{-k^2 \langle [x_j(t+\tau)-x_j(t)]^2 \rangle}.$$

Sustituyendo el valor del desplazamiento cuadrático medio dado por la ecuación (8) en la función de autocorrelación del campo eléctrico  $\langle E(t)E^*(t+\tau) \rangle$  dado por la ecuación (7), se obtiene la función de autocorrelación del campo eléctrico  $g^{(1)}(\tau) = \langle E(t)E^*(t+\tau) \rangle$  en función del coeficiente de difusión  $D$

$$g^{(1)}(\tau) = \sum_j^N E_j^2 e^{-2k^2 D \tau}. \quad (9)$$

Para conectar esta última ecuación con la función de autocorrelación de la intensidad  $g^{(2)}(\tau)$  utilizamos la relación de Steigert [Chu, 1991]

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + |g^{(1)}(\tau)|^2. \quad (10)$$

Sustituyendo el valor del campo eléctrico  $g^{(1)}(\tau)$  dado por la ecuación (9), tenemos

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \left| \sum_j^N E_j^2 e^{-2Dk^2\tau} \right|. \quad (11)$$

Podemos decir que la función de autocorrelación de intensidad  $g^{(2)}(\tau)$  es proporcional a la función de autocorrelación del campo eléctrico  $g^{(1)}(\tau)$

$$g^{(2)}(\tau) \propto e^{-2Dk^2\tau}. \quad (12)$$

De acuerdo con la relación de Stokes-Einstein [Schulz-DuBois, 1983] el coeficiente de difusión para partículas esféricas es igual a

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta\mathbf{d}}, \quad (13)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzman, T la temperatura y  $3\pi\eta\mathbf{d}$  representa el coeficiente de fricción, el cual depende de la viscosidad del líquido  $\eta$  y del radio de la partícula  $\mathbf{d}$ .

Es importante mencionar que ésta relación es válida solo para partículas esféricas que se encuentran dispersas en un medio líquido y que se muevan de manera independiente.

La figura 9 muestra la función de correlación  $g^{(2)}(\tau)$  de un sistema de partículas dispersas en un medio líquido. El ancho de ésta función está determinado por el tiempo de correlación  $\tau_c$ , definido como el inverso del parámetro  $2k^2D$ . Cuando el tiempo de correlación  $\tau_c$  es igual al tiempo de retardo  $\tau$ , el valor que toma la función de correlación  $g^{(2)}(\tau)$  es igual a  $1/e$ , equivalente al 36 % del valor de  $g^{(2)}(\tau)$ . Esto significa que el ancho de la función está relacionado con el coeficiente de difusión  $D$  y es, a partir de éste coeficiente que se calcula el diámetro de las partículas.

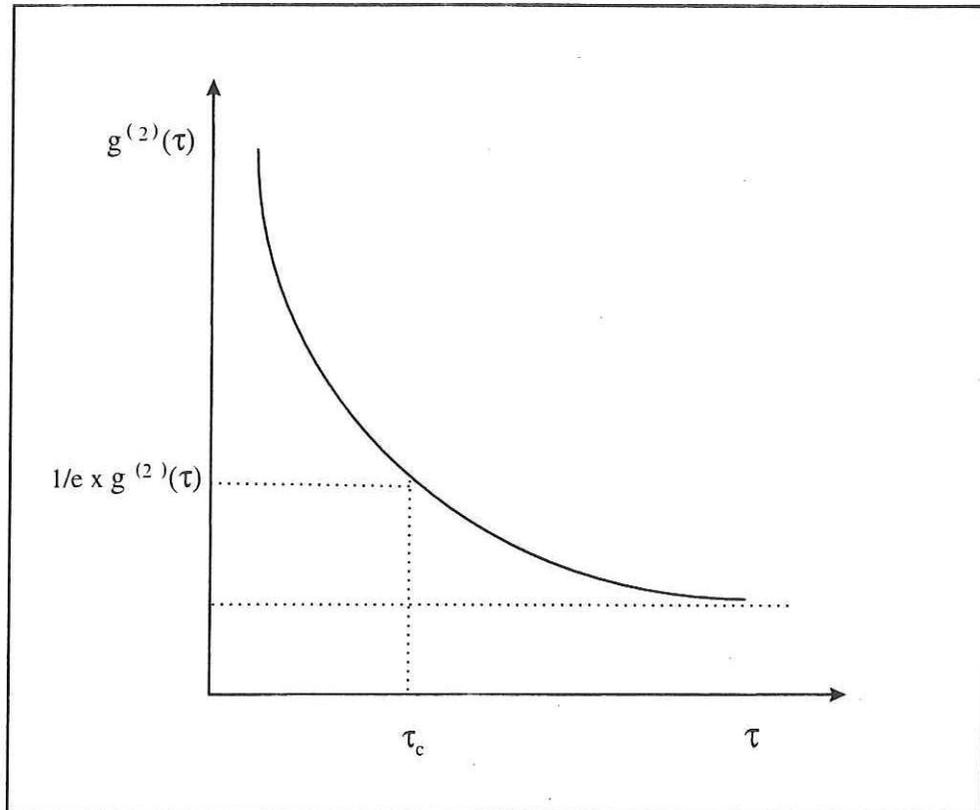


Figura 9. Curva de correlación  $g^{(2)}(\tau)$

## Capítulo IV

### EXPERIMENTO

En esta sección se describe el arreglo experimental que se utilizó para medir el tamaño de los liposomas teñidos y dañados por la exposición a luz láser. En éste experimento se aplica la técnica espectroscópica de correlación de fotones descrita en el capítulo anterior. Esta técnica estima en forma indirecta los coeficientes de difusión de partículas dispersas en un medio líquido, que tengan dimensiones del orden  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  m. Esta técnica espectroscópica nos fue especialmente útil porque se prepararon estructuras coloidales que por sus características de formación sólo pueden existir en medio líquido. El experimento consistió en incidir simultáneamente y en sentido opuesto dos haces de luz monocromática sobre una muestra de liposomas teñidos. La luz esparcida por los liposomas iluminados se colectó a un ángulo de  $90^\circ$  en un sistema de detección que convierte la señal luminosa a señal eléctrica, la cual se procesó en un correlacionador digital de fotones

#### IV.1 Arreglo experimental

El arreglo experimental que se muestra en la figura 10 se utilizó para realizar las mediciones indirectas que permitieron obtener las dimensiones de las partículas suspendidas. Para ello se hicieron incidir simultáneamente sobre el punto  $P_1$  de la celda que contiene la muestra de liposomas, dos haces de luz láser que viajan en sentido opuesto. Un haz de argón de 514 nm de longitud de onda y 2 mW de potencia incidente, polarizado verticalmente y un haz de onda continua proveniente de un láser de tintura, sintonizable en un rango de 575 nm a 650 nm de longitud de onda. Ambos haces se enfocan simultáneamente con las lentes  $L_2$  y  $L_1$  en el punto  $P_1$  de la celda. El área iluminada con el haz de argón esparce una señal que exclusivamente es captada por el tubo fotomultiplicador. Mientras que el haz del láser de tintura centrado en 600 nm de longitud de onda se utiliza exclusivamente para dañar la muestra de liposomas cuando se expone a una potencia controlada entre 40 y 120 mW. Este barrido en la potencia de exposición permitió comprobar que la excitación de la membrana que forma un liposoma sucede a una potencia mayor a 40 mW. Parte de la luz que las partículas esparcen se colecta a un ángulo de  $90^\circ$  respecto al haz incidente. A este ángulo se mantiene la polarización vertical, además de que las posibles partículas de polvo existentes en la muestra esparcen menos. Con la lente  $L_3$  la luz esparcida se dirige a la abertura  $A_2$  (de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro) colocada justo a la entrada del tubo fotomultiplicador. Entre la lente  $L_3$  y la abertura  $A_2$  se coloca un filtro pasa-altas de 514 nm de longitud de onda, con objeto que el tubo fotomultiplicador capte solo las señales aleatorias esparcidas por las partículas iluminadas en la longitud de onda del argón.

La parte crítica del experimento es la alineación en el traslape de ambos haces en el punto  $P_1$  de la celda y detectar su imagen en la abertura  $A_2$ , tal como se ilustra en la figura 11. La señal previamente filtrada es dirigida a un sistema de detección formado por un tubo fotomultiplicador (PMT), un amplificador y un discriminador de señales. El tubo fotomultiplicador convierte la señal luminosa filtrada a señal eléctrica, de aquí pasa a un amplificador de señales y por último a un discriminador, en donde se seleccionan pulsos en forma aleatoria antes de dirigirse al correlacionador digital (Brookhaven Instrument Corporation: BI-2030AT). El proceso que realiza el correlacionador digital es descrito brevemente en el apéndice B.

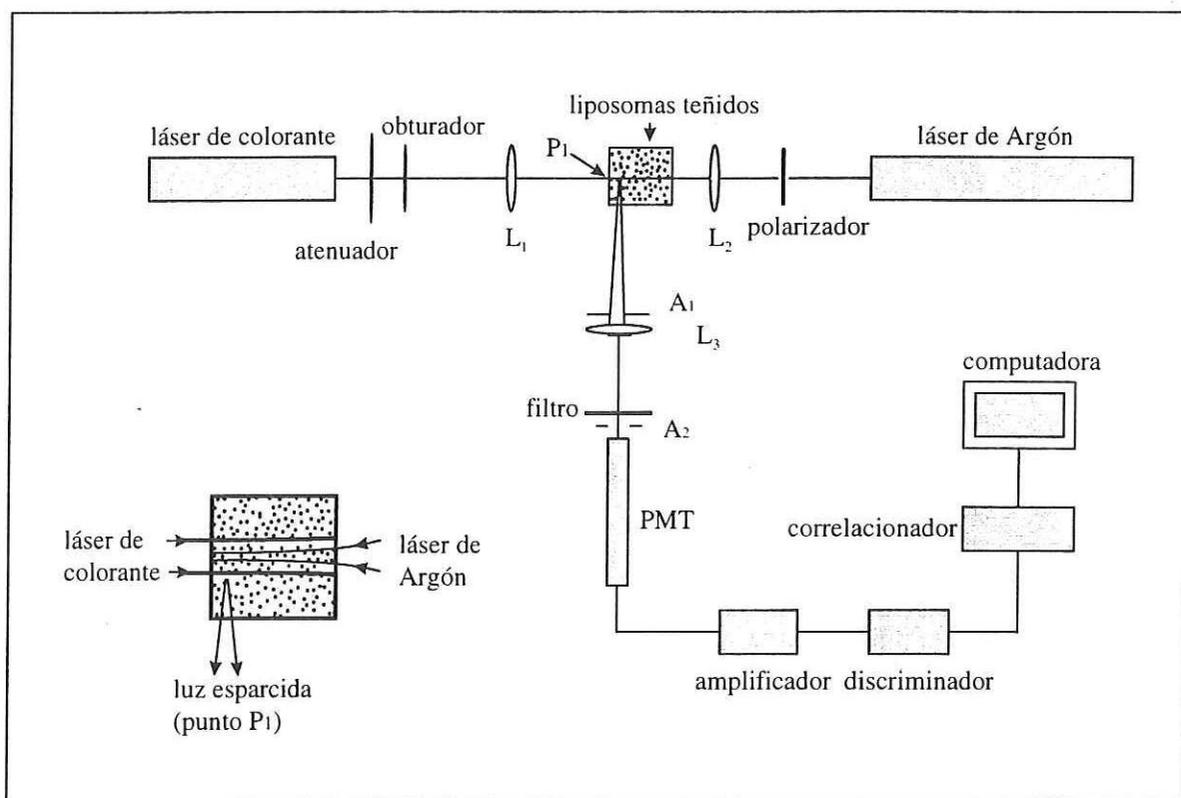


Figura 1. Arreglo experimental utilizado en la técnica de correlación de fotones.

Finalmente el resultado de la correlación de fotones se muestran en pantalla en forma de una función exponencial decayente. Los datos que generan esta curva se guardan para ajustarlos posteriormente a una función teórica, de la que se obtiene el diámetro de las partículas. Todo éste proceso fue realizado múltiples veces, remplazando continuamente partículas dañadas por no dañadas.

Para reducir el efecto de los constantes remplazos se ilumina un volumen mayor de la muestra contenida en la celda, colocando la lente  $L_1$  de mayor longitud focal (10 cm) en la trayectoria del láser de tinte. Comparado con la longitud focal de la lente  $L_2$  (2.5 cm) utilizado para enfocar el haz de argón.

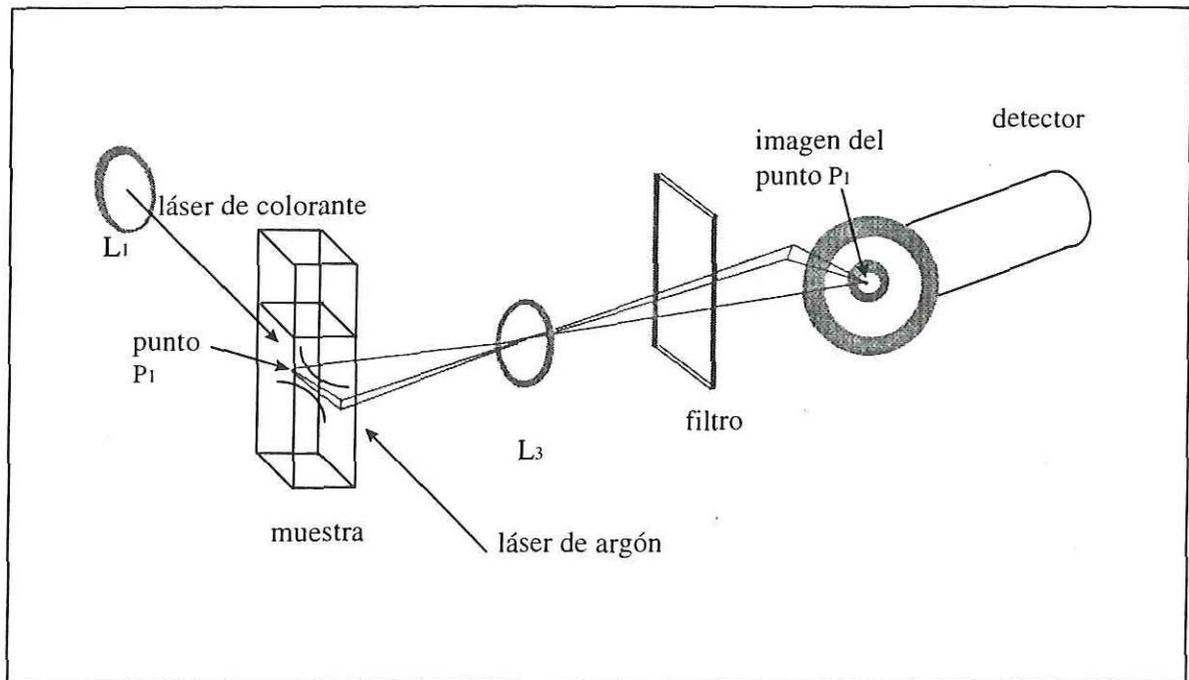


Figura 11. Detección de la imagen del punto  $P_1$ .

La diferencia en longitud focal de las lentes  $L_1$  y  $L_2$  permite formar en el punto  $P_1$  una cintura del haz de tintura cuatro veces mayor que la cintura del haz de argón. Esta diferencia permite que el haz de tintura dañe un volumen mayor de la muestra. De esta forma se asegura una mejor detección.

Cabe mencionar que antes de cada medición realizada en los experimento de daño, se calibra el sistema de correlación. Este proceso consiste en obtener el diámetro reportado por los laboratorios Duke Scientific, de una muestra patrón de nanoesferas de polietileno que miden  $155 \pm 4$  nm de diámetro.

Para realizar este proceso de calibración se utiliza el arreglo experimental mostrado en la figura 10, con la excepción que se debe bloquea el haz del láser de tintura con una pantalla.

#### **IV.2 Selección de parámetros**

Existen tres parámetros característicos del medio de suspensión que deben ser leídos por el programa del correlacionador: el índice de refracción, la viscosidad y la temperatura. En nuestro caso se usó agua destilada como medio de suspensión (cuyo índice de refracción es igual a 1.332) y se consideró para todos los experimentos una temperatura estándar igual a 25 °C y una viscosidad correspondiente a esta temperatura, igual a 0.89 cP. El valor de éstos parámetros fueron tomados del manual de propiedades físicas, químicas y mecánicas (Merck Index) [Budaaurari, 1989] y del manual de ingeniería [Perry, 1985]. Desde el teclado de la computadora también se especificó la longitud de onda que captó el detector y el

ángulo al cual se colectó la información. La figura 10 muestra que se colectó luz proveniente de un láser de argón de 514 nm de longitud de onda a  $90^\circ$  con respecto a la dirección del haz incidente. Por último el programa de correlación leyó el parámetro relacionado directamente con la forma y tamaño de las partículas suspendidas: el tiempo de muestra. Este parámetro corresponde a un pequeño intervalo de tiempo (menor al tiempo que dura el proceso de correlación) durante el cual se captan señales eléctricas, las cuales se multiplican con señales captadas en un intervalo de tiempo defasado. El valor de este intervalo se encontró previamente durante el proceso de calibración del sistema y fue igual a  $36 \mu\text{s}$  para todos los procesos. En las expresiones matemáticas de autocorrelación al tiempo de muestra se le denomina tiempo de retardo  $\tau$ .

La selección correcta de todos estos parámetros nos permitió obtener el promedio de la función de autocorrelación de fotones de luz esparcida  $g^{(2)}(\tau)$ , descrita en el capítulo III, para partículas de polietileno, liposomas y liposomas dañados.

Los resultados de éste experimento se discutirán en el capítulo siguiente.

## Capítulo V

### RESULTADOS

En éste capítulo se presentan los resultados experimentales obtenidos de la autocorrelación de fotones de luz esparcida por nanoesferas, liposomas, liposomas dañados químicamente y liposomas dañados por exposición de luz láser. En todos los casos las curvas experimentales obtenidas son un conjunto de puntos discretos que se ajustan a una función exponencial decayente, acordes con la teoría de correlación mencionada en el capítulo III. El ancho de las curvas representa el tiempo de correlación de la función, el cual relaciona el diámetro de las partículas involucradas.

Es importante mencionar que todos los resultados que se presentan a continuación se obtuvieron usando el arreglo experimental que se describe en el capítulo IV, con la diferencia de que para el proceso de calibración del sistema, hubo que bloquear el haz del láser de tintura.

## V.1 Calibración del sistema

El proceso de calibración del sistema se realizó con objeto de garantizar mediciones correctas en todos los procesos de autocorrelación. Consistió en detectar luz esparcida de una muestra de partículas esféricas de polietileno de  $155 \pm 4$  nm diámetro, diluidas en agua en concentración semejante a una muestra de liposomas (12.7 mM) y mediante la técnica de autocorrelación de fotones se verificó el tamaño reportado por los fabricantes. La calibración se realizó inicialmente para encontrar los parámetros que permitieron obtener la función de autocorrelación correcta de muestras que tenían características físicas similares a muestras de nuestro interés. Después se realizó en forma rutinaria para comprobar la calidad de las muestras de liposomas recién preparados y para verificar la alineación del arreglo experimental antes de realizar cualquier medición. De esta manera se garantizó que el proceso de autocorrelación produjera buenos resultados para cualquier tamaño de partícula que se encontrara dentro del rango de nanómetros a micras.

A continuación se muestra el resultado experimental del proceso de calibración, en el que se usó nanoesferas de polietileno.

Los puntos discretos de la figura 12 representa la función de autocorrelación experimental  $g^{(2)}(\tau)$  en función del tiempo de retardo  $\tau$ , y la línea continua el ajuste a una función exponencial.

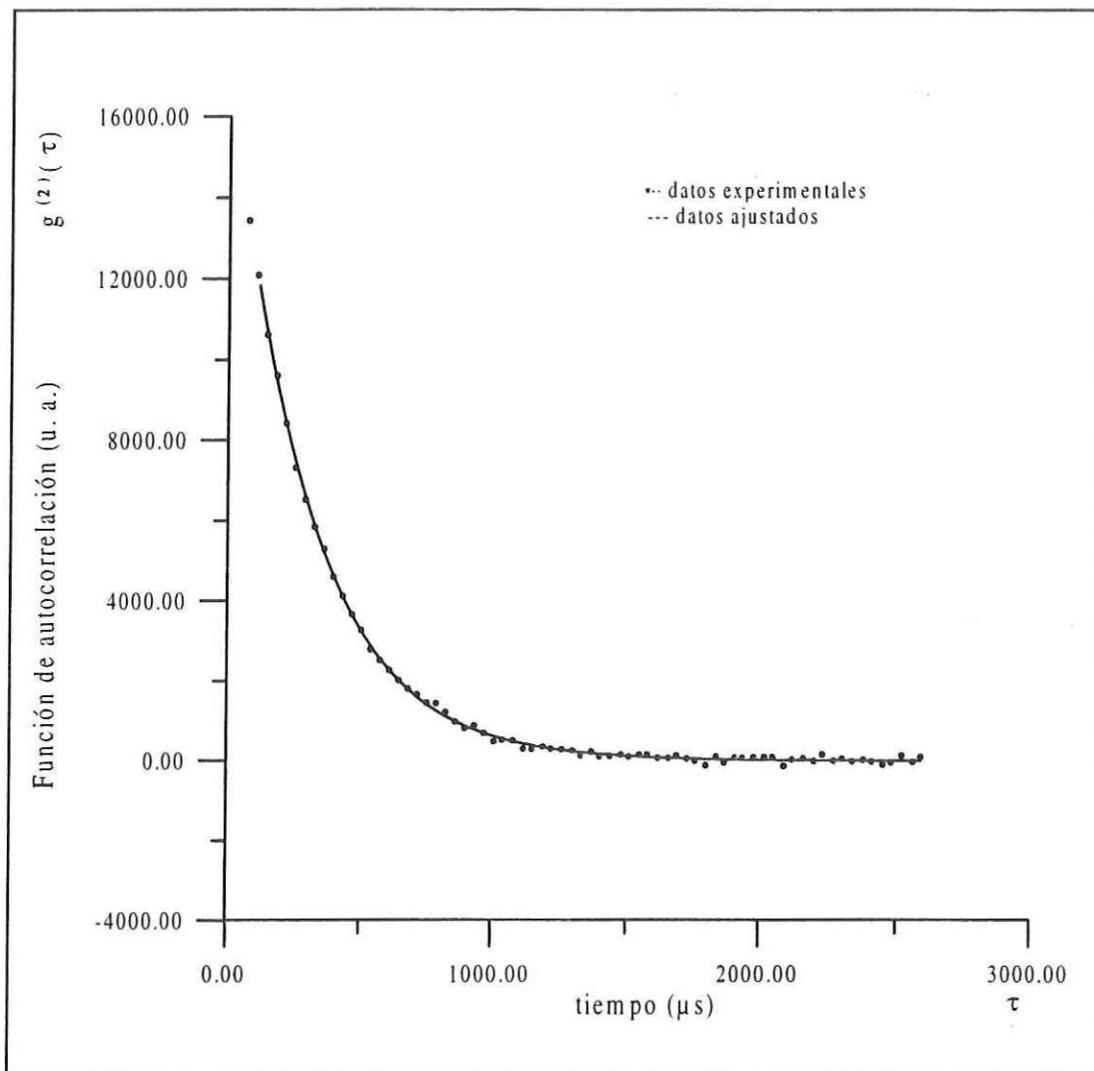


Figura 12. Curva de autocorrelación de fotones de esferas de polietileno de tamaño conocido.

Se ha mencionado en el capítulo III que la función de autocorrelación que describe un sistema de partículas suspendidas en medio líquido tiene comportamiento exponencial decayente  $g^{(2)}(\tau) \propto e^{-2Dk^2\tau}$ . Por esta razón es posible ajustar el resultado experimental a la función  $y = a + be^{-cx}$ . En éste trabajo el parámetro  $c$  del modelo matemático es el más

importante porque su inverso representa el tiempo de correlación  $\tau_c = \frac{1}{c}$  de la función  $g^{(2)}(\tau) \propto e^{-2k^2 D \tau} = e^{-\tau/\tau_c}$ . De esta expresión se observa que el tiempo de correlación es inversamente proporcional al coeficiente de difusión  $D$ , esto es  $\tau_c = \frac{1}{2k^2 D}$ . Dado que este coeficiente relaciona velocidades proporcionales al tamaño de las partículas, involucra el diámetro de ellas a través de la relación  $d = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$ .

Como ejemplo mencionaremos que del ajuste exponencial de la figura 12 se obtuvo un tiempo de correlación  $\tau_c$  igual a 302.49  $\mu\text{s}$ . Con éste valor se calculó un coeficiente de difusión  $D$ , igual a  $3.11 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\mu\text{s}$ , y de aquí se obtuvo un diámetro de partícula igual a 157 nm. Este resultado comparado con los  $155 \pm 4$  nm que reporta el fabricante de nanoesferas demostró que el sistema se encontraba bien calibrado.

## V.2 Medición del tamaño de los liposomas

Después de calibrar el sistema se mide el tamaño de los liposomas. En esta sección se presenta el resultado de la autocorrelación de la señal proveniente de una muestra de liposomas recién preparados.

Los puntos discretos de la figura 13 representan la función de autocorrelación experimental  $g^{(2)}(\tau)$ , y la línea continua el ajuste a una función exponencial.

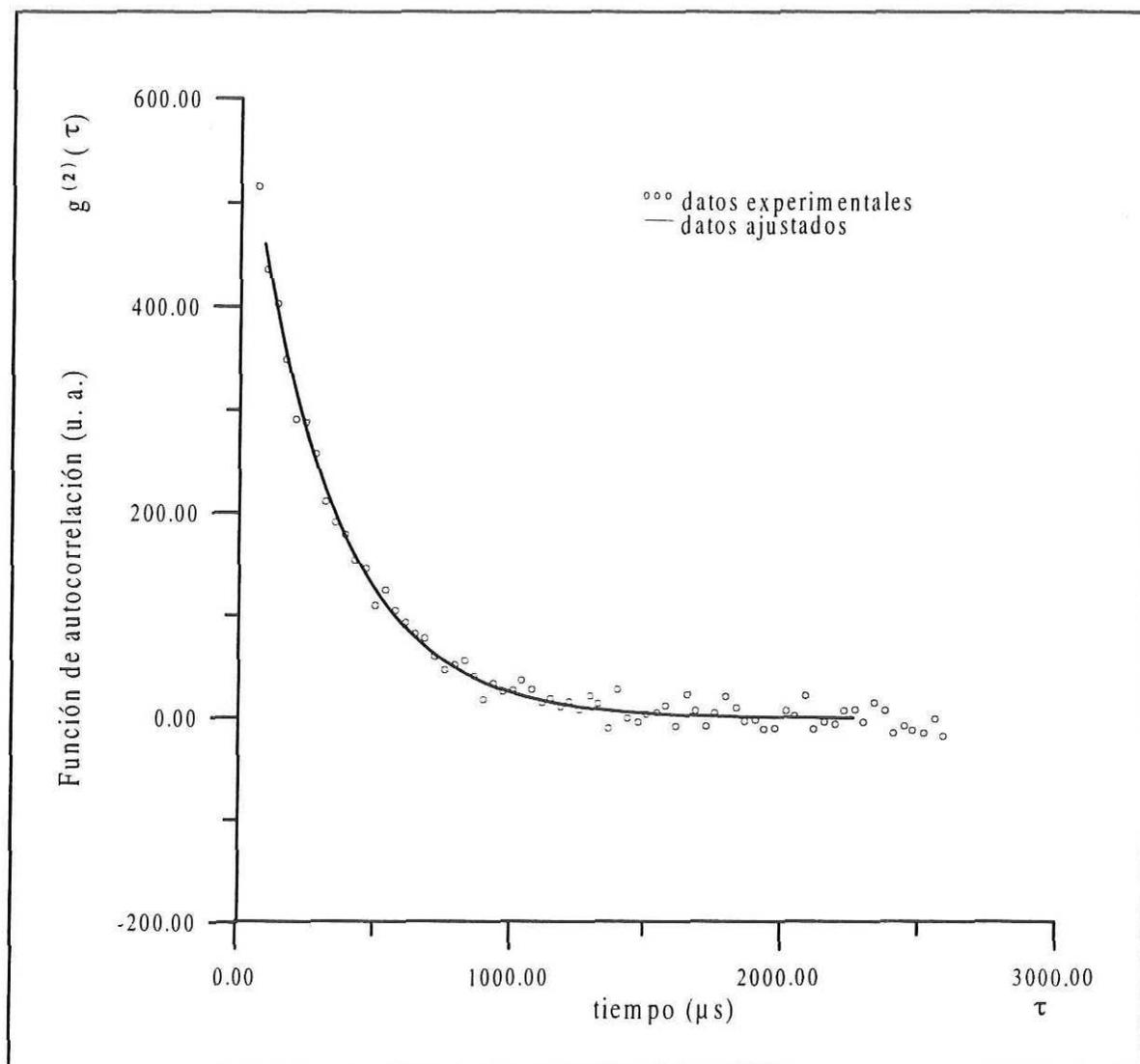


Figura 13. Función de autocorrelación de fotones de una muestra de liposomas.

Usando el procedimiento de cálculo descrito en la sección V.1, en esta muestra de liposomas recién preparados se obtuvo un diámetro igual a 159 nm. Este resultado es uno de tantos obtenidos durante las preparaciones. Lo que es importante mencionar es que los resultados de la autocorrelación de muestras recién preparadas oscilaban en un intervalo de

155 nm  $\pm$  15 nm. Esta variación se debió a factores relacionados con la eficiencia del proceso de dialización, los cuales alteran el tamaño en forma definitiva, y a factores relacionados con la manipulación del experimento. Entre estos últimos se pueden mencionar la existencia de partículas de polvo en la muestra y la grasa pegada en la celda de cuarzo que contiene la muestra.

### **V.3 Resultados experimentales de daño**

A continuación se muestran los resultados experimentalmente del daño químico y por exposición de luz láser en liposomas teñidos con moléculas colorantes altamente absorbentes a luz láser.

#### **V.3.1 Daño químico**

El experimento de daño químico se realizó para verificar el sistema de detección y analizar el efecto que tiene la luz láser sobre muestras de liposomas. Se sabe que las estructuras coloidales se alteran fácilmente si su medio de coexistencia se cambia o se altera. Para detectar tal alteración se causó daño químico agregando 50  $\mu$ l de metanol a una muestra de 300  $\mu$ l de liposomas diluidos recién preparados. Con ayuda de la técnica de correlación de fotones se observó que la concentración de casi el 17 % de metanol en la solución fue capaz de causar un cambio drástico en la estructura coloidal. Actualmente se

ha reportado que concentraciones mayores al 1 % de solventes orgánicos en una muestra de liposomas causa daño o alteraciones severas en el tamaño de las muestras.

Las puntos de la figura 14 representan la función de autocorrelación experimental  $g^{(2)}(\tau)$  de liposomas dañados químicamente (curva b) comparada con liposomas no dañados (curva a). Las curvas continuas representan su ajuste a una función exponencial.

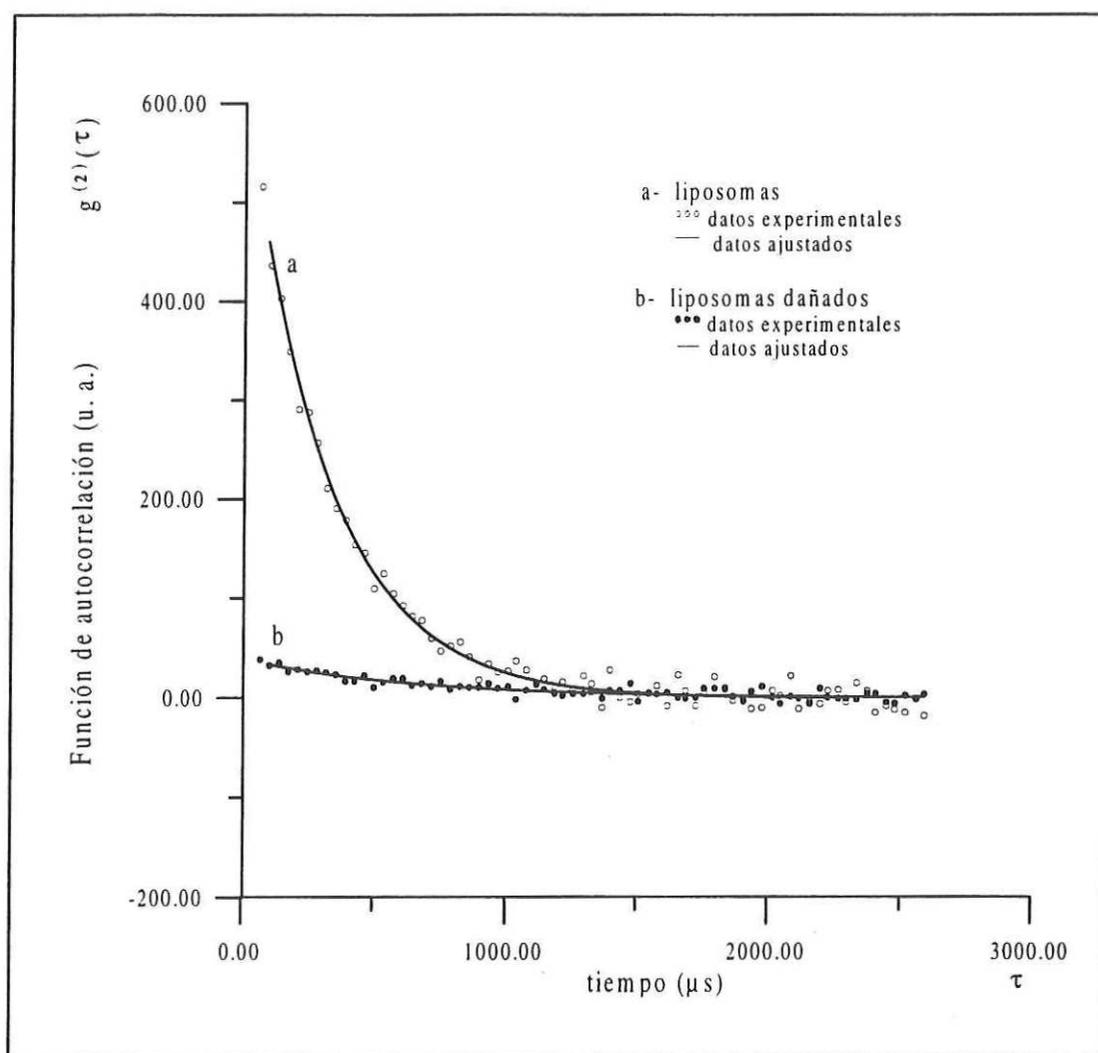


Figura 14. Curvas de autocorrelación experimentales y ajustadas de: (a) liposomas y (b) liposomas dañados químicamente con metanol.

Siguiendo el mismo procedimiento de cálculo de la sección V.1, el diámetro obtenido de los liposomas no dañados fue igual a 159 nm y el diámetro de los liposomas dañados químicamente por adición de metanol fue igual a 312 nm. Este resultado muestra que el diámetro de partícula varió un 84.6 %. Esto indica que se sufren dramáticas alteraciones cuando se les daña con un solvente orgánico. Es importante mencionar que se obtuvieron resultados similares al adicionar aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  del detergente n-octyl  $\beta$ -D-gluco-pyranoside a una muestra de liposomas. Ambos resultados de daño químico sirvieron como indicadores de cambio, detectado por la técnica de autocorrelación de fotones. Esto asegura que los posibles cambios sufridos en la membrana de los liposomas por la exposición a luz láser, también puede ser detectada.

#### **V.4.2 Daño por exposición a luz láser**

Este tipo de daño consistió en exponer a luz láser una muestra de liposomas teñidos con moléculas de oxonol VI en una concentración igual a 300 nM. La luz que se utilizó para la exposición provino de un láser de colorante de onda continua centrado en 600 nm de longitud de onda y cuya potencia máxima era igual a 240 mW. Uno de los objetivos de éste experimento consistió en exponer las muestras de liposomas a diferentes potencias, las cuales se variaron desde un valor de 10 mW hasta 120 mW con ayuda de un atenuador colocando fuera de la cavidad.

Las puntos de la figura 15 representan la función de autocorrelación experimental  $g^{(2)}(\tau)$  de liposomas dañados por exposición de luz láser (curva b) y de liposomas no dañados (curva a). Las curvas continuas representan su ajuste a una función exponencial.

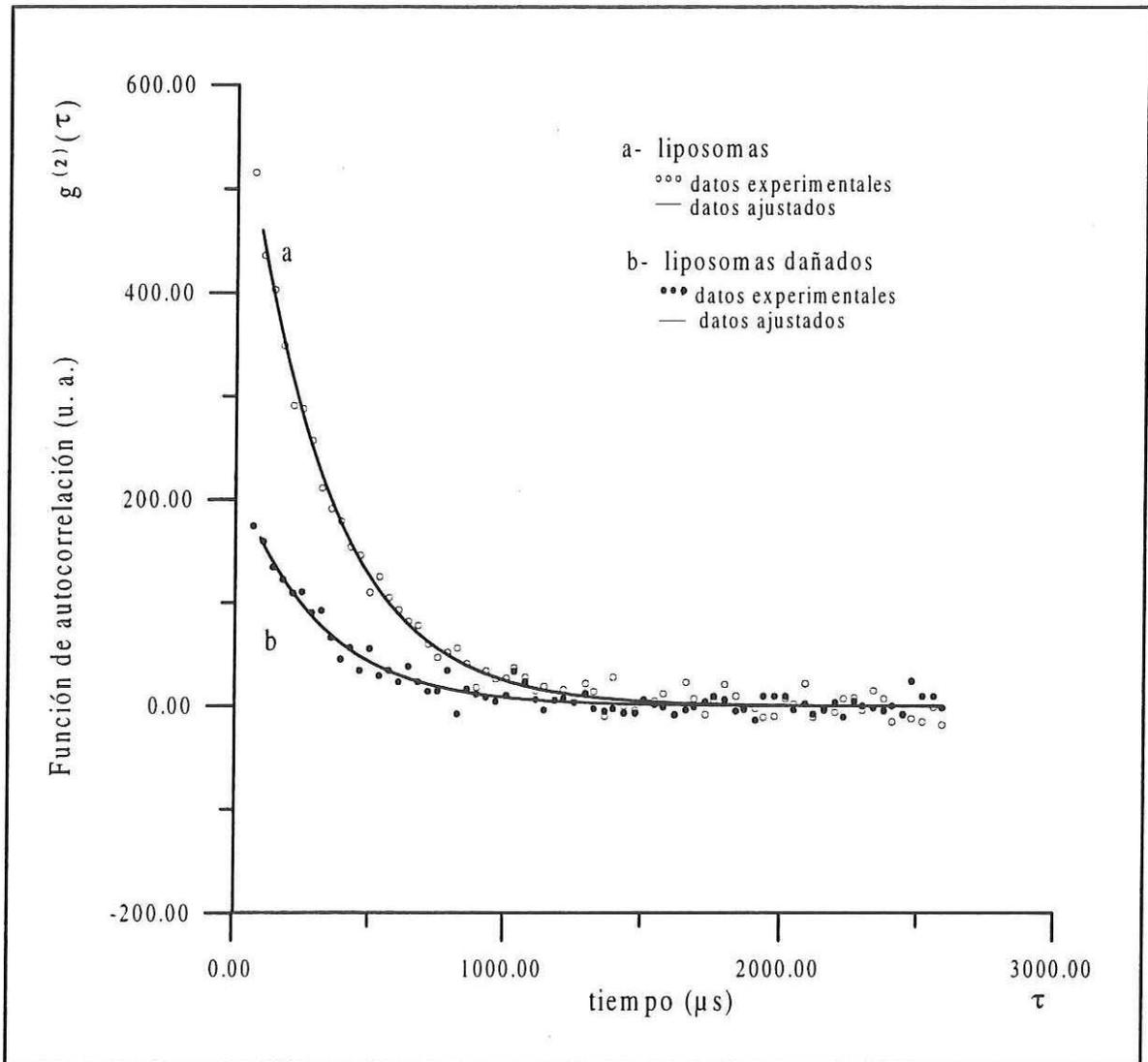


Figura 15. Curvas experimentales y ajustadas de autocorrelación de fotones de: (a) liposomas teñidos y (b) liposomas teñidos expuestos a luz láser (120 mW).

Usando el mismo procedimiento de cálculo de la sección V.1, el diámetro obtenido de la muestra de liposomas fue igual a 159 nm, y el de liposomas dañados igual a 200 nm. Esto muestra que hubo un cambio del 25.7 % en el diámetro de los liposomas. Este resultado corresponde a una muestra radiada a 120 mW. Cabe mencionar que este experimento se realizó a diferentes potencias entre el rango de 10 mW y 120 mW y se pudo observar que solo se suscitaban cambios en el resultado de autocorrelación a partir de una potencia de radiación igual 40 mW. También se observó que el resultado de la autocorrelación no variaba significativamente cuando las muestras eran radiadas a diferentes potencias (mayores a 40 mW).

### **V.5 Medición indirecta de la temperatura en una muestra radiada**

Cuando los haces de argón y colorante son enfocados en el punto  $P_1$  de la celda que contiene la muestra (figura 11) ésta se calienta debido a la absorción de las moléculas de oxonol VI contenidas en ella. Como consecuencia del calentamiento existe un aumento de la temperatura, la cual no es posible medir en forma directa durante el experimento. La definición correcta de éste parámetro es muy importante para el experimento porque permite obtener resultados correctos en el proceso de autocorrelación. Por esta razón se procedió a medirla experimentalmente en forma indirecta de la siguiente manera.

Inicialmente se adicionaron moléculas de oxonol VI a una muestra de nanoesferas de polietileno, en igual concentración que las contenidas en una muestra de liposomas (12.7 mM), después se radiaron a una potencia de 120 mW con luz láser centrada en 600 nm de

longitud de onda. Este proceso se llevo a cabo a una temperatura igual 25 °C. Como consecuencia de esta radiación se detectó una disminución de casi 20 % en el diámetro de las partículas. Como este cambio no era obvio, porque las nanoesferas no modifican su forma por efectos térmico a menos que éstos sean extremos. Se llegó a la conclusión que la temperatura jugaba un papel muy importante, y se decidió buscar en forma experimental el valor correcto que permitiera obtener el diámetro real. Para este propósito se tomó una muestra de nanoesferas teñidas, previamente calibradas, y sin alterar el resto de los parámetros, a su resultado de autocorrelación se le varió la temperatura y su respectiva viscosidad. Estos parámetros se variaron desde 25 °C hasta encontrar la temperatura que indicara el tamaño real de las nanoesferas de polietileno,  $155 \pm 4$  nm. En este caso se encontró una temperatura igual a 37 °C.

Este mismo valor de temperatura, medido indirectamente, se usó en las muestras de liposomas radiados. Esto es posible hacerlo debido a que la absorción de las nanoesferas es despreciable y los liposomas no absorben a ésta longitud de onda.

## **V. 6 Resumen de resultados**

En ésta sección se resumen los resultados más relevantes de la medición por autocorrelación de liposomas dañados por exposición de luz láser.

Ya se ha mencionado en el capítulo anterior que la aplicación de ésta técnica conlleva necesariamente a la calibración del sistema. Esto incluye la selección correcta de

los parámetros físicos que describen el sistema de esparcimiento, así como la alineación del arreglo experimental.

La calibración del sistema es un proceso que garantiza resultados de autocorrelación confiables. Esto se demuestra con el resultado de autocorrelación obtenido de una muestra de nanoesferas, presentado en la figura 12, de la cual se obtuvo un diámetro de partícula igual a 157 nm. Este valor comparado con el reportado por el fabricante ( $155 \pm 4$  nm) indicó una excelente calibración.

Por otra parte, se realizó satisfactoriamente la optimización de la técnica de preparación de liposomas unilaminares. Esto se demuestra con el resultado de 159 nm de diámetro de una muestra de liposomas recién preparados, presentado por la figura 13.

Para realizar el experimento de daño fue necesario teñir los liposomas con oxonol VI, una tintura que tiene máxima absorción en 600 nm de longitud de onda. La coloración con estas moléculas tuvo como objetivo absorber el calor de radiación para excitar las membranas hasta un punto crítico, que se manifestara en un rompimiento como consecuencia del efecto térmico. Esta coloración no se llevo a cabo en forma directa, debido a que el solvente en el que se diluye el oxonol VI causa alteración en la estructura de los liposomas, sino durante la dialización de las muestras (para eliminarlo). Se pudo comprobar que la coloración durante el proceso de diálisis no alteraba en nada el tamaño de las muestras. Esto se demuestra con el resultado presentado por la figura 13, la cual muestra la autocorrelación de fotones de luz esparcida por una muestra de liposomas teñidos. Lo que si se muestra es un corrimiento de 20 nm hacia el rojo del pico de absorción (figura 6 y 7) debido a transiciones electrónicas entre niveles de enlace [Manku, 1988].

Una vez teñidos los liposomas se utilizó la técnica espectroscópica de autocorrelación de fotones de luz esparcida para verificar su calidad y monitorear las modificaciones sufridas por daño químico y por exposición de luz láser. La figura 14 muestra una diferencia del 84.6 % en el diámetro de liposomas recién preparados y liposomas dañados por adición de un compuesto orgánico. Esta prueba de daño químico fue útil porque con ello se comprobó que era posible detectar alteraciones usando la técnica de correlación.

Finalmente la figura 15 compara el resultado de autocorrelación de luz esparcida por liposomas no dañados y liposomas expuestos a luz láser de 600 nm de longitud de onda y 120 mW de potencia. El resultado de correlación de luz esparcida de liposomas expuestos presenta un incremento del 25.7 % de diámetro, respecto al diámetro de liposomas no dañados. Esto demuestra que si es posible causar alteraciones a los liposomas teñidos cuando se les expone a luz láser. Lo más importante de este experimento es haber encontrado la potencia umbral del daño. En éste caso fue igual a 40 mW. Se observó que a potencias de exposición menores a ésta no había ningún cambio o alteración en la membrana. Cabe mencionar que los 40 mW de la potencia umbral no es un valor definitivo, éste cambia con la concentración de partículas colorantes adheridas a las membranas.

Con respecto al error en las mediciones, éste se debe a la ejecución del experimento. Para calcularlo se tomó el resultado de correlación de 10 mediciones correspondientes a diferentes muestras de nanoesferas de polietileno (de igual concentración). De éstas 10 muestras se obtuvo un valor promedio de  $155 \pm 5$  nm en diámetro. La variación de  $\pm 5$  nm

es posible adjudicarla a las mediciones de liposomas y liposomas dañados ya que se trata de un error sistemático en la medición.

De la misma forma se tomó una muestra de 10 resultados de correlación de liposomas recién preparados. De esta muestra se obtuvo un valor promedio de  $155 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$ . Si consideramos el error sistemático de  $\pm 5 \text{ nm}$  obtenido en la medición de las nanoesferas de polietileno, los  $\pm 10 \text{ nm}$  restantes es posible adjudicarlos a la variación en el tamaño obtenido durante la preparación de las muestras.

## VI. CONCLUSIONES

En este estudio de radiación de luz sobre membranas que simulan la capa protectora de las células “liposomas”, se ha mostrado que la excitación por radiación de luz láser cuando se adhieren moléculas colorantes altamente absorbentes, propicia el rompimiento de las membranas.

Se dañaron liposomas unilaminares por exposición de luz láser (con un láser de onda continua) y se midió la potencia umbral de rompimiento usando la técnica de correlación de fotones. Esta técnica estima en forma indirecta el coeficientes de difusión de partículas esféricas suspendidas en un medio acuoso.

Se ha mostrado que la luz láser destruye la estructura de la membrana que conforma un liposomas. Esta destrucción se manifiesta como un estado de agregación de moléculas lípidas, aglomeradas en estructuras más grandes que un liposoma de tamaño estándar (155 nm). Y es debida a que la alta absorción de luz láser de las moléculas colorantes aumentan el calor localizado de la membrana.

Las moléculas lipofílicas del colorante utilizado se albergan entre las moléculas lípidas de la membrana. Esta característica permite usar bajas concentraciones de colorante y bajas potencias de radiación. Esto conlleva a que los liposomas sean más eficientes en la

carga de droga, albergado en su volumen libre interno y eficientes en su liberación cuando se les aplica un potencial externo.

Es importante mencionar que la potencia umbral de rompimiento de las membranas bimoleculares esta directamente relacionado con tres parámetros importantes:

- el tipo de moléculas colorantes usadas
- la concentración de las mismas y
- el tipo de molécula lípida que conforma la membrana de los liposomas.

Gracias a su estructura esférica los liposomas son utilizados principalmente para almacenar medicamentos específicos. En pruebas en vivo y en vitro se ha demostrado que los liposomas de phosphatidyl-choline no causan inmunidad cuando se inyectan en tejido vivo. Son administrados localmente para usarse especialmente en radiaciones de quimioterapia. En donde se les rompe para liberar su carga de droga sobre el tejido dañado. La desventaja de éste método es que se aplican altas potencias de radiación.

Este trabajo presenta una mejor alternativa del rompimiento de las membranas. El teñirlas con un colorante que absorbe luz a cierta longitud de onda permite que al radiarlas con luz láser las membranas se rompan. En este caso, la adherencia de las moléculas colorantes entre las moléculas lípidas, permite radiar las membranas a menor potencia durante cortos períodos de exposición. Esto disminuye la probabilidad de dañar tejido aledaño no dañado y destruir células malignas que formen tejidos o tumores cancerosos.

## LITERATURA CITADA

**Allen, T. M., A. Y. Romans, H. Kercret and J. P. Segrest.** 1980. Detergent Removal during membrane reconstitution. *Biochim. Biophys. Acta* 601, 328 .

**Baghman, A. D., M. M. Standish and J. C. Watkins** 1965. Difussion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mod. Biol.* 13: 238-252 p.

**Bashford, C. L., B. Chance, J. C. Smith and T. Yoshida.** 1979. The behavior dyes in phospholipid dispersions. *J. Biophysics Society* 25:63-85 p

**Budaurari, S.** editor. 1989. *The Merck Index, An Encyclopedia of chemical drugs and Biologicals*, 11<sup>th</sup> edition. MERCK & CO. INC. New Jersey. 1606 pp.

**Burton, R. M.** 1968. (ed) *Proc. Symposium On Lipid Monolayers, Bilayer Models and Cellular Membranes*, American Oil Chemists Society meeting, May 1967. also published in *J. Am. Oil Chemists Soc.* 45,107, 201, 297.

**Chen, F. C., A. Chrzyszczyl, and B. Chu.** 1976. 1976. Quasielastic laser light scattering of phosphatidylcholine vesicles. *J. Chem. Phys.* 64 (8): 3403.

**Chu, B.** 1991. *Laser light scattering* Academic Press. Second Edition. Boston. 343 pp.

**Gahwiller, C.** 1980. A New Method for the rapid determination of the average Size and an Index of Poldispersity of Submicron Particles in Liquids Using Laser Light-Scattering Spectroscopy. *Podwer Tecnology*, 25: 11-13 p.

**Gregoriadis, G.** 1984. "Liposome Technology". CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 267 pp.

**Huang, C.** 1969. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochem.* 9: 344.

- Huang, C.** and **J. T. Mason.** 1978. Geometric packing constrains in egg phosphatidylcholine vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75 (1): 308-310 p.
- Jamasbi, N., M. Mohebi, J. C. Diels.** 1996. A femtosecond optical technique to study ultrafast oscillating systems in real time. *Journal of Optics.* 27 (3): 105-109 p.
- Knight, C. G.** 1981. *Liposomes From Physical Structure to Therapeutical Applications.* Elsevier. NY. 495 pp.
- Khoobehi, B., Clifford A Peyman G., Schuele K.** 1990. *Laser in Surgury and Medicine.* 10: 303 .
- Knight, C. G.** 1981. *Liposomes: From Physical Structure to Therapeutical Applications,* Elsevier, New York . 497 pp.
- Lasic, D. D.** 1995. "Liposomes: from Physics to Applications". Elsevier. 2<sup>nd</sup> edition. Amsterdam. 574 pp.
- Manku, G. S.** 1988. *Principios de Química inorgánica.* Mc Graw Hill/Latinoamericana de México, S. A. de C. V. Primera edición. México 626 pp.
- Mimms, L. T., G. Zampighi, Y. Nozaki, C. Tanford, J. A. Reynolds.** 1981. Phospholipid Vesicle Formation and Transmembrane Protein Incorporation Using Octyl Glucoside. *Biochem.* 20: 833-840 p.
- Mohebi, M.** 1994. *Nonlinear Optics.* Edición de notas de Curso. Comunicaciones Académicas, Serie Optica, CICESE. 108 pp.
- Ostro, M. J.** 1983. *Liposomes.* Marcel Dekker Inc. New York. 12-12 pp.
- Perry, R.** 1983 *Engineering Manual.* Mc Graw Hill. 5<sup>th</sup> edition. México.

**Rhoden, V.** and S. M. Goldin. 1979. Formation of unilamellar lipid vesicles of controllable dimensions by detergent dialysis. *Biochem.* 18, 4173.

**Schwendener, R. A., M. Asanger and H. G. Weder.** 1981. n-Alkylglucosides as detergents for the preparation of highly homogeneous bilayer liposomes of variable sizes applying defined rates of detergent removal by dialysis. *Biochem. Biophys. Res. comm.* 100, 1055 p.

**Shibata-Seki, T., J. Masai, T. Tagawa, T. Sorin, S. Kondo.** 1996. *Thin Solid Films*; 273: 297 p.

**Schulz-DuBois, O. Erich,** 1983. High-Resolution Intensity Interferometry by Photon Correlation. En: Schulz-DuBois. *Photon correlation Techniques.* Springer Verlag, Berlin Heidelberg. 11-26 pp.

**Vander, D. L. G. S. Kenneth, M. Prabhakar** 1993. Laser-Induced Dye Release from liposomes. *Spectroscopy.* 8 (2)

**Weder, H. G., O. Zunbuehl and Othmar.** 1984. "The preparation of variably sized homogeneous liposomes for laboratory, clinical, and industrial use by controlled detergent dialysis". En: Gregoradis, G. (ed). *Liposome Technology, Preparation of Liposomes.* CRC Press, Inc, Florida, 91-96 p.

**Zumbuehl, O., H. G. Weder.** 1981. *Biochemica Biophysica. Acta* 640, 255.

## APENDICE A

### A.1 Teoría de esparcimiento de luz

En este apéndice se habla brevemente de la teoría de esparcimiento, especialmente del esparcimiento Rayleigh.

Cuando un rayo de luz pasa a través de un medio transparente que contiene pequeñas partículas suspendidas se emite luz en todas direcciones, es decir, se da lugar al fenómeno de esparcimiento. Este fenómeno ocurre en todos los materiales como respuesta a las *fluctuaciones de la constante dieléctrica*.

La teoría de Mie describe fenómenos que presentan fluctuaciones con dependencia espacial. La teoría de Rayleigh describe las fluctuaciones en función del tamaño de las partículas. La teoría de Brillouin describe el esparcimiento en función de las fluctuaciones causadas por ondas acústicas viajeras. La teoría de Ramman describe el esparcimiento en función de las fluctuaciones de origen vibracional y rotacional de moléculas, etcétera. Estas teorías describen el esparcimiento de luz de acuerdo al origen de las fluctuaciones de la constante dieléctrica.

El esparcimiento es un fenómeno electromagnético descrito mediante las ecuaciones de Maxwell [Mohebi, 1994]. Descritas a continuación

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho_{ext}, \quad (14)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0, \quad (15)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}, \quad (16)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}, \quad (17)$$

donde  $\vec{D}$  representa el vector de desplazamiento eléctrico,  $\rho_{ext}$  la densidad de flujo eléctrico,  $\vec{B}$  la inducción magnética,  $\vec{E}$  el vector de campo eléctrico,  $\vec{J}$  la densidad de corriente y  $\vec{H}$  el campo magnético

El vector de desplazamiento dieléctrico  $\vec{D}$ , está definido en función de la constante dieléctrica del material  $\epsilon$ , de la constante dieléctrica en el espacio libre  $\epsilon_0$  y de las fluctuaciones  $\delta$

$$\vec{D} = (\epsilon + \epsilon_0 \delta) \vec{E}. \quad (18)$$

La divergencia de la inducción magnética  $\vec{B}$  igual a cero, permite definirla en términos del potencial vectorial  $\vec{A}$ , mediante la ecuación

$$\vec{B} = \nabla \times \vec{A}. \quad (19)$$

El campo eléctrico  $\vec{E}$  en términos del vector potencial  $\vec{A}$  y el potencial escalar  $\Phi$  se define como

$$\vec{E} = -\frac{\partial \vec{A}}{\partial t} - \nabla \Phi. \quad (20)$$

Ambos campos:  $\vec{B}$  y  $\vec{E}$  en función de éstos potenciales, satisfacen la ecuación de onda, definida por la siguiente expresión:

$$\frac{1}{\mu} \nabla \times \nabla \times \vec{A} + (\varepsilon + \varepsilon_0 \delta) \frac{\partial}{\partial t} \left[ \nabla \Phi + \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \right] = 0, \quad (21)$$

Sustituyendo el operador  $\nabla \times \nabla$  por  $\nabla(\nabla \cdot \vec{A}) - \nabla^2 \vec{A}$  en la ecuación (21)

$$\nabla(\nabla \cdot \vec{A}) - \nabla^2 \vec{A} + (\varepsilon + \varepsilon_0 \delta) \frac{\partial}{\partial t} \left[ \nabla \Phi + \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \right] = 0. \quad (22)$$

Sustituyendo la ecuación de Lorentz  $\nabla(\nabla \cdot \vec{A}) = -\mu \frac{\partial}{\partial t} (\varepsilon + \varepsilon_0 \delta) \nabla \Phi$ , obtenemos la

la ecuación de onda en términos del vector potencial

$$\frac{1}{\mu} \nabla^2 \bar{A} - \varepsilon \frac{\partial^2 \bar{A}}{\partial t^2} = \varepsilon_0 \frac{\partial}{\partial t} \left( \delta \frac{\partial \bar{A}}{\partial t} \right). \quad (23)$$

Si suponemos que la variación de las fluctuaciones es mucho menor que la variación del vector potencial  $\frac{\partial \delta}{\partial t} \ll \frac{\partial \bar{A}}{\partial t}$ , obtenemos

$$\nabla^2 \bar{A} - \frac{n^2 \partial^2 \bar{A}}{c^2 \partial t^2} = \frac{1}{c^2} \delta \frac{\partial^2 \bar{A}}{\partial t^2}. \quad (24)$$

El vector potencial en términos de sus componentes incidente y esparcida  $\bar{A} = \bar{A}_i + \bar{A}_s$ , se define como

$$\bar{A}_i = \frac{1}{2} \left\{ A_i e^{-i(\omega_i t - \bar{k} \cdot \bar{z})} + c.c. \right\}, \quad (25)$$

y

$$\bar{A}_s = \frac{1}{2} \left\{ A_s e^{-i(\omega_s t - \bar{k}_s \cdot \bar{z})} + c.c. \right\}, \quad (26)$$

donde *c. c.* es su complejo conjugado

La divergencia del potencial vectorial incidente  $\nabla \cdot \bar{A}_i$  igual a cero, permite que el potencial de esparcimiento  $\bar{A}_s$ , tenga dependencia radial  $[\bar{A}_s(r, \theta, \phi)]$ . Substituyendo las ecuaciones (25) y (26) en la ecuación (24), obtenemos

$$\nabla^2 \bar{A}_s + \nabla^2 \bar{A}_i - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \bar{A}_s}{\partial t^2} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \bar{A}_i}{\partial t^2} = \frac{1}{c^2} \delta \frac{\partial}{\partial t^2} (\bar{A}_i + \bar{A}_s). \quad (27)$$

Suponiendo que el potencial vectorial incidente  $\bar{A}_i$  es una onda plana, entonces el Laplaciano del potencial vectorial incidente es aproximadamente igual a  $\nabla^2 \bar{A}_i \cong \mu \varepsilon \frac{\partial^2 \bar{A}_i}{\partial t^2}$ .

Además que la variación del potencial esparcido es mucho menor que la variación del potencial incidente,  $\partial \frac{\partial^2 \bar{A}_s}{\partial t^2} \ll \partial \frac{\partial^2 \bar{A}_i}{\partial t^2}$ .

Bajo estas suposiciones la ecuación (27) se representa como

$$\nabla^2 \bar{A}_s - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \bar{A}_s}{\partial t^2} = \frac{\omega_i^2}{c^2} \delta \bar{A}_i, \quad (28)$$

cuya solución es

$$\bar{A}_s(r, t) = \frac{\omega_i^2}{4\pi c^2} \int_v \frac{\delta \left( \bar{z}, t - \frac{|\bar{r}|}{c/n} \right) \bar{A}_i \left( \bar{z}, t - \frac{|\bar{r}|}{c/n} \right)}{|\bar{r}|} dV. \quad (29)$$

donde el tensor de fluctuación  $\delta$  es función de la posición  $\bar{z}$  y del tiempo  $t$  cuando

$t \rightarrow t - \frac{|\bar{r}|}{v}$  ( $v = \frac{c}{n}$ ). La figura 16 representa los vectores de esparcimiento de un haz

incidente  $\bar{k}_i$  sobre un punto (origen) del volumen  $V$ . Si consideramos que  $V$  se divide en

pequeños elementos de volumen  $dV$  que se encuentran a una posición  $\vec{z}$  con respecto al origen. Cada elementos de volumen esparce el haz incidente hacia una trayectoria representada por el vector  $\vec{r}$  (con dirección al observador). El vector  $\vec{R}$  representa la distancia de observación desde un origen.

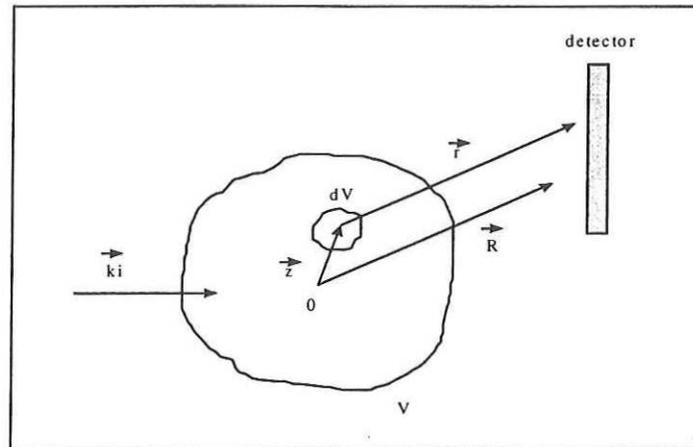


Figura 16. Volumen de esparcimiento

Esto significa que el tensor de fluctuación  $\delta(\vec{z}, t)$  depende del vector de posición  $\vec{z}$  y del tiempo  $t$ , el cual se representa como

$$\delta(\vec{z}, t) = \int d\Omega \int dV k' \Delta(\vec{k}', \Omega) e^{i(\vec{k}' \cdot \vec{z} - \Omega t)}, \quad (30)$$

donde la función  $\Delta(\vec{k}', \Omega)$  representa el *espectro de las fluctuaciones*, la cual depende del vector de esparcimiento  $\vec{k}'$  y de la frecuencia de la fluctuación  $\Omega$ .

La componente temporal de Fourier de la ecuación (30) está dada en términos de la frecuencia de fluctuación.  $\Omega$  y del vector de posición  $\vec{z}$

$$\delta_0(\vec{z}, \Omega) = \int dV \vec{k}' \Delta(\vec{k}', \Omega) e^{i\vec{k}' \cdot \vec{z}}. \quad (31)$$

La ecuación (30) en términos de  $\delta_0(\vec{z}, \omega)$  es igual a

$$\delta(\vec{z}, t) = \int d\Omega \delta_0(\vec{z}, \Omega) e^{-i\Omega t}. \quad (32)$$

Esta ecuación contiene la información de las ondas (suponiendo una sola frecuencia.

La ecuación (32) en términos de componentes de Fourier se representa como

$$\delta_0(\vec{z}, t) = \frac{1}{2} \{ \delta_0(\vec{z}, \Omega) e^{-i\Omega t} + c.c. \}, \quad (33)$$

donde el término c.c. representa el complejo conjugado de la función.

Multiplicando la ecuación(33) por la ecuación (25) obtenemos

$$\delta(\vec{z}, t) \bar{A}(\vec{z}, t) = \frac{1}{4} \{ \delta_0 A_i e^{-i[(\omega_i + \Omega)t - \vec{k}_i \cdot \vec{z}]} + A_i \delta_0^* e^{-i[(\omega_i - \Omega)t - \vec{k}_i \cdot \vec{z}]} + c.c. \}. \quad (34)$$

Por definición las componentes de luz esparcida que representan cambios en bajas frecuencias ( $\omega_i - \Omega$ ) son conocidas como componentes Stokes, y las que cambian en altas frecuencias ( $\omega_i + \Omega$ ) son conocidas como componentes anti-Stokes. La mecánica cuántica predice que las contribuciones Anti-Stokes son muy pequeñas.

Bajo esta consideración el término Stokes a un tiempo de retardo  $t - \frac{|r|}{v}$ , la ecuación

(34) se expresa como

$$\delta(\vec{z}, t) \bar{A}_i(\vec{z}, t) \Big|_{t \rightarrow t - \frac{|r|}{v}} = \left\{ \frac{1}{4} A_i(z) \delta_0^*(z, \Omega) e^{-i[(\omega - \Omega)(t - \frac{|r|}{v}) - \vec{k}_i \cdot \vec{z}]} + c.c. \right\}. \quad (35)$$

Para evaluar éste exponente es necesario expresar  $|r|$  en términos de los vectores  $\vec{z}$  y  $\vec{R}$ , que de acuerdo a la figura 16

$$|r| = |\vec{R}| - \vec{z} \cdot \hat{R}, \quad (36)$$

donde  $\hat{R}$  es el vector unitario de  $\vec{R}$ .

Sustituyendo el valor de  $|r|$  en la ecuación (35) obtenemos

$$\delta(\vec{z}, t) \bar{A}_i(\vec{z}, t) \Big|_{t \rightarrow t - \frac{|r|}{v}} = \frac{1}{4} A_i(z) \delta_0^*(z, \Omega) e^{-i[(\omega_i - \Omega)(t - \frac{|\vec{R}| - \vec{z} \cdot \hat{R}}{v}) - \vec{k}_i \cdot \vec{z}]} + c.c., \quad (37)$$

donde  $k_s$  representa el vector de esparcimiento,  $\vec{k}_s \equiv \frac{(\omega_i - \Omega)}{v} \hat{R}$

Suponiendo que la distancia de observación es mucho mayor que las dimensiones del medio,  $\vec{R} \ll \vec{z}$ , se sustituye la ecuación (37) en ecuación (29)

$$\bar{A}_s(r, t) = \frac{\omega_i^2 A_i(z)}{16\pi^2 c^2} \frac{e^{-i(\omega - \Omega)t} e^{i\vec{k}_s \cdot \vec{R}}}{|\vec{R}|} \int_V \delta_0^*(z, \Omega) e^{-i[\vec{k}_i - \vec{k}_s] \cdot \vec{z}} dV + c.c. \quad (38)$$

En esta ecuación el término que se encuentra fuera de la integral representan una onda esférica.

Por otra parte tenemos que la transformada inversa de la ecuación (31) se expresa como

$$\Delta(\vec{k}, \Omega) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int dV \delta_0(\vec{z}, \Omega) e^{i\vec{k} \cdot \vec{z}}. \quad (39)$$

De igual manera obtenemos la transformada inversa para el término  $\Delta(\vec{k}_i - \vec{k}_s, \Omega)$

$$\Delta(\vec{k}_i - \vec{k}_s, \Omega) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int dV \delta_0(\vec{z}, \Omega) e^{i[\vec{k}_i - \vec{k}_s] \cdot \vec{z}}. \quad (40)$$

Sustituyendo la ecuación (40) en la ecuación (38), tenemos

$$\bar{A}_s(r, t) = \frac{\pi^2 \omega_i^2 A_i(z)}{2c^2 |\bar{R}|} e^{-i\omega_i t} e^{i\bar{k}_i |\bar{R}|} \Delta^*(\bar{k}_i - \bar{k}_s, \Omega), \quad (41)$$

donde la frecuencia de esparcimiento  $\omega_s$  se define como  $\omega_i - \Omega \equiv \omega_s$ , y el vector de

$$\text{esparcimiento } \bar{k}_s \text{ como } \frac{(\omega_i - \Omega)}{v} \hat{R} = |\bar{k}_i| \hat{R} = \left| \frac{2\pi n}{\lambda_i} \right| \hat{R}$$

La variación del vector potencial esparcido  $\bar{A}_s$  permite determinar el valor de campo eléctrico esparcido  $\bar{E}_s = -\frac{\partial}{\partial t} \bar{A}_s = i\omega_s \bar{A}_s$ . Similarmente para el campo eléctrico incidente  $\bar{E}_i = -\frac{\partial}{\partial t} \bar{A}_i = i\omega_i \bar{A}_i$ . Sustituyendo el valor de la frecuencia de esparcimiento definida como  $\omega_s = \omega_i - \Omega$ . Suponiendo que la frecuencia de fluctuación es mucho menor que la frecuencia incidente  $\Omega \ll \omega_i$  entonces la frecuencia incidente es aproximadamente igual a la frecuencia esparcida  $\omega_i \approx \omega_s$ . Bajo esta suposición se obtiene finalmente el campo eléctrico esparcido

$$\bar{E}_s(r, t) = \frac{\pi^2 \omega_i^2 \bar{E}(z)}{2c^2 |\bar{R}|} e^{-i(\omega_i t - \bar{k}_i |\bar{R}|)} \Delta^*(\bar{k}_i - \bar{k}_s, \Omega). \quad (42)$$

## A.2 Esparcimiento Rayleigh

El esparcimiento Rayleigh considera las fluctuaciones como una función temporal

$$\delta(z, t) = \delta(z). \quad (43)$$

Estas fluctuaciones se deben a la presencia de pequeñas partículas en un medio.

La transformada inversa de la ecuación (30) permite obtener el espectro de las fluctuaciones  $\Delta(\vec{k}, \Omega)$

$$\begin{aligned} \Delta(\vec{k}, \Omega) &= \frac{1}{2\pi} \frac{1}{(2\pi)^3} \int dt \int dV \delta(\vec{z}, t) e^{-i(\vec{k} \cdot \vec{z} - \Omega t)}, \\ &= \frac{1}{2\pi} \left[ \int e^{i\Omega t} dt \right] \frac{1}{(2\pi)^3} \int \delta(\vec{z}, t) e^{-i\vec{k} \cdot \vec{z}} dV, \\ &= \delta(\Omega) \left( \frac{1}{2\pi} \right)^3 \int \delta(\vec{z}, t) e^{-i\vec{k} \cdot \vec{z}} dV. \end{aligned} \quad (44)$$

Este resultado describe el esparcimiento como una distribución en forma de esferas Gaussianas.

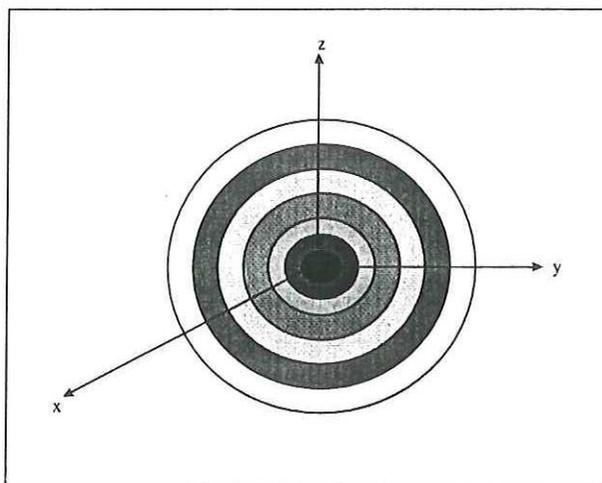


Figura 17. Esfera Gaussiana

Por otra parte sabemos de la sección anterior que la variación de la constante dieléctrica determina el valor de la fluctuación

$$\delta(z, t) = \rho_0 e^{-\left(\frac{|z|^2}{r_0^2}\right)} \quad (45)$$

Substituyendo la ecuación (45) y resolviendo la integral de la ecuación (44) obtenemos el espectro de fluctuación en términos de la constante dieléctrica

$$\Delta(\vec{k}, \Omega) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^3 \delta(\Omega) \rho_0 e^{-\left(\frac{r_0^2 |\vec{k}|^2}{4}\right)} \quad (46)$$

$$\Delta(\vec{k}, 0) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^3 \rho_0 e^{-\left(\frac{r_0^2 |\vec{k}|^2}{4}\right)} \quad (47)$$

$$\Delta(\vec{k}_i - \vec{k}_s, \Omega) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^3 \rho_0 e^{-\left(\frac{r_0^2 |\vec{k}_i - \vec{k}_s|^2}{4}\right)} \quad (48)$$

Finalmente sustituyendo el valor del espectro de fluctuación dado por la ecuación (48) en la ecuación (42) encontramos el campo eléctrico esparcido

$$\vec{E}_s(r, t) = \frac{\omega_i^2 \vec{E}(z) \rho_0}{16\pi c^2 |\vec{R}|} e^{-i(\omega_i t - \vec{k}_i \cdot \vec{R})} e^{-\left(\frac{r_0^2}{4} |\vec{k}_i - \vec{k}_s|^2\right)} \quad (49)$$

bajo las suposiciones:  $\omega_s = \omega_i - \Omega \cong \omega_i$  y  $\vec{k}_s = \frac{(\omega_i - \Omega)}{v} \hat{R} = |\vec{k}_i| \hat{R}$

En resumen la teoría de esparcimiento *Rayleigh* considera que

- El tamaño de la partícula dispersora debe ser más pequeño que la longitud de onda de la luz incidente,  $r_0 \ll \lambda$ .

- La magnitud del vector de esparcimiento sea igual a la magnitud del vector incidente,

$$|\vec{k}_s| = |\vec{k}_i|$$

Bajo éstas condiciones obtenemos que la magnitud de la diferencia vectorial multiplicada por el radio de partícula debe ser menor a 1.

$$r_0^2 |\vec{k}_i - \vec{k}_s|^2 \ll 1. \quad (50)$$

La magnitud de la diferencia de los vectores de onda incidente y esparcido,  $\vec{k}_i$  y  $\vec{k}_s$  respectivamente, es máxima cuando el vector de esparcimiento viaja en dirección opuesta al vector de incidencia,  $\vec{k}_s = -\vec{k}_i$ , por ende la ecuación (50) toma el siguiente valor

$$r_0^2 |\vec{k}_i - \vec{k}_s|_{\max}^2 = 4r_0^2 |\vec{k}_i|^2 = 8\pi^2 \left(\frac{r_0}{\lambda}\right)^2 \ll 1. \quad (51)$$

La condición dada por la ecuación (50) implica que  $e^{-\left(\frac{r_0^2}{4} |\vec{k}_i - \vec{k}_s|^2\right)} \approx 1$ , por lo tanto la onda esparcida esta dada por

$$\vec{E}_s(r, t) = \frac{\omega_i^2 \vec{E}(z) \rho_0}{16\pi c^2 |\vec{R}|} e^{-i(\omega_i t - \vec{k}_i \cdot \vec{R})}, \quad (52)$$

Esta ecuación describe la expansión de ondas esféricas.

En resumen el esparcimiento Rayleigh considera las siguientes condiciones.

- (i) No hay cambios de frecuencia en la luz esparcida
- (ii) La luz esparcida es la misma en todas direcciones.
- (iii) La intensidad de la luz esparcida es proporcional a  $1/\lambda^4$

$$I_s \propto |E_s|^2 \propto w_i^4 \propto \frac{1}{\lambda^4}$$

## APENDICE B

### B.1 Proceso de correlación digital

El correlacionador digital muestra resultados en tiempo real de procesos estacionarios. La información de tales procesos llega a un fotomultiplicador que convierte la señal incidente a pulsos eléctricos los cuales se alimentan a un correlacionador. Aquí se lleva a cabo el conteo de foto eventos  $n(t)$ ,  $n(t+T)$ ,  $n(t+2T)$  ..... ocurridos en un tiempo de muestra  $T(\equiv \Delta t)$ . El producto entre el número de fotones medido al tiempo  $t_i$ , y número de fotones medido con un defasamiento  $\tau_i$  (tiempo de retardo) hasta llegar al intervalo final  $\tau_L = LT$ , con  $L=0,1,2,\dots$ .

$$\hat{S}^{(2)}(\tau_1 = T) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N n(t_i)n(t_{i+1}), \quad N = N_s - 1, \quad (53)$$

$$\hat{S}^{(2)}(\tau_2 = 2T) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N n(t_i)n(t_{i+2}) \quad N = N_s - 2, \quad (54)$$

$$\hat{S}^{(2)}(\tau_3 = 3T) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N n(t_i)n(t_{i+3}) \quad N = N_s - 3. \quad (55)$$

Las anteriores ecuaciones no representan una función de correlación de foto eventos ocurridos en un intervalo. Esta función relaciona de acuerdo con la ecuación de Wiener-Khinchine [Chu, 1991]; la transformada de Fourier.

La figura 18 muestra esquemáticamente el funcionamiento del correlador. La señal de entrada  $n(t_i)$  se divide en dos trayectorias. En una de ellas se introducen defasamientos equivalentes a  $L$  tiempos de retardo. Esto con objeto multiplicar señales en paralelo, representadas por la ecuación (55)

$$\widehat{S}_k^{(2)}(\tau_1 = T) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N n(t_i) n_k(t_{i+1}), \quad (56)$$

$$\widehat{S}_k^{(2)}(\tau_2 = 2T) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N n(t_i) n_k(t_{i+2}). \quad (57)$$

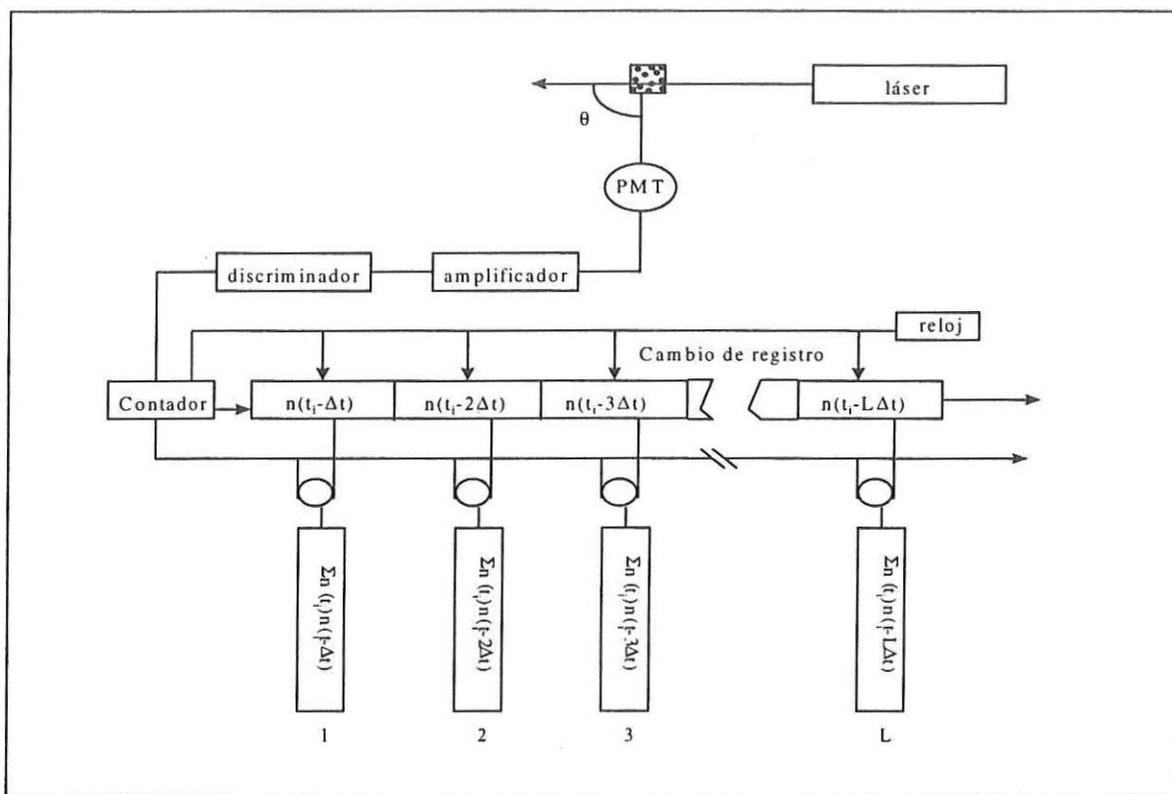


Figura 18. Este esquema muestra el proceso digital de correlación de fotones. El proceso inicia con el esparcimiento de luz de una muestra iluminada. La señal esparcida se colecta a un ángulo  $\theta$  en un sistema de detección formado por un fotomultiplicador; PMT, un amplificador; AMP y un discriminador de señales; DISC. Los fotones contados  $n(t_i)$  en el intervalo de tiempo de muestra ( $\Delta t \equiv T$ ) al tiempo  $t_i$ . La correlación se lleva a cabo multiplicando los fotones de los diferentes intervalos  $n(t_i), n(t_i - \Delta t), \dots$

El proceso de correlación se lleva a cabo en las siguientes etapas:

- Se almacenan pulsos provenientes de una señal fotónica en los  $L$  diferentes cambios de registro  $n(t_i + T)$   $n(t_i + 2T)$  .....  $n(t_i + LT)$ .
- Se multiplica simultáneamente la señal  $n(t_i)$  por cada una de la señales almacenadas en los diferentes cambios de registro;  $n(t_i)n(t_i - T)$ ,  $n(t_i)n(t_i - 2T)$ ,  $n(t_i)n(t_i - 3T)$ , .....,  $n(t_i)n(t_i - LT)$ .
- Estos productos se almacenan en  $L$  contadores (o  $L$  número de canales del correlacionador), mismos que se van sumando a los productos del siguiente intervalo.
- En un intervalo posterior  $t_i + T (\equiv t_{i+1})$ , la longitud de los  $L$  números es dado por  $n(t_i)$ ,  $n(t_i - T)$ ,  $n(t_i - 2T)$ , .....,  $n(t_i - (L-1)T)$ , y el resultado de sus productos  $n(t_i + T)n(t_i)$ ,  $n(t_i + T)n(t_i - T)$ , .....,  $n(t_i + T)n(t_i - (L-1)T)$ , el cual es sumado al producto almacenado anteriormente. Después de  $N_s$  muestreos, los contadores almacenan los productos.

$$\sum_{j=0}^{N_s-1} n(t_{i+j})n(t_{i+j-1}), \sum_{j=1}^{N_s-1} n(t_{i+j})n(t_{i+j-2}), \dots, \sum_{j=1}^{N_s-1} n(t_{i+j})n(t_{i+j-L}) \quad (58)$$

los cuales dan lugar a la función de correlación.