

**ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DETERMINACIÓN DE TAMAÑOS  
DE LIPOSOMAS EN SOLUCIÓN  
MEDIANTE EL ANÁLISIS DE  
LAS FUNCIONES DE AUTOCORRELACIÓN  
ASOCIADAS A LA DISPERSIÓN DE LUZ**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
FÍSICO**

**DAVID ANTONIO BRITO IMBAQUINGO**  
briteins@hotmail.com

**DIRECTOR: MARCO V. BAYAS R., Ph.D.**  
marco.bayas@epn.edu.ec

**QUITO, MAYO 2013**

# DECLARACIÓN

Yo, David Antonio Brito Imbaquingo, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

---

David Antonio Brito Imbaquingo

# CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por David Antonio Brito Imbaquingo, bajo mi supervisión.

---

Dr. Marco Bayas R.  
Director del Proyecto

# AGRADECIMIENTOS

A mis amigos, compañeros y maestros por su apoyo durante mi transcurso por la Carrera de Física, al Grupo de Biofísica y Modelización Molecular y al Dr. Marco Bayas por su apoyo en la última etapa de mi vida Universitaria.

# DEDICATORIA

*A mi familia*



# ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
Introducción	1
<b>1. Liposomas</b>	<b>3</b>
1.1. Componentes y Estructura . . . . .	3
1.2. Propiedades de las membranas . . . . .	6
1.3. Los liposomas como medio de transporte de fármacos . . . . .	8
1.4. Caracterización de liposomas . . . . .	10
<b>2. Dispersión Dinámica de Luz</b>	<b>12</b>
2.1. Teoría de la dispersión de luz . . . . .	12
2.1.1. Dispersión de Luz por una Molécula Pequeña . . . . .	12
2.1.2. Fluctuaciones y Dispersión . . . . .	15
2.1.3. Dispersión de Luz por Cuerpos Grandes Comparados a la Longitud de Onda de la Radiación . . . . .	17
2.2. Aspectos Instrumentales y Analíticos de la Dispersión Dinámica de Luz	19
2.2.1. Función de Auto-Correlación . . . . .	19

2.2.2.	Distribución monodispersa . . . . .	21
2.2.3.	Distribución polidispersa . . . . .	21
<b>3.</b>	<b>Metodología Experimental</b>	<b>25</b>
3.1.	Preparación de Liposomas . . . . .	25
3.1.1.	Soluciones Base . . . . .	26
3.1.2.	Soluciones de Liposomas de Fosfatidilcolina y Colesterol . . . . .	27
3.1.3.	Soluciones de Liposomas Encapsulando Penicilina . . . . .	29
3.1.4.	El papel del ultrasonido . . . . .	29
3.2.	Obtención de las Funciones de Auto-Correlación . . . . .	30
3.2.1.	Programa de cálculo . . . . .	31
3.2.2.	Distribución de tamaños . . . . .	32
3.2.3.	Parámetros de Medición . . . . .	33
3.3.	Obtención de Tamaños Medios . . . . .	35
3.3.1.	Interpretación de Resultados . . . . .	35
3.4.	Espectroscopía de Absorción . . . . .	36
<b>4.</b>	<b>Caracterización de Liposomas</b>	<b>38</b>
4.1.	Método de Cumulantes . . . . .	38
4.1.1.	Primer Truncamiento de Datos . . . . .	41
4.1.2.	Regresión Polinómica . . . . .	41
4.1.3.	Segundo Truncamiento . . . . .	44
4.2.	Inversión de Laplace . . . . .	47
4.3.	Obtención de la Distribución de Tamaños Usando el Ajuste de Mínimos Cuadrados No Negativos . . . . .	49
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	<b>53</b>
5.1.	Suspensiones de Liposomas de Fosfatidilcolina y Colesterol . . . . .	53
5.1.1.	Diámetros Promedio Obtenidos Mediante el Método de Cumulantes	53
5.1.2.	Distribuciones de Tamaños Obtenidas Mediante la Inversión de Laplace . . . . .	55

5.1.3.	Efecto de la Relación de Concentraciones de Fosfatidilcolina y Colesterol en el Tamaño y Estabilidad de los Liposomas . . . . .	56
5.2.	Suspensiones de Liposomas Encapsulando Penicilina . . . . .	59
5.2.1.	Diámetros Promedio Obtenidos Mediante el Método de Cumulantes	59
5.2.2.	Distribuciones de Tamaños Obtenidas Mediante la Inversión de Laplace . . . . .	60
5.2.3.	Efecto en la Distribución de Tamaños de la Relación de Concentraciones de Fosfatidilcolina y Penicilina . . . . .	61
5.3.	Espectroscopía de Absorción . . . . .	63
<b>6.</b>	<b>Discusión y Conclusiones</b>	<b>67</b>
	<b>Referencias</b>	<b>71</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Esquemas de liposoma y lípido . . . . .	4
1.2. Cabezas hidrofílicas de varios fosfolípidos . . . . .	5
1.3. Esquema de la molécula de colesterol . . . . .	6
1.4. Auto-organización de lípidos en una bicapa . . . . .	7
1.5. Comparación de los resultados de Dispersión Dinámica de Luz y Microscopía Electrónica . . . . .	11
2.1. Dispersión de luz polarizada . . . . .	13
2.2. Vector de dispersión . . . . .	15
2.3. Fluctuaciones de la intensidad media dispersada . . . . .	16
2.4. Esquema de un instrumento de dispersión de luz . . . . .	17
2.5. Dispersión por una macromolécula . . . . .	18
2.6. Función de Auto-Correlación de intensidad . . . . .	19
2.7. Función de autocorrelación y distribución monodispersa para esferas de látex . . . . .	22
3.1. Cabina de Flujo Laminar “Streamline” . . . . .	25
3.2. Evaporación del solvente de las muestras . . . . .	27
3.3. Esquema del método de hidratación para la preparación de liposomas . . . . .	28
3.4. Extrusor Avanti Polar Lipids . . . . .	28
3.5. Extrusión a través de membranas de 100 nm . . . . .	28
3.6. Exposición de las muestras preparadas al baño ultrasónico . . . . .	30
3.7. Equipo analizador de tamaños . . . . .	31
3.8. Ingreso de Parámetros . . . . .	34
4.1. Función de Auto Correlación de esferas de látex . . . . .	41
4.2. Regresión polinómica de la Función de Auto-Correlación de las esferas de látex . . . . .	42
4.3. Regresión lineal de la FAC de intensidad . . . . .	44

4.4.	Componente cuadrático de la FAC de intensidad . . . . .	45
4.5.	Conjunto de datos de la FAC de intensidad con comportamiento cuadrático	46
4.6.	Regresión cuadrática de los datos positivos de la FAC de intensidad . .	46
4.7.	Regresión cuadrática de los datos truncados de la FAC de intensidad .	47
4.8.	Algoritmo Mínimos Cuadrados No Negativos . . . . .	52
5.1.	Distribución de tamaños obtenida con el método de mínimos cuadrados no negativos . . . . .	55
5.2.	Distribución de tamaños obtenida con el programa del equipo analizador de tamaños . . . . .	56
5.3.	Evolución temporal del diámetro efectivo de los liposomas . . . . .	57
5.4.	Dependencia de los tamaños de liposomas con la concentración de colesterol . . . . .	58
5.5.	Distribución de Tamaños de una muestra de PC, Chol y PEN . . . . .	60
5.6.	Distribución de Tamaños de una solución de lípidos encapsulando penicilina proporcionada por el equipo analizador de ramaños . . . . .	61
5.7.	Evolución en el tiempo del diámetro efectivo de los liposomas conteniendo penicilina . . . . .	62
5.8.	Dependencia de los tamaños de liposomas con la concentración de penicilina en la solución . . . . .	63
5.9.	Evolución en el tiempo del espectro de absorción de los liposomas conteniendo penicilina . . . . .	64
5.10.	Comparación de los espectros de absorción de las soluciones de liposomas con y sin penicilina . . . . .	65
5.11.	Espectros de absorción de una solución de liposomas antes y después del proceso de extrusión . . . . .	66

# ÍNDICE DE TABLAS

3.1. Especificaciones del software MAS OPTION . . . . .	32
3.2. Parámetros de las Mediciones . . . . .	33
3.3. Nano esferas de tamaño Estándar . . . . .	35
3.4. Resultados de las diferentes corridas de una medición de dispersión de luz	36
3.5. Características del espectrofotómetro . . . . .	37
4.1. Comparación de las características de las distribuciones de tamaños de los liposomas después del segundo truncamiento . . . . .	47
5.1. Características de la distribución de tamaños de liposomas . . . . .	54
5.2. Comparación de las características de la distribución de tamaños de liposomas proporcionadas por el equipo analizador de tamaños y las obtenidas con el método de cumulantes . . . . .	54
5.3. Características de la distribución de tamaños de las muestras con colesterol antes y después del proceso de extrusión . . . . .	57
5.4. Promedio en el tiempo de los parámetros característicos de la distribución de tamaños de liposomas . . . . .	58
5.5. Características de la distribución de tamaños de liposomas encapsulando penicilina . . . . .	59
5.6. Comparación de las características de la distribución de tamaños de liposomas, conteniendo penicilina, proporcionadas por el equipo analizador de tamaños y las obtenidas con el método de cumulantes . .	60
5.7. Características de la distribución de tamaños de las muestras con penicilina antes y después del proceso de extrusión . . . . .	62

# Resumen

Este trabajo presenta un estudio sobre la estabilidad y distribución de tamaños de liposomas preparados mediante el método de hidratación y extrusión. Para el estudio se utilizó un análisis directo de la Función de Auto Correlación. Los liposomas se prepararon utilizando fosfatidilcolina y colesterol con las relaciones de concentración [PC]:[Chol] = 1:0; 1:0,1; 1:0,2; 1:0,3; 1:0,5 de esta manera se analizó la influencia del colesterol en el tamaño y la estabilidad de los liposomas. Los tamaños nanométricos de los liposomas se obtuvieron mediante la extrusión de la solución a través de membranas de policarbonato con poros de 100 nm. Mediante Dispersión Dinámica de Luz se obtuvieron las Funciones de Auto Correlación, asociadas a la suspensión de liposomas, las cuales fueron analizadas usando el método de cumulantes y la inversión de Laplace. Los resultados de este análisis se contrastaron con aquellos entregados por el software del equipo analizador de tamaños. La evolución de los tamaños con el tiempo mostró que las partículas más estables y de menor tamaño se obtienen con la relación [PC]:[Chol] = 1:0,2. La incorporación de colesterol en los liposomas, en la mayoría de relaciones, no resulta en ningún cambio significativo en el diámetro promedio de las muestras extruídas. Sin embargo la adición de cierta concentración de penicilina produce un cambio significativo en el diámetro promedio de las partículas.

## Palabras Clave

Liposoma, transporte de fármacos, encapsulamiento de fármacos, dispersión dinámica de luz, método de cumulantes, inversión de Laplace, función de autocorrelación.

# Abstract

This paper presents a study on the stability and size distribution of liposomes prepared by hydration and extrusion method. A direct analysis of the autocorrelation function was used. Liposomes were elaborated with phosphatidylcholine and cholesterol with concentrations relation [PC]:[Chol] = 1:0; 1:0,1; 1:0,2; 1:0,3; 1:0,5; the influence of cholesterol in the sizes and stability of liposomes was studied. Liposomes nanometric diameters were obtained with extrusion through polycarbonate membranes of 100nm pore size. The liposomes characterization was realized with Dynamic Light Scattering. The technique provide Auto Correlation Functions associated to the liposomes suspension, which were analyzed to determinate the suspension size distribution by the cumulant method and the Laplace inversion. These results were compared with those obtained with the instrument software. The time analysis of the liposomes sizes showed that the concentration relation [PC]:[Chol] = 1:0,2 produced smaller and most stable particles. Moreover cholesterol incorporation into liposome membrane, in the most of relations, doesn't change the diameter of extruded samples. However the addition of a certain concentration of penicillin produce a significant change in the particles diameter.

# Introducción

Las aplicaciones potenciales de los liposomas fueron identificadas a mediados de los años 60. Esto impulsó el desarrollo de algunas empresas farmacéuticas, resultando en la creación de varios fármacos basados en formulaciones de liposomas. La mayoría de estos son medicamentos contra el cáncer que, administrados en forma libre, son tóxicos y su encapsulamiento disminuyen los efectos no deseados [1]. Estas estructuras vesiculares secuestran en su interior parte de la solución con los solutos en suspensión y están rodeadas por una capa de lípidos que funciona como una barrera permeable [2], sus propiedades son similares a aquellas de las células aisladas. Además su estructura, composición química y tamaño pueden ser controladas con los métodos de preparación [1]. Los liposomas como sistemas transportadores de fármacos tienen distintas ventajas sobre las formas convencionales de dosificación, ya que la modificación de su superficie puede ajustar la velocidad de liberación de los fármacos y la afinidad por el sitio de destino [3].

La aplicabilidad de los liposomas requiere de la disponibilidad de una metodología para determinar su tamaño y evaluar su estabilidad. Las técnicas más usadas para la determinación de tamaños de partículas son la Dispersión Dinámica de Luz y la Microscopía Electrónica, que proporcionan resultados similares [4] [5]. Para el presente proyecto de titulación se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz

Los liposomas (vesículas) fueron preparados en el laboratorio de Biofísica y Modelización Molecular del Departamento de Física de la EPN utilizando el método de evaporación e hidratación desarrollado por Bangham y sus colaboradores [2] y que es utilizado en varias investigaciones [6] [7]. El proceso de extrusión se incluyó en la preparación siguiendo los resultados del trabajo de Pantos *et.al.* [8], en el que se incluye también el proceso de sonicación. Las mediciones de dispersión dinámica de luz se realizaron de acuerdo a los procedimientos definidos para el equipo Analizador de

Tamaño de Partícula 90 Plus (Brookhaven Instruments Corporation. USA) [9].

El propósito de este proyecto de titulación fue el de preparar liposomas de tamaños nanométricos y caracterizarlos mediante Dispersión Dinámica de Luz. Para esto se calcularon los tamaños de los liposomas y se encontraron las características de sus distribuciones de tamaños mediante el análisis directo de las funciones de auto correlación obtenidas para la dispersión de luz. Este análisis se realizó utilizando el método de los cumulantes y el método de la inversión de Laplace [12] [30], los resultados obtenidos se compararon con los proporcionados por el software provisto con el equipo analizador de tamaños. Como resultado final se han definido los parámetros que influyen en la formación de los liposomas así como la influencia del colesterol como factor estabilizante.

# Capítulo 1

## Liposomas

### 1.1. Componentes y Estructura

Los liposomas son estructuras que se forman en un medio acuoso y se componen de una bicapa de lípidos que rodea una porción de medio acuoso (Figura 1.1). Estas son pequeñas moléculas anfifílicas compuestas de un grupo químico soluble al agua conectado a una o más colas hidrofóbicas ricas en carbono (Figura 1.1), sus partes hidrofílicas están en contacto con la fase acuosa del medio en el que se encuentran. Existe una gran variedad de grupos de cabezas hidrofílicas: algunos son polares debido a los grupos  $-OH$  o  $-NH_2$ , como la fosfatidiletanolamina; otros están cargados negativamente como el fosfatidilglicerol o la fosfatidilserina. Los grupos de cabezas pueden ser también zwitteriónicos como la fosfatidilcolina ya que, a pH 7, tiene centros de carga positiva y negativa [13] (Figura 1.2). Existen también una gran variedad de colas de hidrofóbicas dependiendo del largo de la cadena (entre 12 y 18 o más átomos de Carbono), o de la presencia de enlaces dobles [14].

Debido a sus largas colas de hidrocarburos, los lípidos son altamente insolubles en agua. La auto-organización es provocada, por la necesidad de esconder estas colas de carbono del agua (Figura 1.4). Cada lípido tiene una concentración crítica distintiva, cuando se colocan en agua en concentraciones mayores a esta concentración crítica, los lípidos se asocian para proteger del agua los segmentos hidrofóbicos. La concentración crítica es menor para lípidos con cadenas de carbono más largas [13]. Un lípido típico con 16 átomos de carbono en cada cadena tendrá una concentración crítica de rango

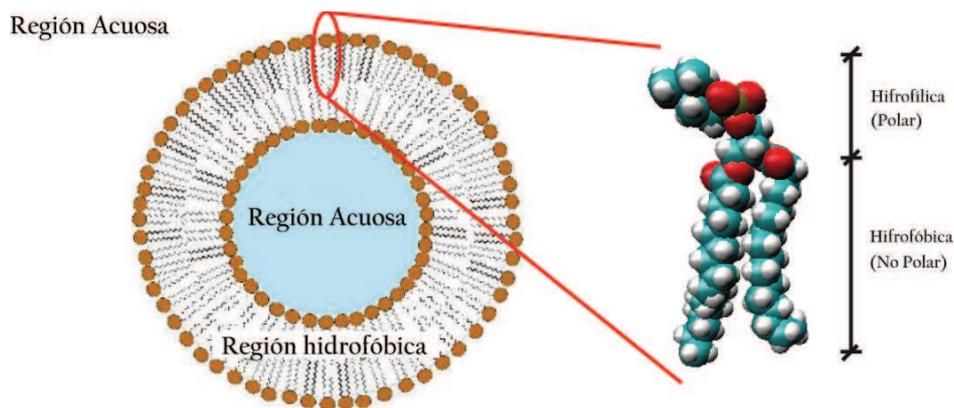


Figura 1.1: Esquema de un liposoma encapsulando la región acuosa que lo rodea y una molécula de lípido de fosfatidilcolina que conforma la bicapa

picomolar.

El colesterol y otros esteroides tienen una estructura con una función diferente. Estos tienen una molécula rígida y voluminosa parecida a la del lípido, compuesta de algunos anillos de hidrocarburos, que son casi del mismo largo que las cadenas de carbono sujetas a los fosfolípidos y glicolípidos (Figura 1.3). Un hidroxilo al final de la molécula es hidrofílico, esto alinea el colesterol en la membrana [15]. El colesterol se adiciona a las membranas en varias cantidades para modificar sus características. Debido a que el colesterol es rígido, este tiende a inhibir el movimiento de los lípidos colindantes, reduciendo la fluidez de la membrana y haciéndola menos permeable a pequeñas moléculas. En general, la composición de una membrana define sus propiedades superficiales, además determinan su estabilidad térmica, fluidez, y su curvatura [13].

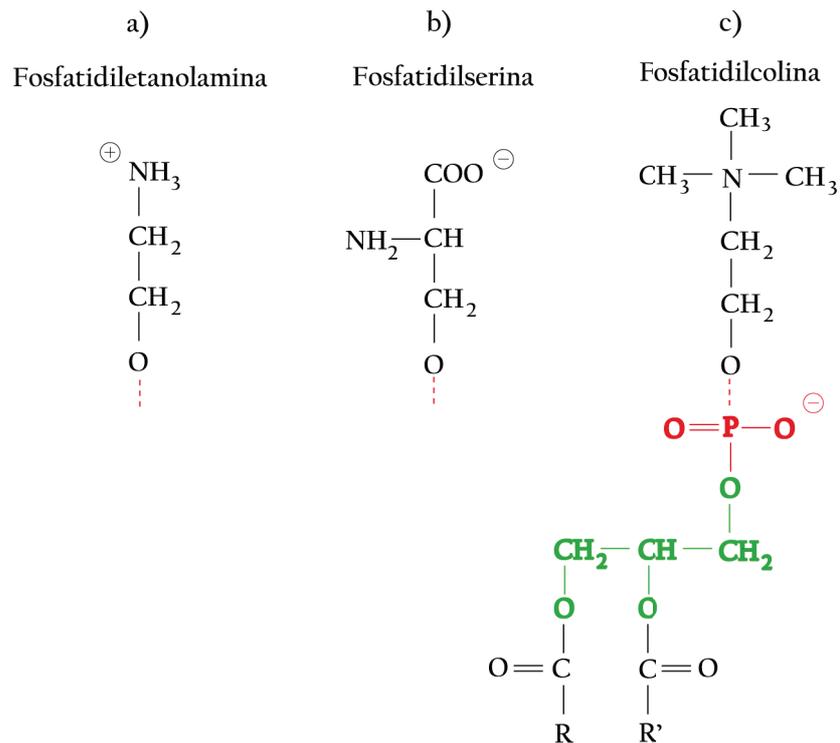


Figura 1.2: Grupos de cabezas hidrofílicas a) polar; b) de carga negativa; y c) zwitteriónicos (esquema de la fosfatidilcolina)

Las formas de las moléculas individuales de los lípidos determinan la forma del agregado auto-organizado [13]. Los lípidos en forma de cuña tienden a preferir la formación de micelas esféricas. Las moléculas cilíndricas, como los de las células, forman extensas bicapas de lípidos (Figura 1.4). La bicapa está compuesta por dos láminas de lípidos, orientadas de tal manera que las cabezas hidrofílicas estén expuestas en las dos superficies de las láminas y las colas de hidrocarburos extendidas en el interior hacia el centro [13].

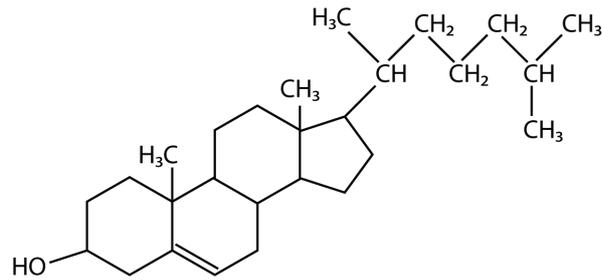


Figura 1.3: Molécula de colesterol compuesta de anillos de hidrocarburos con un hidroxilo hidrofílico al final.

## 1.2. Propiedades de las membranas

Debido a que las bicapas de lípidos están compuestas de muchas moléculas no enlazadas, estas son estructuras dinámicas. Aunque los lípidos adoptan una variedad de fases cristalinas bajo diferentes condiciones, bajo condiciones biológicas típicas, la bicapa es fluida y los lípidos componentes están constantemente fluyendo con respecto a otros lípidos. El movimiento lateral es rápido, mientras que el intercambio de lípidos de una cara de la membrana a la otra no ocurre frecuentemente. La fluidez de la bicapa de lípidos es útil porque permite la reparación espontánea de los daños que pueda sufrir la membrana, además permite una rápida comunicación entre moléculas dentro de la membrana, mientras se difunden e interactúan con las moléculas colindantes [13]. La fluidez de las bicapas depende de la estructura de los lípidos que la componen y de la temperatura. Las bicapas compuestas de un solo tipo de lípidos, y en particular, de lípidos construidos con cadenas saturadas rectas, tienden a cristalizar. Las cadenas con dobles enlaces (no saturadas) y la mezcla entre diferentes lípidos, como el colesterol, inhiben la cristalización y favorecen a la fluidez [13].

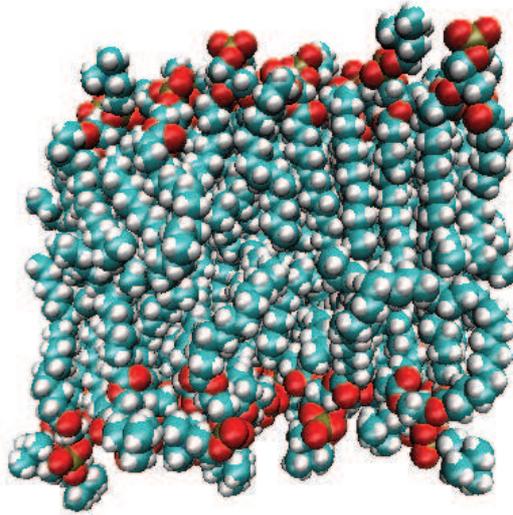


Figura 1.4: Simulación de una porción de membrana en la que los lípidos se auto-organizan en bicapas para proteger las colas de carbono del agua.

La transición de fusión de los lípidos como la fosfatidilcolina ocurre a 200 °C o más. La entalpía a esta alta temperatura de fusión es muy pequeña en comparación con transiciones más tempranas, que ocurren entre 0° y 70°C, dependiendo del grupo específico y de las colas de hidrocarburos. En base a mediciones de difracción de rayos-x y de resonancia magnética nuclear, se conoce que la fusión ocurre en varias etapas. La temperatura de transición más baja envuelve solo la fusión de las colas de hidrocarburos; los grupos de cabezas todavía permanecen en una disposición bidimensional razonablemente bien ordenada [13]. Las colas de hidrocarburos de la fase sólida de menor temperatura están dispuestas en configuración *trans* ordenada. Esta es una estructura en la cuál existe una interacción máxima de Van der Waals entre las colas de hidrocarburos porque están totalmente alineadas a lo largo de la membrana. Las investigaciones de las estructuras de bicapas lipídicas muestran que durante esta primera transición el ancho de la bicapa disminuye porque las colas de las caras opuestas del sandwich comienzan a interdigitar [13]. En presencia del agua y de contracargas iónicas, las cabezas se mantienen unidas en una red de enlaces hidrógenos e iónicos fuertes que típicamente requieren de temperaturas mucho más altas para ser destruidos.

A temperaturas fisiológicas los lípidos se comportan como líquido en las regiones de los hidrocarburos, permitiendo una rápida difusión lateral de moléculas pequeñas

incorporadas, mientras que las cabezas ordenadas estabilizan la estructura de bicapa e impiden que el lípido pase de la fusión simple a gotas esféricas, esto sucede solo por sobre los 200°C. Los factores que influyen en la temperatura de transición para los lípidos incluyen la longitud de la cola de hidrocarburos, la naturaleza de la cabeza, la ausencia de saturación (dobles enlaces) en los hidrocarburos, y las moléculas adicionales, como el colesterol, que están incorporadas a la bicapa. En general las temperaturas de transición reflejan la fluidez que es importante para las funciones biológicas (en el rango de -30° a 100°C) aumentan para colas de hidrocarburos más largas (C12 a C18 o más), disminuyen por la presencia de dobles enlaces, y aumentan con la inclusión del colesterol [13].

El colesterol se encuentra en casi todas las células de los mamíferos; la membrana plasmática de los eritrocitos humanos contiene al menos 45 %mol de colesterol [16]. Estudios de H-NMR y rayos-x han demostrado que el colesterol está orientado perpendicularmente a la superficie de la membrana, con su grupo 3  $\beta$ -hidroxil localizado junto a los grupos éster carbonilo de los fosfolípidos, y el anillo esteroide hidrofóbico orientado paralelo a las cadenas de ácidos de los fosfolípidos [17]. La cola hidrofóbica del colesterol experimenta cambios relativamente rápidos entre varias conformaciones, al contrario del anillo esteroide planar, que está confinado a una sola conformación. El colesterol puede inducir un estado cristalino líquido en los lípidos, que de otra manera forman un estado de gel e inducen un estado menos fluido en las cadenas desordenadas de hidrocarburos [18]. El colesterol disminuye el área molecular de las monocapas de lípidos en estado cristalino líquido, compuestas de hidrocarburos saturados o monoinsaturados, pero no tiene efectos en la fosfatidilcolina [7].

### **1.3. Los liposomas como medio de transporte de fármacos**

El cuerpo se protege mediante un complejo sistema de defensa. Al entrar en el cuerpo, los objetos más grandes causan formación de aglomeraciones y su superficie se inactiva debido al recubrimiento de biomacromoléculas; por otro lado las partículas pequeñas como los microbios y bacterias son devoradas por las células del sistema inmunológico. Esta respuesta del sistema inmunológico ha incentivado esfuerzos sustanciales en el

desarrollo de superficies biocompatibles e irreconocibles por este sistema [20].

Los liposomas se distinguen entre liposomas convencionales y liposomas con propiedades de superficie alteradas. A pesar de que la primera generación de liposomas incluía varias composiciones de lípidos que cambiaban las propiedades fisicoquímicas de los liposomas sin alterar sus propiedades biológicas [20], los estudios de los liposomas sensibles a los anticuerpos (inmunoliposomas dirigidos), que dieron resultados muy alentadores en los estudios *in vitro*, han fallado en aplicaciones *in vivo* [20].

Los beneficios y limitaciones de los liposomas transportadores de fármacos dependen de manera crítica de la interacción de los liposomas con las células y su destino después de la administración [20]. Algunos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la interacción predominante de los liposomas con las células es la adsorción simple y la endocitosis <sup>1</sup>, la fusión celular es menos común [20]. Otra posible interacción es el intercambio de componentes de la bicapa, como lípidos, colesterol, y otras moléculas con componentes de la membrana celular [19].

Ya que los liposomas convencionales son digeridos por células fagocíticas en el cuerpo después de la administración intravenosa, son los vehículos ideales para llevar moléculas de fármacos a estos macrófagos. Este mecanismo se aplica en el suministro de drogas para varias enfermedades parasíticas que normalmente residen en las células del sistema fagocítico. Estas incluyen la Leishmaniasis y varias infecciones por hongos [3]. La Leishmaniasis es una infección parasítica de los macrófagos que afecta a más de 100 millones de personas en las regiones tropicales y frecuentemente es mortal. La dosis eficaz de medicamentos, en su mayoría antimonio, es cercana a la dosis tóxica. Los liposomas se acumulan en la población de células infectadas y, por lo tanto, ofrecen un vehículo ideal para la entrega de fármacos. Actualmente, existen varios estudios con algunas formulaciones liposomales antiparasíticas en humanos. La mayoría de estas formulaciones usan un ionóforo de anfotericina B, los liposomas transportadores de este fármaco son los que han reportado los mejores resultados en terapia humana antifúngica [3].

Algunas toxinas naturales producen la activación de macrófagos. Este proceso puede ser

---

<sup>1</sup>la endocitosis es la introducción de grandes moléculas a la célula, mediante su envolvimiento en un repliegue de la membrana que forma una vesícula para desprenderse e incorporarse al citoplasma

mejorado con el uso de liposomas, ya que algunas moléculas pequeñas con propiedades inmunogénicas no inducen respuesta inmunológica sin ser adheridas a una partícula más grande [19]. Esta activación dura unos pocos días durante los cuales se observa una mayor actividad tumoricida, virocidal, y microbicida. Las expectativas iniciales de la actividad antitumoral resultó ser demasiado optimista, debido al simple hecho de que el número de macrófagos en libre circulación es demasiado pequeño para una terapia eficaz. En la terapia de cáncer, sin embargo, la cirugía o la radioterapia a menudo no elimina todas las células tumorales y en estos casos, cuando la carga tumoral es baja, esta terapia es muy prometedora para la erradicación completa de las células malignas [21].

## 1.4. Caracterización de liposomas

Las aplicaciones tecnológicas de los liposomas requieren de la disponibilidad de una metodología para determinar sus tamaños y evaluar su estabilidad. La técnica más usada para la determinación de tamaños de partículas es la Dispersión Dinámica de Luz, debido a la velocidad con las que pueden realizarse las medidas, el tamaño mínimo de partícula medible y a la no destructividad de las muestras [5].

La microscopía electrónica por congelamiento y fractura ("freeze-fracture") es otro método utilizado para la obtención de las distribuciones de tamaño de los liposomas. Se ha desarrollado un método donde la distribución de tamaños de las vesículas puede ser estimada a partir de la distribución de los tamaños medidos en la imagen de microscopía electrónica [4]. En este método se asume que las vesículas son cortadas aleatoriamente por el plano de fractura. En la Figura 1.5 se comparan las distribuciones obtenidas mediante dispersión de luz (histograma) con las obtenidas mediante microscopía electrónica (línea continua) [4].

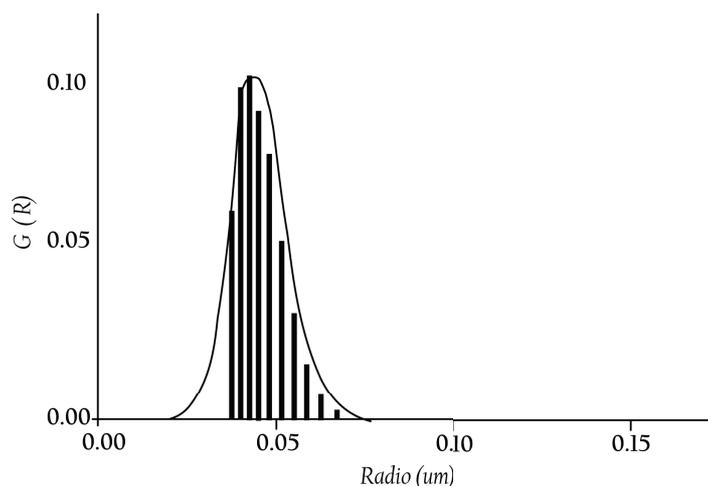


Figura 1.5: Comparación de las distribuciones de tamaños obtenidas con Dispersión Dinámica de Luz (histograma) y Microscopía Electrónica (línea continua). Adaptado de [5].  $G(R)$  son las amplitudes correspondientes a cada radio

Una de las dificultades en el diseño de sistemas de transporte de fármacos es la limitación experimental de caracterizar estos sistemas. Este trabajo desarrolla una metodología para la determinación del tamaño promedio de liposomas en solución, mediante el análisis *directo* de la función de autocorrelación, ya que los resultados entregados por el software analizador de tamaños están sujetos a la elección de varios parámetros para el procesamiento de los datos de dicha función. Se estudia además la estabilidad de los liposomas de fosfatidilcolina y colesterol, con una potencial aplicación en nanomedicina. Las propiedades físico-químicas del fármaco a encapsularse y del material de encapsulamiento determinan la calidad de la nanoemulsión, estas propiedades se han considerado para la definición de una metodología óptima de preparación de los liposomas.

# Capítulo 2

## Dispersión Dinámica de Luz

### 2.1. Teoría de la dispersión de luz

La dispersión de luz se puede entender como el redireccionamiento de la luz que tiene lugar cuando una onda electromagnética (rayo de luz incidente) se encuentra con un obstáculo o inhomogeneidad (liposomas). La onda electromagnética provoca que los orbitales electrónicos dentro de las moléculas constituyentes del liposoma son perturbados periódicamente con la misma frecuencia del campo eléctrico de la onda incidente. La oscilación o perturbación de la nube electrónica resulta en una separación de carga dentro de las moléculas del liposoma (momento dipolar inducido). La oscilación del momento dipolar inducido se manifiesta como una fuente de radiación electromagnética (luz dispersada). La mayoría de luz dispersada se emite a la misma frecuencia que la luz incidente (dispersión elástica).

#### 2.1.1. Dispersión de Luz por una Molécula Pequeña

Consideremos la dispersión de luz monocromática por una molécula. El haz de luz está dirigida a lo largo del eje  $x$  y polarizado con su vector campo eléctrico en la dirección  $z$  (Figura 2.1). La molécula está en  $x = 0$ ,  $y = 0$  y  $z = 0$ . Se asume que la longitud de onda  $\lambda$ , es tan grande como para poner la molécula en el origen sin preocuparse de su tamaño, que es mucho menor que la longitud de onda.

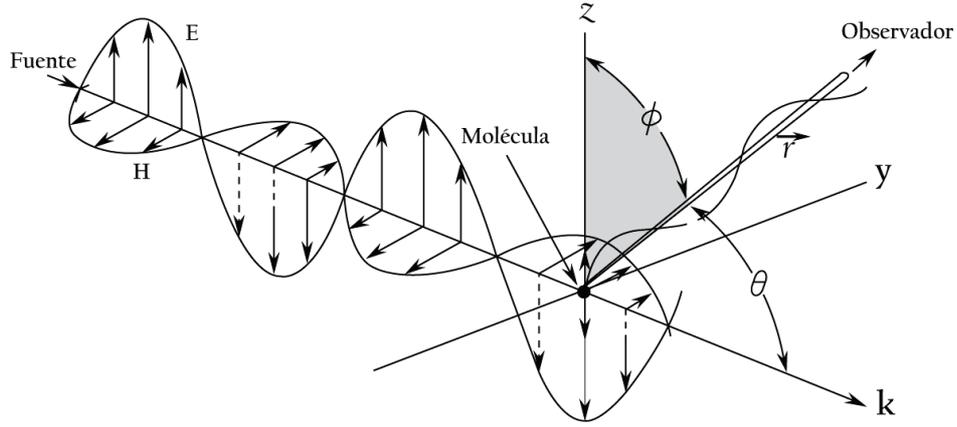


Figura 2.1: Dispersión de radiación (linealmente polarizada) por una molécula. Se muestran los vectores de campo eléctrico y magnético para la radiación incidente. La radiación dispersada está en la dirección dada por  $\theta$  y  $\phi$

Se puede escribir la ecuación para el vector de campo eléctrico para un vector  $\vec{r}$ , para un tiempo  $t$ .

$$\vec{\mathbf{E}}(x, t) = \vec{\mathbf{E}}_0 \exp^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (2.1)$$

En ( $|\vec{r}| = 0$ ) donde se encuentra la molécula el campo eléctrico oscila con el tiempo

$$\vec{\mathbf{E}}(0, t) = \vec{\mathbf{E}}_0 \exp^{-i\omega t} \quad (2.2)$$

Clásicamente, esta oscilación del campo externo produciría la correspondiente oscilación de los electrones en la molécula y consecuentemente generará un momento dipolar oscilante. Si la molécula es isotrópica este momento estará en la dirección del campo eléctrico, es decir

$$\vec{\mathbf{p}} = \alpha \vec{\mathbf{E}} = \alpha \vec{\mathbf{E}}_0 \exp^{-i\omega t} \quad (2.3)$$

Este momento oscilante actuará como una fuente de radiación, el campo de radiación correspondiente está dado por [24]

$$\vec{\mathbf{E}}_s = \frac{k^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{\exp^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)}}{r} (\vec{\mathbf{n}} \times \vec{\mathbf{p}}) \times \vec{\mathbf{n}} \quad (2.4)$$

$\vec{n}$  es el vector unitario en la dirección de observación y  $r$  es la distancia desde el dipolo,  $p$  es el momento dipolar (Ecuación 2.3). La amplitud del campo eléctrico producido por un dipolo oscilante, a una distancia  $r$  del dipolo y a un ángulo  $\phi$  con respecto a la dirección de polarización (eje  $z$ ), está dada por [25]

$$E_s = \left[ \frac{\alpha E_0 4\pi^2 \sin \phi}{4\pi \xi_0 r \lambda^2} \right] \exp^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (2.5)$$

El término en los corchetes de la Ecuación 2.5 es el término de interés. Este representa la amplitud de la onda dispersada. La intensidad de la radiación (flujo de energía por centímetro cuadrado) depende del cuadrado de la amplitud. Se desea comparar la intensidad  $I$  de la radiación dispersada con la intensidad de la radiación incidente  $I_0$ , que es proporcional al cuadrado de su amplitud,  $E_0$ .

$$\begin{aligned} \frac{I}{I_0} &= \frac{(\alpha E_0 \pi \sin \phi)^2 / (\xi_0 r \lambda^2)^2}{E_0^2} \\ &= \frac{\pi^2 \alpha^2 \sin^2 \phi}{\xi_0 r^2 \lambda^4} \end{aligned} \quad (2.6)$$

Esta ecuación dice mucho sobre la luz dispersada. Su intensidad disminuye con  $r^2$ , como la de la radiación de una fuente puntual. La intensidad de la dispersión aumenta rápidamente con la disminución de la longitud de onda. La intensidad depende del ángulo  $\phi$ ; no existe radiación a lo largo de la dirección en la que vibra el dipolo. Esta simple pero muy útil teoría para describir la dispersión de muestras coloidales es la teoría de **Rayleigh-Gans-Debye (RGD)**, que asume que la luz no se refleja en el límite partícula-medio ni se atenúa dentro de la partícula [10]. En algunos casos, se usa radiación no polarizada en los experimentos de dispersión de luz. Ya que se asume como la superposición de algunas ondas independientes polarizadas en direcciones aleatorias en el plano  $yz$ , la superficie de dispersión resultante correspondería a la suma de superficies rotada con respecto una a otra sobre el eje  $k$ . La ecuación para la dispersión de radiación no polarizada se puede obtener promediando sobre todas las direcciones en el plano  $yz$  [10].

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\pi^4 \alpha^2}{2\xi_0 r^2 \lambda^4} (1 + \cos^2 \theta) \quad (2.7)$$

Aquí  $\theta$  es el ángulo entre el haz incidente y la dirección de observación. La distribución de la intensidad dispersada es simétrica hacia delante y hacia atrás. La Ecuación 2.7 proporciona una descripción adecuada de la dispersión de luz por una sola partícula isotrópica, pequeña.

### 2.1.2. Fluctuaciones y Dispersión

Las fluctuaciones espaciales o temporales en el medio dispersivo generan un cambio en la permitividad dieléctrica del medio. Si la permitividad puede expresarse como

$$\varepsilon(\vec{r}) = \varepsilon_0 + \delta\varepsilon(\vec{r}) \quad (2.8)$$

la amplitud del campo dispersado es proporcional a [23]

$$\int \delta\varepsilon(\vec{r}) \exp^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} d^3r \quad (2.9)$$

donde  $\vec{q}$  es el vector de dispersión (Figura 2.2) .

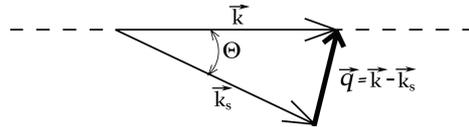


Figura 2.2: Vector de dispersión  $\vec{q}$ .  $\Theta$  es el ángulo de dispersión

La magnitud de este vector se puede obtener de la construcción de la Figura 2.2, que es un triángulo isósceles ( $k = k_s$ ) por lo que se cumple que

$$q = 2k \sin(\Theta/2)$$

la magnitud del vector de onda incidente se puede expresar en función del índice de refracción del medio  $n$

$$k = \frac{2\pi n}{\lambda_0}$$

La magnitud del vector de onda está expresada en la Ecuación 2.10 donde  $\Theta$  es el ángulo de dispersión,  $\lambda_0$  es la longitud de onda del láser en el vacío y  $n$  es el índice de refracción del líquido de suspensión [10].

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin(\Theta/2) \quad (2.10)$$

La luz dispersada por una suspensión de liposomas varía rápidamente en intensidad debido a su movimiento Browniano (Figura 2.3). La variación de la intensidad en tiempos muy cortos puede ser “auto-correlacionada” para extraer información sobre la distribución de velocidades de las partículas que dispersaron la luz.

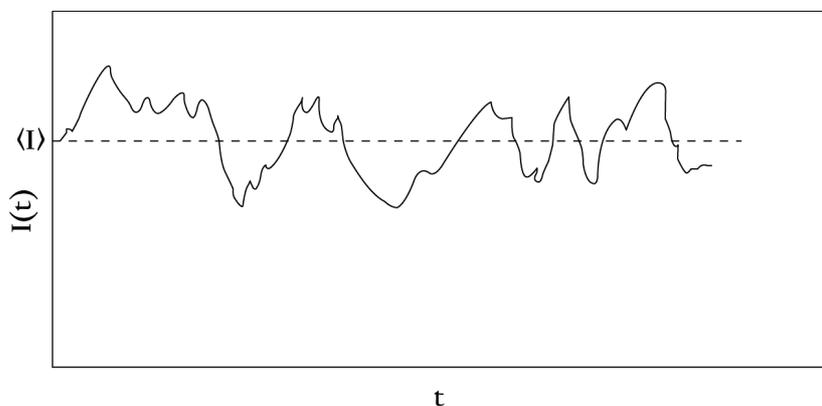


Figura 2.3: Fluctuaciones de intensidad de luz dispersada por pequeñas partículas alrededor de un valor promedio  $\langle I \rangle$

La medición de dispersión de luz normalmente se realiza con un montaje similar al mostrado en la Figura 2.4. Se usa un láser para proporcionar un haz monocromático bien colimado. La intensidad de la luz dispersada a un ángulo dado se compara con la intensidad de la luz incidente. Las soluciones deben ser filtradas o centrifugadas antes de usar ya que pequeñas cantidades de polvo causan el mismo efecto que cuerpos dispersores grandes, llevando a errores considerables.

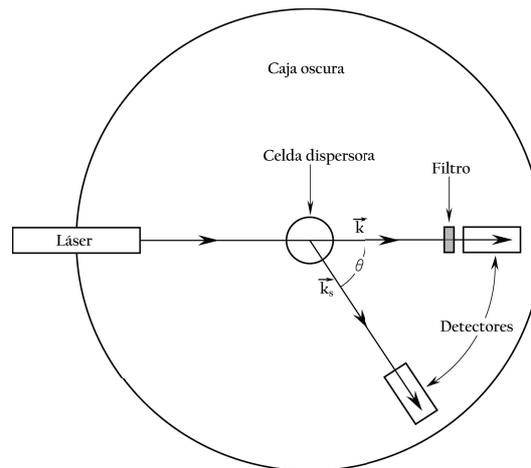


Figura 2.4: Esquema de un instrumento para mediciones de dispersión de luz. Se usa un láser de onda continua y la salida del detector de dispersión (que puede rotar alrededor de la celda) se compara con aquella del detector directo del haz. Se inserta un filtro para reducir la intensidad en este último

### 2.1.3. Dispersión de Luz por Cuerpos Grandes Comparados a la Longitud de Onda de la Radiación

En el caso de que las dimensiones de los cuerpos dispersores sean considerables con respecto a la longitud de onda de la luz usada ( $635\text{ nm}$ ) los experimentos de dispersión pueden ofrecer información sobre su tamaño [22]. Este es el caso de los liposomas que tienen un tamaño promedio aproximado de  $100\text{ nm}$ . La Figura 2.5 muestra un esquema de la dispersión de luz por un cuerpo que tiene un tamaño comparable con la longitud de onda de la luz. La radiación incidente induce dispersión desde dos puntos A y B apartados por una distancia comparable con la longitud de onda, por lo tanto los dipolos dentro de la molécula están oscilando fuera de fase y debido a las diferentes distancias al observador, los dos puntos del ejemplo tendrán una diferencia de fase significativa; por lo que se debe tomar en cuenta la interferencia entre la radiación de estos centros de dispersión que están fijos uno con respecto al otro [22].

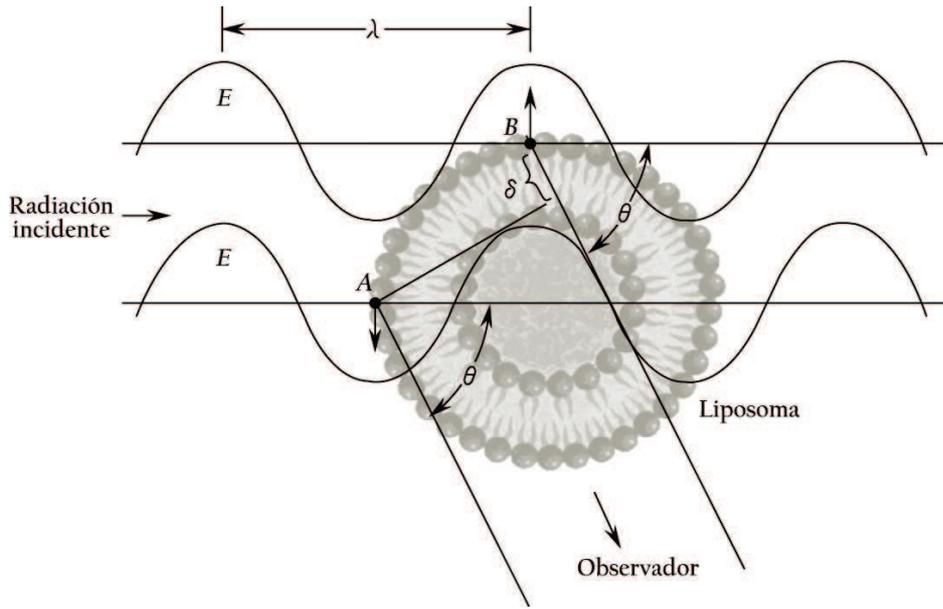


Figura 2.5: Dispersión por un cuerpo de tamaño comparable a  $\lambda$ . Se muestran dos puntos dispersores en A y B. La fase de la radiación (y por lo tanto la de los dipolos inducidos) es diferente en los dos puntos, al igual que la distancia al observador.

El cálculo de este efecto para un liposoma debe incluir la interferencia entre la luz dispersada por todos sus puntos en conjunto y, debido a que los liposomas están orientados aleatoriamente en la solución, la dispersión total debe ser promediada sobre todas las orientaciones. Por conveniencia, se expresa el resultado general definiendo una función  $P(\theta)$ , que describe la relación entre la dispersión en cierto ángulo  $\theta$  con la dispersión que tendría la misma partícula si fuese mucho más pequeña que  $\lambda$  [10].

$$P(\theta) = \frac{\text{dispersión por un cuerpo real a un ángulo } \theta}{\text{dispersión por un cuerpo hipotético a un ángulo } \theta} \quad (2.11)$$

Ya que el supuesto cuerpo puntual exhibirá dispersión de Rayleigh, se puede calcular la dispersión de luz de una solución de grandes partículas simplemente multiplicando la Ecuación 2.7 por  $P(\theta)$ .

## 2.2. Aspectos Instrumentales y Analíticos de la Dispersión Dinámica de Luz

### 2.2.1. Función de Auto-Correlación

Experimentalmente, las características del medio dispersivo se manifiestan en las funciones de autocorrelación del campo dispersado, la más utilizada en estudios de dispersión de luz es la función de autocorrelación para la intensidad [26]

$$G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \langle I(0)I(\tau) \rangle \quad (2.12)$$

Para calcular la Función de Auto Correlación (FAC)  $G(\tau)$  se mide la intensidad en intervalos de tiempo más pequeños que el tiempo de una fluctuación típica y se obtiene la acumulación del producto de las intensidades en función de  $\tau$  como se muestra en la siguiente figura

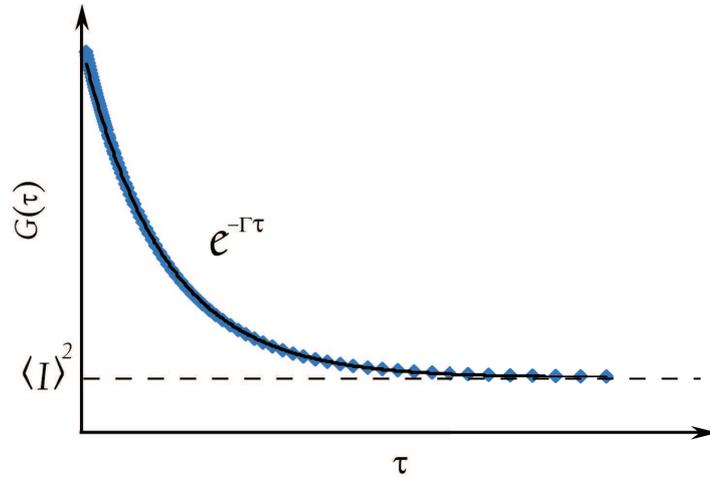


Figura 2.6: Función de Auto-Correlación de la intensidad dispersada

Ya que  $I(t) \propto E_s(t)$  entonces

$$I(t) \propto \int \delta\varepsilon(\vec{r}) \exp^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} d^3r \quad (2.13)$$

Para el caso de elementos dispersores esféricos y si consideramos que las fluctuaciones obedecen a una distribución gaussiana,  $G(\tau)$  está dado por [26]

$$G(\tau) = \langle I \rangle^2 + \langle I \rangle^2 \exp^{-2q^2 D_T \tau} \quad (2.14)$$

$q$  es el módulo de vector de dispersión dado por la Ecuación 2.10 y  $D_T$  es el coeficiente de difusión de los elementos dispersores,  $G(\tau)$  también se puede escribir como [12]

$$G(\tau) = B + f \exp^{-2\Gamma\tau} \quad (2.15)$$

donde  $B = \langle I \rangle^2$  es la línea base (línea entrecortada de la Figura 2.6),  $f$  es una constante del instrumento (intersección de la curva exponencial con el eje vertical de la Figura 2.6) y  $2\Gamma$  es el recíproco del tiempo de decaimiento de las fluctuaciones.  $G(\tau)$  se normaliza dividiendo la Ecuación 2.15 para la línea base  $B$ , dando lugar a la FAC normalizada [12]

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + a[g(\tau)]^2 \quad (2.16)$$

Esta ecuación relaciona la FAC del campo eléctrico  $g^{(1)}(\tau)$  con la FAC de la intensidad medida  $g^{(2)}(\tau)$ , mediante una constante del instrumento  $a$  que ahora está entre 0 y 1 debido a la normalización. Hay que notar que cualquier detector fotoeléctrico es sensible a la intensidad de la luz, que es igual al cuadrado de la amplitud del campo [12]. La FAC normalizada del campo eléctrico  $g(\tau)$  puede escribirse como

$$g(\tau) = G_0 \exp^{-\Gamma\tau} \quad (2.17)$$

la constante de decaimiento  $\Gamma$  se relaciona con el coeficiente de difusión traslacional de las esferas  $D_T$  mediante

$$\Gamma = D_T q^2 \quad (2.18)$$

$G_0$  es el valor de la función con  $g(\tau = 0)$ . El parámetro importante en la Ecuación 2.17 es  $\tau$ , que no varía con la intensidad dispersada  $\langle I(q) \rangle$ . Así, para medidas de DLS, la intensidad absoluta es secundaria, siempre y cuando sea lo suficientemente grande para completar el experimento.  $D_T$  está relacionado directamente al diámetro hidrodinámico  $d_h$  mediante la relación de Stokes Einstein [27].

$$D_T = \frac{k_B T}{3\pi\eta(T)d_h} \quad (2.19)$$

Aquí  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\eta(T)$  es la viscosidad del líquido de suspensión (dependiente de la temperatura, por lo que se requiere una temperatura constante durante las mediciones) y  $d_h$  es el diámetro hidrodinámico de la partícula dispersora que es mayor que el diámetro de la partícula seca debido a la “doble capa” que se forma en la superficie de las partículas cargadas. Los iones alrededor de la partícula forman una región difusa que se mueve con la partícula.

### 2.2.2. Distribución monodispersa

El caso más simple de una FAC consiste en un decaimiento exponencial como el de la Figura 2.6. A partir de esta información se puede obtener  $g(\tau)$ , la cuál puede ajustarse usando la inversión de Laplace. El valor de  $G_0$  típicamente varía desde 0.1 hasta 0.9, dependiendo de la configuración óptica. El diámetro de las partículas se calcula a partir de  $D_T$  en la ecuación 2.19 y es un diámetro hidrodinámico [12].

La función que entrega el equipo analizador para una muestra de esferas de látex se muestra en la Figura 2.7 a). para este caso el diámetro efectivo (hidrodinámico) calculado de la ecuación 2.19 es de  $94,5 \text{ nm}$  y la distribución de tamaños (Figura 2.7 b) tiene un máximo correspondiente a  $87,9 \text{ nm}$ , un ancho de  $19,2 \text{ nm}$  y un índice de polidispersidad de 0,037.

Los resultados de las muestras monodispersas se pueden comparar directamente con otras técnicas como la microscopía electrónica, ya que existe un solo diámetro “promedio”. Para partículas no esféricas los resultados pueden ser interpretados en términos del diámetro de la esfera equivalente, igual al diámetro hidrodinámico de Stokes-Einstein, o el coeficiente de difusión puede ser interpretado en términos de elipsoides de revolución [27].

### 2.2.3. Distribución polidispersa

La interpretación de datos de las muestras polidispersas es considerablemente más difícil. Dado que la técnica no cuenta a las partículas individualmente, la información de la distribución de tamaño debe ser obtenida de la deconvolución de la suma sobre todos los exponenciales individuales que contribuyen a la FAC medida. La deconvolución

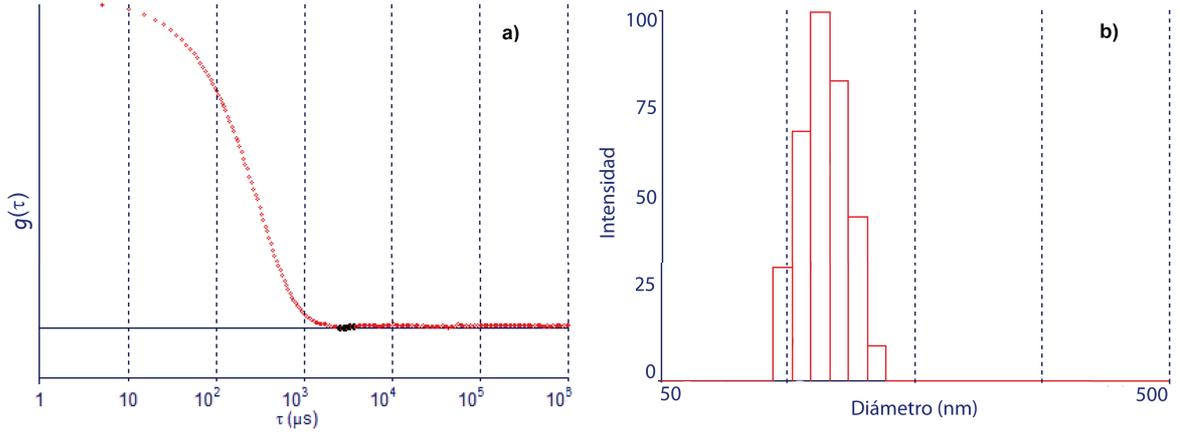


Figura 2.7: a) FAC proporcionada por el analizador de tamaños de partícula para una muestra estándar de partículas de látex. b) Distribución monodispersa de tamaños de una muestra estándar de partículas de látex, tiene un máximo correspondiente a  $87,9 \text{ nm}$ , un ancho de  $19,2 \text{ nm}$ .

general de una suma de exponenciales individuales es difícil. El problema puede ser resumido por las ecuaciones 2.20 y 2.21 que definen el campo de la FAC normalizado  $g(\tau)$  como la suma de  $m$  tamaños de partícula, cada uno de los cuales contribuye con una fracción  $A(\Gamma_i)$  al tamaño de clase  $i$ -ésima [12]

$$\begin{aligned}
 g(\tau) &= A(\Gamma_1) \exp(-\Gamma_1\tau) + A(\Gamma_2) \exp(-\Gamma_2\tau) + A(\Gamma_3) \exp(-\Gamma_3\tau) + \dots \\
 &= \sum_{i=1}^m A(\Gamma_i) \exp(-\Gamma_i\tau)
 \end{aligned} \tag{2.20}$$

Aquí  $\Gamma_i$  es el valor definido en la ecuación 2.18.  $g(\tau)$  está definido en la ecuación 2.21 mediante la integración en todo el rango de tamaños de partícula [12].

$$g(\tau) = \int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} A(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \tag{2.21}$$

donde  $A(\Gamma)$  representa la distribución de anchos de línea de la distribución de tamaños de partículas.  $\Gamma_{min}$  y  $\Gamma_{max}$  definen el rango del ancho; en principio,  $\Gamma_{min} = 0$  y  $\Gamma_{max} = \infty$ . La función  $g(\tau)$  se puede calcular a partir de una distribución conocida  $A(\Gamma)$ , pero la transformación inversa para extraer  $A(\Gamma)$  a partir de  $g(\tau)$  es extremadamente difícil de realizar. En presencia de ruido, existen diversas soluciones para la forma funcional de

$A(\Gamma)$ . Una repetición de la medición sobre la misma muestra producirá un  $g(\tau)$  un poco diferente debido a la contribución de ruido, resultando en una diferente  $A(\Gamma)$  y por lo tanto en una distribución de tamaño diferente  $A(d)$ . Este comportamiento puede hacer que los resultados de un instrumento DLS sean aparentemente “no reproducibles”. Por estas razones físicas fundamentales la DLS no es considerada como una técnica de alta resolución para determinar el tamaño de las partículas. Las soluciones numéricas de la ecuación 2.21 han demostrado que  $A(\Gamma)$  se puede calcular en retrasos de tiempo espaciados exponencialmente [28]. El método de muestreo exponencial [12] introduce un parámetro  $\omega$  que limita la resolución de  $A(\Gamma)$  para un nivel determinado de ruido en la ecuación 2.22.

$$\Gamma_{i+1} = \Gamma_i \exp \frac{\pi}{\omega} \quad (2.22)$$

Aquí  $\omega$  es el valor más grande para una cantidad de ruido en  $g$  y por lo tanto define la mejor resolución posible para  $\Gamma_i$  y  $\Gamma_{i+1}$ . Ejemplo: si  $\omega = 3.144$ ,  $\Gamma_{i+1}/\Gamma_i = 2,71$ ; si  $\Gamma_{i+1}$  corresponde a un tamaño de 500 nm, el siguiente pico no puede estar más cerca de 184 nm ( $500/2.71$ ) o 1050 nm ( $500 \times 2,71$ ). Si la rutina de inversión requiere una resolución más alta de la que puede ser provista por la FAC, las distribuciones de  $\Gamma$  exhibirán máximos adicionales y valores negativos para  $A(\Gamma)$ . El límite práctico para la relación  $\Gamma_{i+1}/\Gamma_i$ , es 2 y la mayoría de las restricciones que son necesarias aplicar son las de no negatividad (sólo se permite  $A(\Gamma)$  cero o positivos). Un ejemplo de la inversión eficaz es un software llamado CONTIN [29] [30], que es una transformada inversa de Laplace generalizada con restricciones. CONTIN contiene una rutina de mínimos cuadrados no negativos (NNLS) <sup>1</sup>, que puede ser utilizado efectivamente como un programa de rápida ejecución para obtener distribuciones de tamaño rápidas en tiempo real durante la adquisición de datos [12].

Aparte del contenido de ruido de la FAC, los errores de la línea de base aportan una cantidad significativa de ambigüedades a cualquiera de las rutinas de transformación, la normalización iterativa repetida de la FAC puede mejorar la estabilidad de los resultados. Sólo unos pocos parámetros de la distribución pueden ser calculados a partir de las mediciones experimentales de la función de correlación [12], por lo que pueden ser consideradas relativamente insensibles a la distribución de tamaño

---

<sup>1</sup>Es una técnica en la que se intenta encontrar la función que mejor se ajuste a los datos de acuerdo con el criterio de mínimo error cuadrático y que cumpla con la restricción de no tener elementos negativos en la solución

particular y sólo se pueden obtener algunos momentos de la distribución, salvo para las muestras monodispersas en las que la técnica funciona muy bien. Por esta razón el presente trabajo presenta un método independiente para obtener el diámetro promedio y algunas características de las distribuciones de tamaños a partir de las funciones de autocorrelación.

# Capítulo 3

## Metodología Experimental

### 3.1. Preparación de Liposomas

Todas las preparaciones se llevaron a cabo en una Cabina de Flujo Laminar “Streamline” (Figura 3.1) para evitar la contaminación y la presencia de “polvo” en las muestras. Todo el material de vidrio y las cubetas utilizadas en las mediciones de dispersión fueron lavadas meticulosamente con agua desionizada y alcohol y se las secó usando la cabina de flujo laminar, antes de su uso.

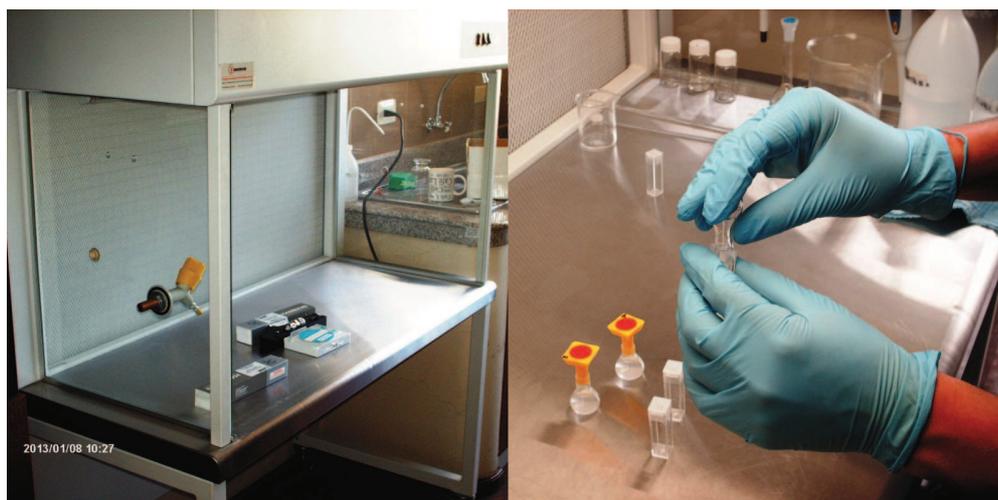


Figura 3.1: Cabina de Flujo Laminar “Streamline” (velocidad de flujo de aire  $95\text{ pie}/\text{minuto} = 0.4826\text{ m}/\text{s}$ ) dentro de la que se prepararon las muestras

Se prepararon muestras variando la relación de concentraciones de fosfatidilcolina (PC) y colesterol (Chol) mediante la variación del volumen de la solución base de colesterol, para analizar los efectos del colesterol en la formación de los mismos y definir la relación que da mayor estabilidad a la suspensión. Estos componentes son los más usados en trabajos previos debido a la estabilidad de los liposomas resultantes [8]. Una vez que se obtuvo una relación efectiva, se realizaron preparaciones de muestras con concentraciones fijas de PC y Chol y se varió la concentración de penicilina (PEN).

### 3.1.1. Soluciones Base

La solución base de fosfatidilcolina <sup>1</sup> (Avanti Polar Lipids, Inc. pureza > 99 %) se preparó diluyendo todo el contenido de una ampolla de 100 mg de lípidos en 5 mL de cloroformo (Fisher Scientific, C298-4) obteniéndose una concentración final de 25.8 mmol/L. La solución base de colesterol<sup>2</sup> (Avanti Polar Lipids, Inc. pureza > 99 %) se preparó pesando 18.5 mg del material, se enceró la balanza analítica usando un matraz de 5 mL y se colocó el colesterol (386.66 g/mol) en el matraz para pesarlo. Se añadieron 5 mL de cloroformo para obtener una concentración de 9,57 mmol/L. Para preparar la solución base de penicilina<sup>3</sup> se pesaron 20 mg de PEN (981.19 g/mol) en la balanza analítica usando un matraz aforado de 5mL para contener la solución y se añadieron 5 mL de cloroformo aforando en el matraz, se obtuvo una concentración de 4.07 mmol/L. Debido a que los fosfolípidos tienen una baja temperatura de fusión resulta difícil manipularlos a temperatura ambiente, para evitar errores de medición en el peso de los lípidos, se recomienda diluir todo el contenido de los envases en cierto volumen de solvente, para alcanzar la concentración deseada.

La solución buffer se preparó pesando 1.6 g de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 10.4 g de fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y 17.5 g de cloruro de sodio (NaCl) sobre un mismo plato y encerando la balanza cada vez que se terminaba de pesar un componente, se los llevó a un matraz que se aforó con 1000 mL de agua desionizada y se agitó la solución hasta disolver los cristales formados. Se obtuvo una solución salina buffer-fosfato (PBS 50 mM de fosfato y 300 mM de cloruro de sodio)

---

<sup>1</sup>Toda la información de los lípidos se encuentra en la página web de Avanti Polar Lipids “Soy PC L- $\alpha$ -phosphatidylcholine” Código: 840054P

<sup>2</sup>La página web de Avanti Polar Lipids proporciona la información del colesterol “cholesterol (plant derived)” Código: 700100P

<sup>3</sup>Penicilina G Benzatínica 11.PENGBE.E “CC LABORATORIOS”

con pH 7.

### 3.1.2. Soluciones de Liposomas de Fosfatidilcolina y Colesterol

Se prepararon varias muestras de liposomas mezclando las soluciones base de fosfatidilcolina con concentración  $25,8 \text{ mmol/L}$  y de colesterol con concentración  $9,57 \text{ mmol/L}$ . Las soluciones base se mezclaron manteniendo el número de moles de fosfatidilcolina en  $0,002 \text{ mmol}$  y variando el número de moles de colesterol, para tener las siguientes relaciones de concentraciones  $[\text{PC}]:[\text{Chol}] = 1:0; 1:0,1; 1:0,2; 1:0,3; 1:0,5$ . Usando el flujo de aire de la cabina de Flujo Laminar se evaporó el solvente orgánico de las 3 preparaciones durante 15 horas a temperatura ambiente para formar una película delgada de lípido seco (Figura 3.2) en el costado redondo de los matraces aforados de 5 mL que se muestran en la Figura 3.7 b.

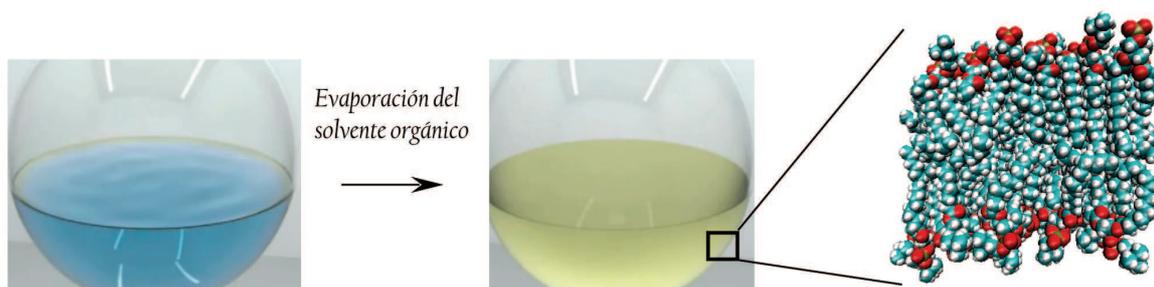


Figura 3.2: Evaporación del solvente de las muestras

Posteriormente, se hidrató la película seca con solución buffer (50 mM fosfato, 300mM NaCl) durante 2 horas a  $50^{\circ}\text{C}$  (Figura 3.3), agitando la muestra periódicamente para disolver la película formada en la pared del contenedor. Se llevaron las muestras al baño ultrasónico durante 10 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$  (Figura 3.6) y se realizaron mediciones iniciales de dispersión de luz.

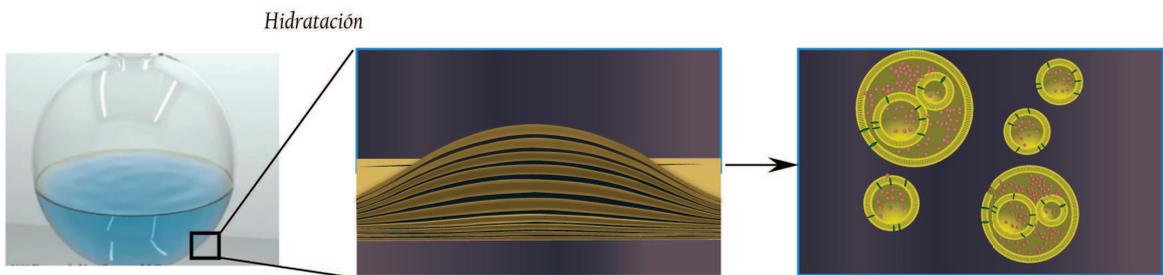


Figura 3.3: Método de hidratación para la preparación de liposomas

Se realizaron 10 ciclos de extrusión, que es el paso de una solución a través de un filtro aplicando cierta presión, para este proceso se utilizaron un miniextrusor (Avanti Lipids, Figura 3.4) y membranas de PoliCarbonato (Whatman) con tamaño de poro de 100 nm (Figura 3.5) para reducir y homogenizar los diámetros de las vesículas. Después de este procedimiento se volvieron a realizar las mediciones de Dispersión de Luz.



Figura 3.4: Mini Extrusor Avanti Polar Lipids

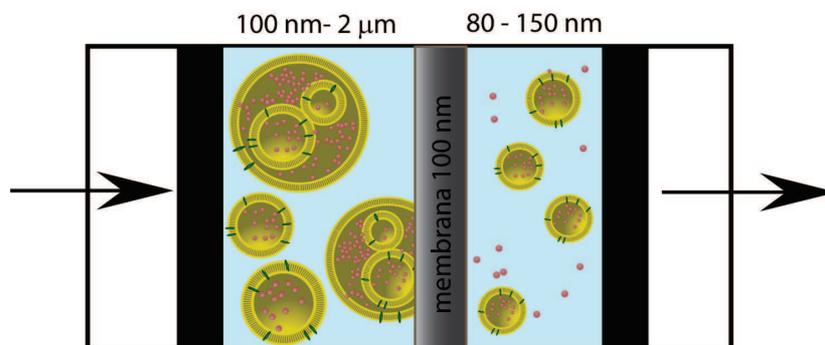


Figura 3.5: Extrusión de la solución de liposomas a través de membranas con poros de 100 nm

Una vez que se encontró la relación de concentraciones [PC]:[Chol] más efectiva, se procedió a trabajar con esta relación y variar la relación con la concentración de penicilina siguiendo el mismo procedimiento, pero agregando diferentes volúmenes de solución base de PEN en la mezcla que va a ser evaporada

### 3.1.3. Soluciones de Liposomas Encapsulando Penicilina

De manera similar que en la preparación de las soluciones de PC y Chol, en las que se varía la concentración de colesterol en la solución de lípidos, se partió de soluciones base de fosfolípidos (PC y Chol) y penicilina (PEN) preparadas en 5 mL de cloroformo, con las siguientes concentraciones de PC [25.8 mmol/L], Chol [9.57 mmol/L] y PEN [4.07 mmol/L]. Al evaporar el solvente orgánico de la mezcla de soluciones base durante 15 horas a temperatura ambiente se formó una película delgada de lípido seco en el fondo del recipiente, se hidrató la película con solución buffer 50 mM fosfato y 300mM NaCl durante 2 horas a 50°C agitando la muestra cada cierto tiempo para disolver la capa formada en el fondo del recipiente. Se llevaron las muestras al baño ultrasónico durante 30 minutos a 50°C y posteriormente se realizaron 10 ciclos de extrusión a través de una membrana con tamaños de poro de 100 nm, usando un miniextrusor (Avanti Lipids). Las muestras se prepararon manteniendo las concentraciones de la solución base de PC (0,001 mmol) y Chol ( $5 \times 10^{-4}$  mmol) y variando el volumen, o la relación de concentraciones [PC]:[PEN] entre 1:0,2; 1:0,1 y 1:0,05.

### 3.1.4. El papel del ultrasonido

El tamaño de los liposomas es un parámetro fundamental en los estudios biofísicos cuantitativos, de entrega liposomal de drogas, y de muchas otras aplicaciones en la medicina y la biología. Se han desarrollado varios métodos para manipular el tamaño de los liposomas como la diálisis por detergente [32], la extrusión [8], la inyección de alcohol [33], y la sonicación [8] que es la exposición a ultrasonido (Figura 3.6) . A pesar de que el ultrasonido ha sido utilizado desde la década de 1960 para la fabricación de liposomas artificiales, poco se sabe sobre el mecanismo por el que el tamaño promedio de los liposomas disminuyen con la exposición a ultrasonido. Se ha postulado que la energía ultrasónica rompe de manera aleatoria y uniforme los liposomas grandes en otras secciones discoideas, más pequeñas, y de doble capa. Estos fragmentos se pliegan

en liposomas termodinámicamente estables. Al relacionar la presencia y el tipo de cavitación con el tamaño de los liposomas, se obtiene que el aumento de la intensidad del ultrasonido a presión atmosférica disminuye el tamaño promedio de las vesículas [6] [34].

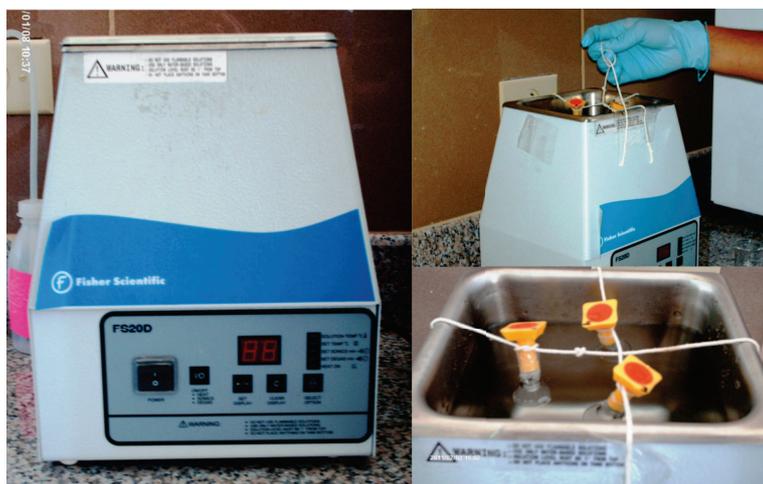


Figura 3.6: Exposición de las muestras preparadas al baño ultrasónico

### 3.2. Obtención de las Funciones de Auto-Correlación

Las medidas de dispersión dinámica de luz se realizaron utilizando un Analizador de Tamaño de Partícula 90 Plus (Brookhaven Instruments Corporation. USA), <sup>4</sup> que se muestra en la Figura 3.7 a. Se usaron 3 mL de las muestras preparadas en una cubeta de acrílico de 4 mL (Figura 3.7 b y c). El instrumento se utilizó para determinar las funciones de autocorrelación, y a partir de estas el “tamaño” de los liposomas, en términos del diámetro hidrodinámico  $d_h$  en solución, este parámetro está inversamente relacionado con el coeficiente de difusión traslacional,  $D_T$  (Ecuación 2.19). Las muestras se midieron a 25.0 ° C en modo de “Thin Shell”, en el que se toma en cuenta que las partículas dispersoras tienen una capa delgada que encierra un medio con el mismo índice de refracción que el medio que la rodea, la dispersión de la luz fue detectada a 90° y los datos recogidos de forma automática, por lo general con una duración de

<sup>4</sup>Equipo provisto por la Facultad de Ingeniería Mecánica

medición de 5 minutos. Se analizaron las funciones de autocorrelación de dos maneras, utilizando el programa “Brookhaven Instruments Particle Sizing Software” y mediante el método de cumulantes, para comparar las características de las distribuciones de tamaño obtenidas.



Figura 3.7: a) Equipo analizador de tamaños 90 Plus (Brookhaven Instruments Corporation. USA). b) Cubetas de acrílico y matraces usados para la evaporación del solvente. c) Cubetas de acrílico usadas para la medición

### 3.2.1. Programa de cálculo

El software “MAS Particle Sizing Software” (Beta Version 1.13) o “MAS OPTION” para el control del equipo y análisis de datos está escrito para su uso en ambiente Microsoft Windows, con una versión DOS también disponible.

La técnica empleada - Espectroscopía de correlación fotónica (PCS) o dispersión cuasielástica de luz (QELS) - se basa en el análisis de la correlación de las fluctuaciones alrededor de la intensidad promedio de luz dispersada. Sus ventajas se describen en las especificaciones de la Tabla 3.1.

<i>Rango de Tamaños</i>	<i>2nm a 3µm</i>
<i>Rango del Coeficiente de Difusión</i>	<i>10<sup>-6</sup> a 10<sup>-9</sup> cm<sup>2</sup>/seg</i>
<i>Precisión</i>	<i>±1% a 2% en muestras monodispersas</i>
<i>Reproducibilidad</i>	<i>±1% a 2% en muestras sin “polvo”</i>
<i>Láser</i>	<i>Láser de estado sólido de 15 mW, λ = 635 nm</i>
<i>Control de Temperatura</i>	<i>5°C a 75°C en pasos de 0,1 °C</i>
<i>Volumen de la Muestra</i>	<i>0,5 a 3 ml</i>
<i>Tiempo de Medida</i>	<i>1 a 2 minutos</i>
<i>Resultados</i>	<i>Promedio y desviación estándar calculados para la distribución de tamaños asumiendo una distribución Lognormal. Análisis MSD opcional.</i>

Tabla 3.1: Especificaciones del software MAS OPTION incluido en el equipo analizador de tamaños

La preparación de muestras es relativamente rápida y fácil, siendo el polvo el mayor problema. El uso de un “filtro de polvo”, incluido en el software, permite un alto porcentaje de medidas aceptables. La parte principal del “MAS OPTION” es un autocorrelacionador digital que procesa la información proporcionada por el equipo y genera una función de autocorrelación, de la que se obtiene la información de tamaño de partícula y polidispersidad. El correlacionador está equipado con capacidades de auto-diagnóstico. Antes de realizar una medición, es aconsejable usar esta prestación para asegurar que el correlacionador está funcionando apropiadamente.

### 3.2.2. Distribución de tamaños

El diámetro medio  $\bar{d}$  en la distribución de tamaños proporcionado por el equipo (Figura 2.7), se define como la suma ponderada de los diámetros  $d$ , con el factor de ponderación  $A(d)$

$$\bar{d} = \frac{\sum dA(d)}{\sum A(d)} \quad (3.1)$$

Esta es una medida de la tendencia central de la distribución. Una medida relativa del ancho que proporciona el software (varianza relativa) es el cuadrado de la desviación estándar de la distribución (Varianza) dividida para el cuadrado del diámetro medio.

$$\text{Varianza Relativa} = \text{Varianza} / \bar{d}^2$$

$$\text{Varianza} = \frac{\sum (d - \bar{d})^2 A(d)}{\sum A(d)} \quad (3.2)$$

Las distribuciones angostas tienen varianzas relativas más pequeñas que las distribuciones anchas. Una distribución monodispersa tendrá una varianza relativa igual a cero. Para una medición de dispersión de luz, la distribución multimodal de tamaños entrega resultados del *tiempo total de medida*, *diámetro medio*, *varianza relativa* y *simetría*.

### 3.2.3. Parámetros de Medición

Los parámetros de las mediciones de dispersión de luz realizadas se indican en la Tabla 3.2. Estos parámetros fueron ingresados a la interfaz del analizador de tamaños de partículas (Figura 3.8), la viscosidad se calcula automáticamente de la temperatura ingresada, el índice de refracción se inserta automáticamente eligiendo el líquido de suspensión.

<i>Temperatura</i>	25°C
<i>Suspensión</i>	<i>Acuosa</i>
<i>Viscosidad</i>	0,890 cP
<i>Índice de refracción del fluido</i>	1.33
<i>Ángulo</i>	90°
<i>Longitud de onda</i>	659 nm
<i>Corridas</i>	5
<i>Duración corrida</i>	1 min
<i>Tiempo total</i>	5 min
<i>Tasa de conteo promedio</i>	300,3 kcps

Tabla 3.2: Parámetros de las Mediciones de dispersión de luz

En la ventana de Parámetros (Figura 3.8), en la parte inferior derecha, bajo “Refractive Index of Particles”, se puede escoger la opción “Uniform Spheres” y llenar los espacios con los índices de refracción real e imaginario de la partícula, si las partículas son uniformes u homogéneas, i.e. de composición constante a través de toda la partícula, y solo si se desea calcular los resultados MSD ponderados en área o volumen.

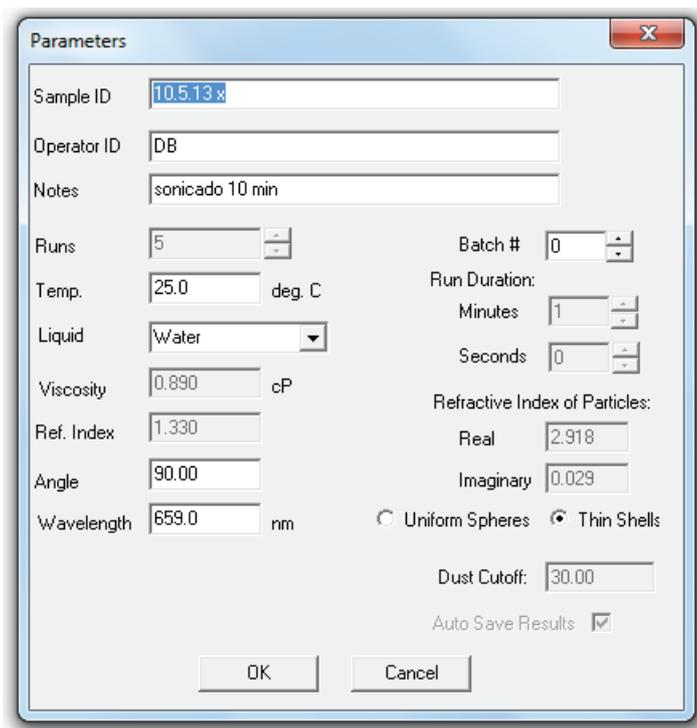


Figura 3.8: Pantalla de Ingreso de Parámetros de los experimentos de dispersión de luz

La opción “Thin Shells”, llamada también “core/thin shell” es apropiada para los liposomas, donde el núcleo de la partícula tiene un índice de refracción igual o cercano al del líquido que rodea la partícula y el espesor de la capa (membrana) es pequeña comparada al diámetro de la partícula. Además, este modelo es apropiado para diámetros menores a 300 o 400 nm. Estas suposiciones son válidas para la mayoría de liposomas. Cuando se cumplen estas suposiciones, el coeficiente de dispersión de Mie, así como la corrección de dispersión de luz, son independientes del índice de refracción de la capa y los cálculos se realizan sin hacer referencia al índice de refracción de la partícula.

### 3.3. Obtención de Tamaños Medios

Antes de iniciar el análisis de los datos, se realizaron medidas y análisis de prueba con una solución de nanoesferas de tamaño estándar, cuyas especificaciones se muestran en la Tabla 3.3.

<i>Diámetro nominal</i>	<i>90nm</i>
<i>Contenido</i>	<i>15 mL</i>
<i>Diámetro promedio</i>	<i>92 nm ± 3,7 nm</i>
<i>Distribución de tamaño</i>	<i>Desviación estándar de 7 nm</i>
<i>Contiene</i>	<i>Microesferas poliméricas en agua</i>
<i>Fabricante</i>	<i>Duke Scientific Corporation</i>

Tabla 3.3: Especificaciones de las nanoesferas de látex de tamaño estándar

Las características de las distribuciones de tamaños se obtuvieron a partir de los datos de la función de auto-correlación que proporciona el software del analizador de tamaños de partícula.

#### 3.3.1. Interpretación de Resultados

El software del equipo analizador de tamaños de partículas, proporciona los resultados del *diámetro efectivo*, *índice de polidispersidad* e *índice de línea base*; además, para varias corridas, muestra los resultados para cada corrida, estos se muestran en la Tabla 3.4.

Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	134.1	48.0	0.128	8.3 / 98.22%
2	133.6	51.6	0.149	7.4 / 100.00%
3	130.2	43.9	0.114	9.7 / 99.96%
4	130.6	43.6	0.111	4.4 / 96.02%
5	131.0	54.4	0.173	5.2 / 100.00%
Mean	131.9	48.3	0.135	7.0 / 98.76%
Std. Error	0.8	2.1	0.012	1.0 / 0.76
Combined	132.1	48.0	0.132	7.6 / 98.76%

Tabla 3.4: Resultados de las diferentes corridas que entrega el equipo para una medición de dispersión de luz

El tipo de diámetro obtenido con DLS es el diámetro hidrodinámico (el diámetro de la partícula más el espesor de la doble capa), que es el diámetro que una esfera tendría a fin de difundirse a la misma velocidad que la partícula que se está midiendo. Este diámetro también puede ser llamado el diámetro de la esfera equivalente [9].

En una distribución de tamaños, el diámetro efectivo medido es un diámetro medio, ponderado en intensidad de luz dispersada por cada partícula. Esta ponderación de intensidad no es la misma que la ponderación de número (población), que utiliza un contador de partícula única como en la microscopía electrónica. Sin embargo, incluso para las muestras de distribución angosta, los diámetros medios obtenidos están acordes con los obtenidos mediante técnicas de partícula única [9], por lo que el diámetro efectivo  $d_{eff}$  que entrega el analizador de partículas utilizado es el mismo para la ponderación en número y en intensidad.

### 3.4. Espectroscopía de Absorción

Los espectros de absorción se obtuvieron mediante un espectrofotómetro UV - Visible Thermo Scientific (Evolution 60S) usando 1 mL de las suspensiones de liposomas de fosfatidilcolina, colesterol y penicilina preparadas, disueltas en 2 mL de la misma solución buffer utilizada para hidratar la película de lípidos, sin ningún solvente adicional. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 4 mL para realizar las mediciones. La

Tabla 3.5 muestra algunas características del espectrofotómetro <sup>5</sup>

<i>Diseño Óptico</i>	<i>Haz Dual – Detector de Referencia Interna</i>
<i>Ancho de Banda Espectral</i>	<i>1,0 nm</i>
<i>Fuente de Luz (Tiempo de Vida)</i>	<i>Lámpara Flash de Xenon ( 5 años )</i>
<i>Detectores</i>	<i>Fotodiodos Duales de Silicio</i>
<i>Rango de Longitud de Onda</i>	<i>190 - 1100 nm</i>
<i>Resolución (Tolueno en Hexano)</i>	<i>&gt;1,5</i>

Tabla 3.5: Características del espectrofotómetro utilizado en las mediciones de los espectros de absorción de las soluciones de liposomas preparadas

---

<sup>5</sup>Las especificaciones del equipo se encuentran detalladas en la página web de Thermo Scientific “Evolution 60S UV-Visible Spectrophotometer” 10148010

# Capítulo 4

## Caracterización de Liposomas

### 4.1. Método de Cumulantes

La técnica de análisis de datos más usada y la más simple de aplicar es el *método de cumulantes*. Considerando la FAC (Ecuación 2.21)

$$g(\tau) = \int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} A(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma$$

se desarrolla su logaritmo en series de Taylor

$$\begin{aligned} \ln[g(\tau)] &= \ln[g(\tau)]_{\tau=0} + \left. \frac{d(\ln[g(\tau)])}{d\tau} \right|_{\tau=0} \tau + \\ &\quad \left. \frac{d^2(\ln[g(\tau)])}{d\tau^2} \right|_{\tau=0} \frac{\tau^2}{2} + \left. \frac{d^3(\ln[g(\tau)])}{d\tau^3} \right|_{\tau=0} \frac{\tau^3}{3} + \dots \end{aligned} \quad (4.1)$$

De la ecuación 2.21 tenemos que

$$\begin{aligned} \ln[g(\tau)]_{\tau=0} &= \ln \int_0^{\infty} A(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \Big|_{\tau=0} \\ &= \ln \int_0^{\infty} A(\Gamma) d\Gamma = a_0 \end{aligned} \quad (4.2)$$

el término lineal de la expansión es

$$\begin{aligned}
\left. \frac{d(\ln[g(\tau)])}{d\tau} \right|_{\tau=0} &= \left. \frac{d}{d\tau} \left( \ln \int_0^\infty A(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \right) \right|_{\tau=0} \\
&= \left. \frac{\int_0^\infty -\Gamma A(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma}{\int_0^\infty A(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma} \right|_{\tau=0} \\
&= \frac{\int_0^\infty -\Gamma A(\Gamma) d\Gamma}{\int_0^\infty A(\Gamma) d\Gamma} \\
&= -\langle \Gamma \rangle
\end{aligned} \tag{4.3}$$

El término cuadrático de la expansión se obtiene de la segunda derivada del logaritmo de la integral

$$\begin{aligned}
\left. \frac{d^2(\ln[g(\tau)])}{d\tau^2} \right|_{\tau=0} &= \left. \frac{d^2}{d\tau^2} \left( \ln \int_0^\infty A(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \right) \right|_{\tau=0} \\
&= \left. \frac{d}{d\tau} \left( \frac{d}{d\tau} \left( \ln \int_0^\infty A(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \right) \right) \right|_{\tau=0} \\
&= \frac{d}{d\tau} \left( \frac{\int_0^\infty -\Gamma A(\Gamma) d\Gamma}{\int_0^\infty A(\Gamma) d\Gamma} \right) \\
&= \frac{\int_0^\infty \Gamma^2 A(\Gamma) d\Gamma \int_0^\infty A(\Gamma) d\Gamma - \int_0^\infty -\Gamma A(\Gamma) d\Gamma \int_0^\infty -\Gamma A(\Gamma) d\Gamma}{\left( \int_0^\infty A(\Gamma) d\Gamma \right)^2} \\
&= \frac{\int_0^\infty \Gamma^2 A(\Gamma) d\Gamma \int_0^\infty A(\Gamma) d\Gamma}{\left( \int_0^\infty A(\Gamma) d\Gamma \right)^2} - \frac{\left( \int_0^\infty \Gamma A(\Gamma) d\Gamma \right)^2}{\left( \int_0^\infty A(\Gamma) d\Gamma \right)^2} \\
&= \frac{\int_0^\infty \Gamma^2 A(\Gamma) d\Gamma}{\int_0^\infty A(\Gamma) d\Gamma} - \frac{\left( \int_0^\infty \Gamma A(\Gamma) d\Gamma \right)^2}{\left( \int_0^\infty A(\Gamma) d\Gamma \right)^2} \\
&= \langle \Gamma^2 \rangle - \langle \Gamma \rangle^2
\end{aligned} \tag{4.4}$$

Entonces, la expansión en series de Taylor de la FAC tiene la forma

$$\ln[g(\tau)] = a_0 - \langle \Gamma \rangle \tau + (\langle \Gamma^2 \rangle - \langle \Gamma \rangle^2) \frac{\tau^2}{2} + \dots \quad (4.5)$$

o

$$\ln[g(\tau)] = a_0 - \langle \Gamma \rangle \tau + \frac{\mu_2}{2} \tau^2 + \dots \quad (4.6)$$

$\langle \Gamma \rangle$  y  $\mu_2$  son los momentos de la distribución de constantes de decaimiento  $A(\Gamma)$ . En la práctica solo los dos primeros momentos se obtienen con certeza y se debe tener cuidado para limitar el rango de  $\tau$  tal que los términos de mayor orden sean despreciables. El método de cumulantes tiene la ventaja de que no necesita de ninguna suposición sobre la forma de la distribución, y bajo las condiciones experimentales correctas, ya descritas, los momentos son parámetros bien definidos y útiles. De la ecuación 2.18 se tiene que

$$\langle \Gamma \rangle = \langle D_T \rangle q^2 \quad (4.7)$$

de donde se obtiene el valor medio de la distribución de coeficientes de difusión  $\langle D_T \rangle$ . El segundo momento ( $\mu_2$ ) de esta distribución, obtenida con el análisis de cumulantes, de la Ecuación 4.6 es

$$\mu_2 = (\langle D_T^2 \rangle - \langle D_T \rangle^2) q^4 \quad (4.8)$$

que es la varianza de la distribución del coeficiente de difusión. Para partículas esféricas el primer término puede estar relacionado con el inverso del cuadrado del diámetro,  $\langle (1/d^2) \rangle$ . El índice de polidispersidad está definido por  $Q$  en la Ecuación 4.9

$$Q = \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle^2} = \frac{\langle D_T^2 \rangle - \langle D_T \rangle^2}{\langle D_T \rangle^2} \quad (4.9)$$

Donde  $\mu_2$ ,  $\langle \Gamma \rangle$  y  $\langle D_T \rangle$  están definidos en las Ecuaciones 4.7 y 4.8 respectivamente. Las medidas a un ángulo, usualmente  $90^\circ$ , son suficientes para establecer un tamaño promedio y una medida del ancho de la distribución de tamaño. El monitoreo de los cambios de estos dos parámetros puede ser todo lo que se requiera para caracterizar una solución de nanopartículas.

### 4.1.1. Primer Truncamiento de Datos

El análisis de datos mediante el uso del método de cumulantes es bastante sensible al número de datos de la función de autocorrelación (Figura 4.1 a) que se toman .

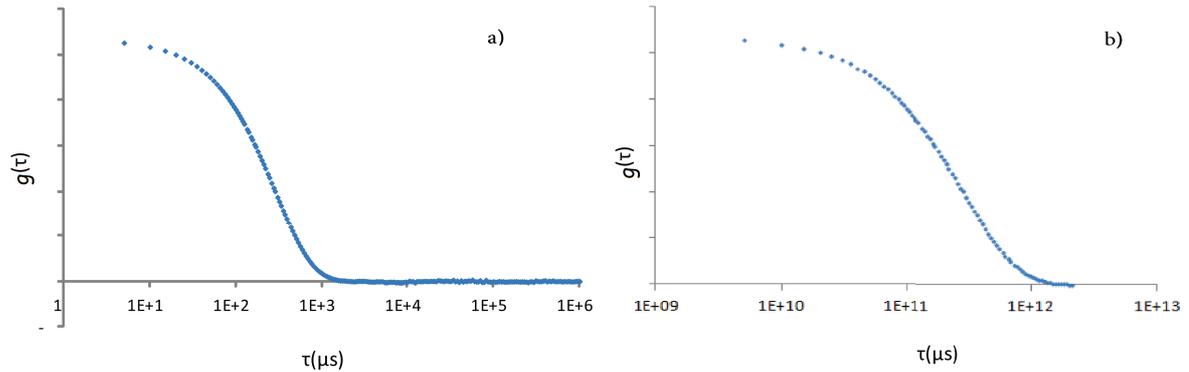


Figura 4.1: a) Función de Auto Correlación de una suspensión de esferas de látex de 90 nm de diámetro, obtenida con los datos proporcionados por el equipo. b) Función de Auto Correlación de una suspensión de esferas de látex después de un primer truncamiento

Para valores grandes de  $\tau$ , el ruido a veces produce valores de  $g$  menores a cero, lo que genera logaritmos de números negativos, en la expansión en series de Taylor 4.5. Remover estos datos resuelve el problema, pero puede afectar la regresión [38], Para esto se ha usado la aproximación de Brookhaven [39] y se ha truncado el conjunto de datos de la FAC en el tiempo de retardo del primer dato negativo  $\tau_-$ , removiendo así todos los datos para  $\tau \geq \tau_-$  (Figura 4.1 b). Sin embargo, no está claro que esta aproximación tenga menos influencia en la regresión que otros métodos.

### 4.1.2. Regresión Polinómica

Para obtener la distribución de tamaños, se calcula el logaritmo natural de los datos de la FAC truncada (Figura 4.1 b) y se ajusta a la curva resultante con una función polinómica de segundo orden.

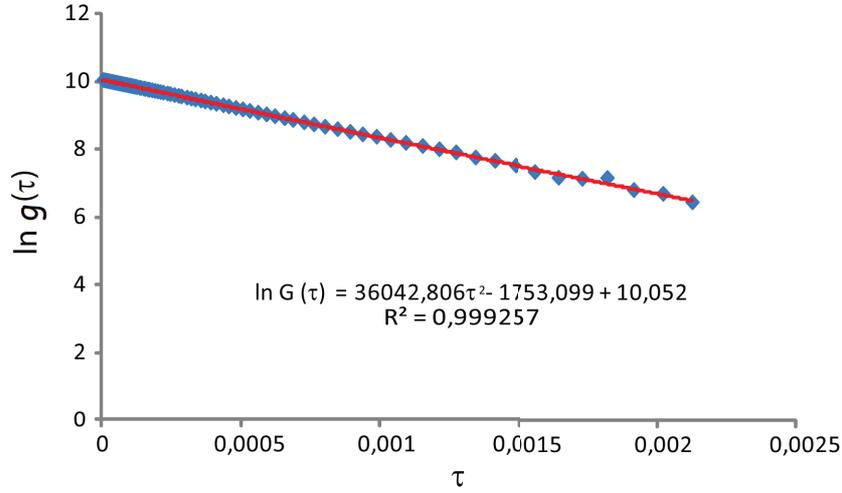


Figura 4.2: Regresión polinómica de la Función de Auto-Correlación de una muestra de látex

La ecuación de la regresión polinómica de segundo orden para la muestra estándar es:

$$\ln g(\tau) = 36042,8\tau^2 - 1753,1\tau + 10,05 \quad (4.10)$$

$$R^2 = 0.99925 \quad (4.11)$$

y equivale a la expansión en series de Taylor de la FAC (Ecuación 4.6)

$$\ln[g(\tau)] = a_0 - \langle \Gamma \rangle \tau + \frac{\mu_2}{2}\tau^2 + \dots \quad (4.12)$$

por lo que el término lineal de la función polinómica de regresión va a ser equivalente a  $\langle \Gamma \rangle$  y el término cuadrático a  $\mu_2/2$

$$\langle \Gamma \rangle = 1753,1 s^{-1} \quad (4.13)$$

$$\begin{aligned} \frac{\mu_2}{2} &= 36042,8 \\ \mu_2 &= 72085,6 \end{aligned} \quad (4.14)$$

de aquí se obtiene el coeficiente de decaimiento medio y la desviación estándar (ancho de la distribución de coeficientes de decaimiento), con lo que se obtienen las características de la distribución de tamaños, usando la Ecuación 4.7 se calcula el coeficiente de difusión medio de las partículas

$$\langle D_T \rangle = \langle \Gamma \rangle / q^2 \quad (4.15)$$

para lo que necesitamos calcular el módulo del vector de dispersión de la Ecuación 2.10 usando los valores del índice de refracción  $n$ , longitud de onda  $\lambda_0$  y ángulo de dispersión  $\Theta$  del experimento (Tabla 3.2)

$$q = \frac{4\pi(1.33)}{6.59 \times 10^{-7}} \sin(90^\circ/2) = 1,79 \times 10^7 \text{ m}^{-1} \quad (4.16)$$

entonces

$$\langle D_T \rangle = \frac{1753,1}{(1,79 \times 10^7)^2} = 5,45 \times 10^{-12} \frac{\text{m}^2}{\text{s}} \quad (4.17)$$

de la relación de Stokes-Einstein (Ecuación 2.19) se calcula el diámetro hidrodinámico medio de las partículas, con el valor de la viscosidad  $\eta$  de la solución de suspensión del experimento (Tabla 3.2)

$$\begin{aligned} d_h &= \frac{k_B T}{3\pi\eta(T)D_T} \\ d_h &= \frac{(1.38 \times 10^{23})(298)}{3\pi(8.9 \times 10^{-4})(5,45 \times 10^{-12})} \\ d_h &= 90 \text{ nm} \end{aligned} \quad (4.18)$$

Para calcular el índice de polidispersidad mediante los dos primeros momentos de la distribución obtenidos, se usa la Ecuación 4.9

$$\begin{aligned} Q &= \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle^2} \\ &= \frac{72085,6}{1753,1^2} \\ &= 0,023 \end{aligned} \quad (4.19)$$

La desviación estándar de la distribución de coeficientes de difusión  $D$  se obtiene a partir del segundo momento de la distribución de  $\Gamma$  (Ecuación 4.8)

$$\begin{aligned}
\langle D^2 \rangle - \langle D \rangle^2 &= \frac{\mu_2}{q^4} \\
&= \frac{72085,6}{(1,79 \times 10^7)^4} \\
&= 7,02 \times 10^{-25}
\end{aligned} \tag{4.20}$$

Los valores del diámetro promedio  $d_h$  e índice de polidispersidad  $Q$  obtenidos con el cálculo son 90 nm y 0,023 respectivamente. Los valores obtenidos mediante el programa de análisis del equipo son de 91,1 nm y 0,005 respectivamente. Usando este mismo método se calcularon el diámetro promedio y el índice de polidispersidad para una muestra de liposomas compuestos solo de fosfatidilcolina (sin adición de colesterol), los valores obtenidos fueron 141 nm y 0,044 respectivamente. Los valores que se obtuvieron del programa fueron 157,2 nm y 0,079 respectivamente.

### 4.1.3. Segundo Truncamiento

El análisis de datos mediante el uso del método de cumulantes es bastante sensible al número de datos de la función de autocorrelación que se toman. Al realizar el análisis de cumulantes se observó que los valores de la FAC para tiempos de retardo grandes positivos, influyen significativamente en la regresión polinómica, por lo que se estudió el componente cuadrático de los datos. Como primera aproximación se realiza una regresión lineal de la FAC luego del primer truncamiento. La Figura 4.3 ilustra este procedimiento para el análisis de las esferas de látex.

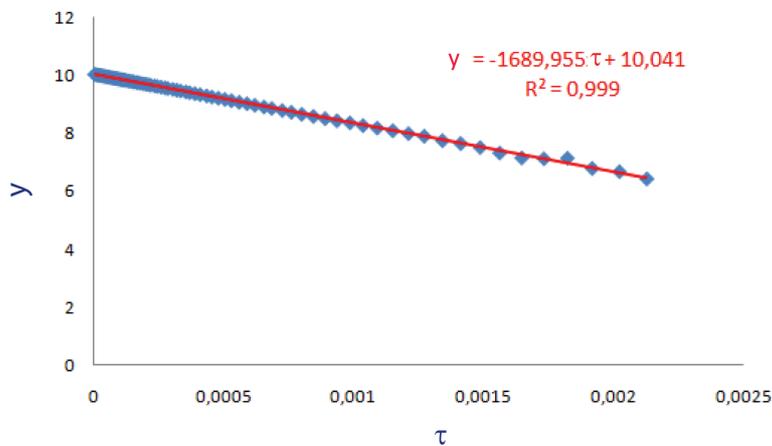


Figura 4.3: Regresión lineal de datos truncados de la FAC de intensidad,  $y = -1689,95\tau + 10,04$

Al graficar la diferencia entre  $y$  y los valores experimentales de la FAC  $\ln[G(\tau)] - y$  se obtiene un componente de los datos cuyo comportamiento es del tipo  $y = bx^2$

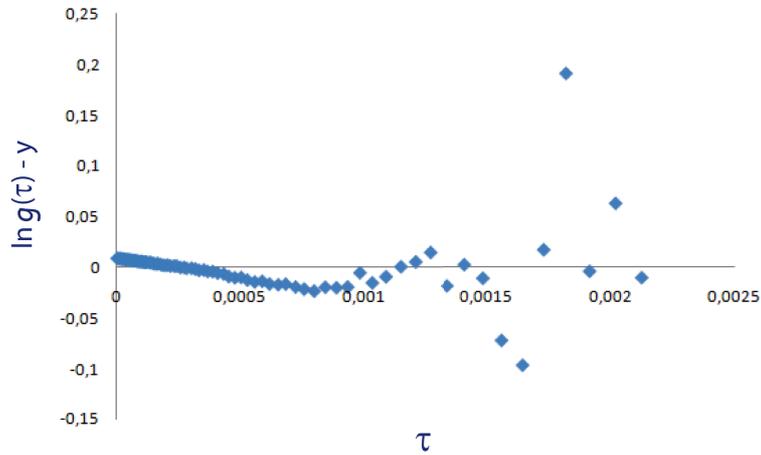


Figura 4.4: Componente cuadrático de la función de autocorrelación de intensidad

Se observa que para valores grandes de  $t_d$ , los datos no exhiben un comportamiento monótono, lo que nos proporciona otro criterio de truncamiento de datos. Considerando un comportamiento cuadrático (expansión en series de Taylor de la Ecuación 4.6) removemos todos los datos que se alejan mucho de este comportamiento (Figura 4.4). El conjunto resultante de datos (Figura 4.5) se ajusta mejor a una función cuadrática. De esta forma se define un segundo rango de datos, correspondientes a tiempos de retardo ( $\tau$ ) largos, que pueden eliminarse para el análisis.

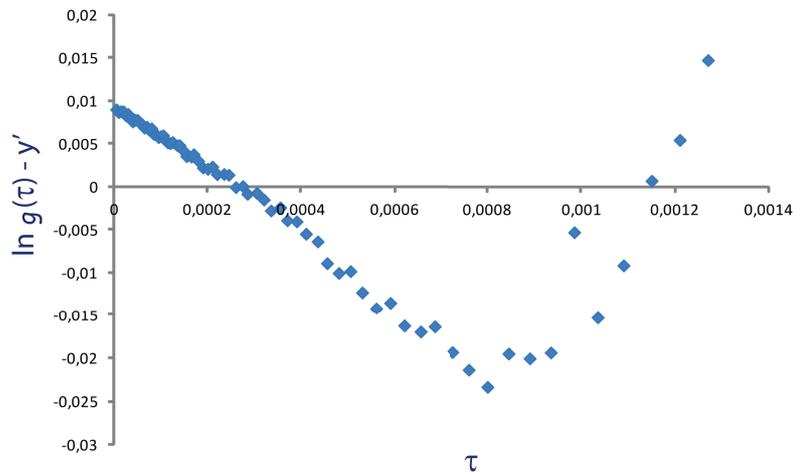


Figura 4.5: Función resultante después de remover los datos que se alejan mucho del comportamiento cuadrático de la Figura 4.4

Usando el conjunto de datos obtenido luego de los dos truncamientos, se sigue con la expansión en series de Taylor (ajuste polinómico) de los datos experimentales de la FAC mencionada en la sección anterior

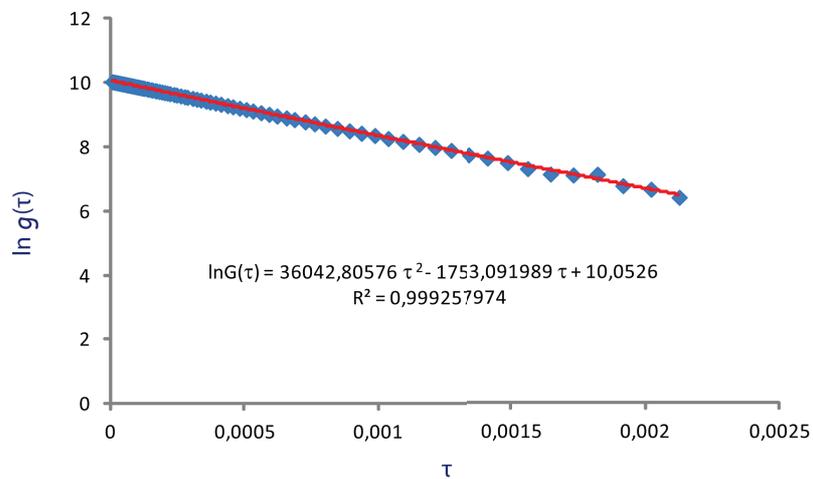


Figura 4.6: Regresión cuadrática de los datos positivos de la FAC de intensidad, antes del segundo truncamiento

El resultado del truncamiento de datos se ve reflejado en el índice de regresión  $R$  que muestra que tan bien se ajusta la curva con la ecuación de regresión. Después del segundo truncamiento este índice se aproxima más a 1 (Figura 4.7), de lo que

se aproxima antes (Figura 4.6) lo que significa que los datos se ajustan mejor con la regresión cuadrática después del truncamiento.

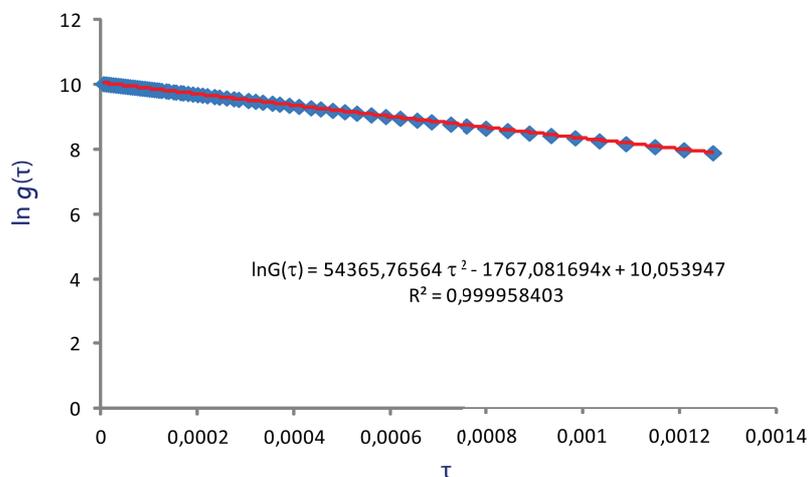


Figura 4.7: Regresión cuadrática de los datos de la FAC de intensidad después del segundo truncamiento

	<i>Primer Truncamiento</i>	<i>Segundo Truncamiento</i>
$\langle \Gamma \rangle$ [s <sup>-1</sup> ]	1753,1	1767,1
$d_z$ [nm]	90,0	89,3
$\mu_2$ [s <sup>-2</sup> ]	72085,6	108731,5
$Q$	0,023	0,034

Tabla 4.1: Comparación de las características de las distribuciones de tamaños de los liposomas después del segundo truncamiento

## 4.2. Inversión de Laplace

Como se sugirió en la sección 2.2.3 la transformada inversa de Laplace, con restricciones adecuadas, puede entregarnos la función  $A(\Gamma)$ . Aunque la distribución real de  $A(\Gamma)$  es en esencia continua, puede realizarse una búsqueda de valores discretos ( $A_i$ ) y tasas de decaimiento ( $\Gamma_i$ ) para minimizar la función  $\chi^2$  [30]:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^N [y_k - \sum_{i=1}^M A_i (\exp^{-\Gamma_i \tau_k})]^2 \quad (4.21)$$

En esta expresión la función de autocorrelación se mide en  $N$  puntos con diferentes tiempos de retardo,  $\tau_k : 1 < k < N$ .  $M$  es el número de funciones exponenciales. La función ajustada  $y$  representa la función de correlación  $g(\tau)$ . Usualmente las distribuciones no son discretas. Por ejemplo, raramente se encontrará una suspensión consistente de dos elementos. El algoritmo de inversión de Laplace intenta llegar a una distribución continua de  $\Gamma$ .

Cuando se usan un gran número de funciones exponenciales para representar la distribución casi continuamente, minimizar  $\chi^2$  resulta en distribuciones sin sentido debido a que la información requerida para reconstruir la distribución con tal detalle está enterrada en el ruido. Las soluciones pueden incluso contener algunas  $A(\Gamma)$  negativas, lo que es físicamente imposible. El primer paso para evitar estos problemas es restringir el detalle de la distribución. Se debe establecer un subconjunto  $A\{\Gamma\}$  de la distribución  $A(\Gamma)$ . Además, se deben escoger elementos de  $\{\Gamma\}$ , que no pueden ser demasiado cercanos e incluso estar separados logarítmicamente. En un muestreo exponencial no suavizado, se establece un conjunto adecuado  $\{\Gamma\}$  y se encuentran las amplitudes  $A\{\Gamma\}$  mediante un ajuste lineal rápido. A continuación se varía  $\{\Gamma\}$  y se repite el ajuste. Las amplitudes negativas se pueden descartar. Además Se introduce un principio adicional de parsimonia <sup>1</sup> que hace la distribución relativamente más suave, este principio es usado en algoritmos de inversión de Laplace como CONTIN [29]. El suavizado se alcanza minimizando un  $\chi^2$  modificado que incluye un término extra [30]:

$$\chi_{mod}^2 = \chi^2 + F(A\{\Gamma\}) \quad (4.22)$$

donde

$$F(A\{\Gamma\}) = \epsilon \sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^{M-n} [A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k} - A_{i+n} \exp^{-\Gamma_{i+n} \tau_k}]^2$$

---

<sup>1</sup>En una regresión lineal múltiple, de un conjunto de variables explicativas, se debe seleccionar la combinación más reducida y simple posible, teniendo en cuenta la varianza residual, la capacidad de predicción y la multicolinealidad.

### 4.3. Obtención de la Distribución de Tamaños Usando el Ajuste de Mínimos Cuadrados No Negativos

Para obtener los valores de las Amplitudes  $A_i$  correspondientes a un diámetro de la distribución, usando el método de mínimos cuadrados no negativos, expresamos 4.22 como

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^N [y_k - \sum_{i=1}^M A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k}]^2 + \sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^{M-k} [A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k} - A_{i+1} \exp^{-\Gamma_{i+k} \tau_k}]^2$$

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^N \left\{ [y_k - \sum_{i=1}^M A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k}]^2 + \sum_{i=1}^{M-k} [A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k} - A_{i+1} \exp^{-\Gamma_{i+k} \tau_k}]^2 \right\}$$

Para minimizar la función se obtiene su derivada  $\frac{\partial \chi^2}{\partial A_j}$  como sigue

$$\begin{aligned} \frac{\partial \chi^2}{\partial A_j} = \sum_{k=1}^N \{ & [y_k - \sum_{i=1}^M A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k}] \exp^{-\Gamma_j \tau_k} + (A_j \exp^{-\Gamma_j \tau_k} - A_{j+1} \exp^{-\Gamma_{j+1} \tau_k}) \exp^{-\Gamma_j \tau_k} \\ & + (A_{j-1} \exp^{-\Gamma_{j-1} \tau_k} - A_j \exp^{-\Gamma_j \tau_k}) \exp^{-\Gamma_j \tau_k} \} \end{aligned}$$

con  $j \neq 1$   $j \neq M$

$$\begin{aligned} \frac{\partial \chi^2}{\partial A_j} = \sum_{k=1}^N \{ & [y_k - \sum_{i=1}^M A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k}] \exp^{-\Gamma_j \tau_k} - [A_{j-1} \exp^{-\Gamma_{j-1} \tau_k} - 2A_j \exp^{-\Gamma_j \tau_k} \\ & + A_{j+1} \exp^{-\Gamma_{j+1} \tau_k}] \exp^{-\Gamma_j \tau_k} \} \end{aligned}$$

Haciendo  $\frac{\partial \chi^2}{\partial A_j} = 0$  obtenemos

$$\sum_{k=1}^N \{ [y_k - \sum_{i=1}^M A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k} + A_{j-1} \exp^{-\Gamma_{j-1} \tau_k} - 2A_j \exp^{-\Gamma_j \tau_k} + A_{j+1} \exp^{-\Gamma_{j+1} \tau_k}] \exp^{-\Gamma_j \tau_k} \} = 0$$

Este es el sistema de ecuaciones que hay que resolver para obtener las amplitudes  $A_j$  de la distribución de tamaños de los liposomas. Expresado de otra manera

$$\sum_{k=1}^N \left\{ \left[ \sum_{i=1}^M A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k} - A_{j-1} \exp^{-\Gamma_{j-1} \tau_k} + 2A_j \exp^{-\Gamma_j \tau_k} - A_{j+1} \exp^{-\Gamma_{j+1} \tau_k} \right] \exp^{-\Gamma_j \tau_k} \right\} = \sum_{k=1}^N y_k \exp^{-\Gamma_j \tau_k} \quad (4.23)$$

Este sistema se puede expresar de la forma  $\mathbf{m} \times \mathbf{A} = \mathbf{b}$ ; donde  $\mathbf{A}$  es el vector de amplitudes (factores de ponderación) correspondientes a cada diámetro

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \\ A_3 \\ \vdots \\ A_N \end{pmatrix}$$

y  $\mathbf{b}$  corresponde al lado izquierdo de la ecuación 4.23

$$\mathbf{b} = \begin{pmatrix} \sum_{k=1}^N y_k \exp^{-\Gamma_1 \tau_k} \\ \sum_{k=1}^N y_k \exp^{-\Gamma_2 \tau_k} \\ \vdots \\ \sum_{k=1}^N y_k \exp^{-\Gamma_N \tau_k} \end{pmatrix}$$

para resolver la ecuación se debe encontrar la forma de la matriz  $\mathbf{m}$ , si  $j = 1$  se tiene

$$\sum_{k=1}^N \left\{ \left[ \sum_{i=1}^M A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k} - A_0 \exp^{-\Gamma_0 \tau_k} + 2A_1 \exp^{-\Gamma_1 \tau_k} - A_2 \exp^{-\Gamma_2 \tau_k} \right] \exp^{-\Gamma_1 \tau_k} \right\} = \sum_{k=1}^N y_k \exp^{-\Gamma_1 \tau_k}$$

$$\sum_{k=1}^N \left\{ \left[ -A_0 \exp^{-\Gamma_0 \tau_k} + 3A_1 \exp^{-\Gamma_1 \tau_k} + 0 + \sum_{i=3}^M A_i \exp^{-\Gamma_i \tau_k} \right] \exp^{-\Gamma_1 \tau_k} \right\} = \sum_{k=1}^N y_k \exp^{-\Gamma_1 \tau_k}$$

si suponemos que  $A_0 = 0$  tenemos

$$3A_1 \sum_{k=1}^N \exp^{-2\Gamma_1 \tau_k} + 0 + \sum_{i=3}^M \{A_i \sum_{k=1}^N \exp^{-(\Gamma_i + \Gamma_1) \tau_k}\} = \sum_{k=1}^N y_k \exp^{-\Gamma_1 \tau_k}$$

esta ecuación corresponde a la primera fila de la matriz  $\mathbf{m}$  multiplicada por el vector  $\mathbf{A}$ . La matriz  $\mathbf{m}$  tiene la siguiente forma

$$\begin{bmatrix} 3 \sum_{k=1}^N \exp^{-2\Gamma_1 \tau_k} & 0 & \sum_{k=1}^N \exp^{-(\Gamma_3 + \Gamma_1) \tau_k} & \sum_{k=1}^N \exp^{-(\Gamma_4 + \Gamma_1) \tau_k} & \dots & \sum_{k=1}^N \exp^{-(\Gamma_N + \Gamma_1) \tau_k} \\ 0 & 3 \sum_{k=1}^N \exp^{-2\Gamma_2 \tau_k} & 0 & \sum_{k=1}^N \exp^{-(\Gamma_4 + \Gamma_2) \tau_k} & \dots & \sum_{k=1}^N \exp^{-(\Gamma_N + \Gamma_2) \tau_k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \sum_{k=1}^N \exp^{-\Gamma_1 \tau_k} & \sum_{k=1}^N \exp^{-\Gamma_2 \tau_k} & \sum_{k=1}^N \exp^{-\Gamma_3 \tau_k} & \dots & 0 & 3 \sum_{k=1}^N \exp^{-2\Gamma_N \tau_k} \end{bmatrix}$$

Para resolver el sistema de ecuaciones mediante mínimos cuadrados no negativos se desarrolló un algoritmo (implementado en Microsoft Excel) a partir de la operación de matrices mencionada, este requiere de la elección de un valor inicial  $\Gamma_0$  y un parámetro  $\alpha$  para construir la matriz ( $\mathbf{m}$ ). Al resolver el sistema de ecuaciones (o la operación de matrices  $m \times A = b$ ), se obtienen los valores de  $A_i$  de los que se eliminan los valores negativos y se vuelve a resolver el sistema eliminando las filas y columnas de la matriz, correspondientes a los valores eliminados, como se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 4.8.

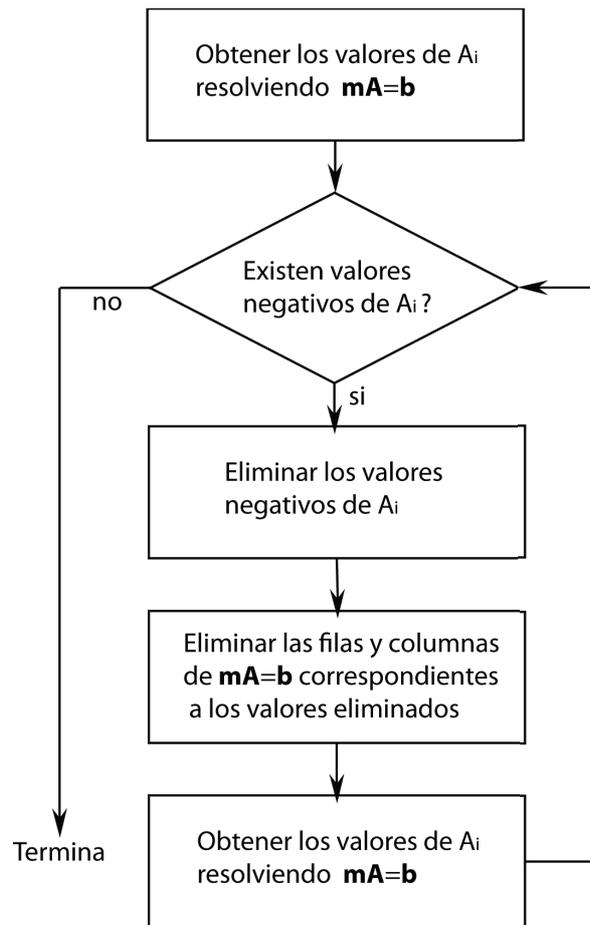


Figura 4.8: Algoritmo para la eliminación de los valores negativos de  $A_i$  Mínimos Cuadrados No Negativos

Cada vez que se vuelven a calcular los valores de  $A_i$  aparecen nuevos valores negativos que son generalmente dos o tres valores iniciales y finales del vector  $\mathbf{A}$ . Las distribuciones obtenidas van a depender del valor inicial  $\Gamma_0$  y el valor del parámetro  $\alpha$  que se elija. La correcta elección de estos valores puede ser evaluada mediante el valor de  $\chi^2$  (Ecuación 4.22). Los valores del vector de amplitudes  $A_i$  corresponden a un  $\Gamma_i$ , y por lo tanto a un diámetro hidrodinámico de partícula  $d_i$  (Ecuaciones 2.18 y 2.19)

# Capítulo 5

## Resultados

### 5.1. Suspensiones de Liposomas de Fosfatidilcolina y Colesterol

#### 5.1.1. Diámetros Promedio Obtenidos Mediante el Método de Cumulantes

Las Funciones de Auto Correlación se analizaron siguiendo el método de cumulantes desarrollado en el anterior capítulo (sección 4.1) para obtener las características de las distribuciones de tamaños. Desarrollando el método que se ha descrito para las esferas de látex, se obtuvieron los valores promedio del coeficiente de decaimiento de las fluctuaciones de intensidad  $\langle \Gamma \rangle$ , el coeficiente de difusión  $\langle D_z \rangle$ , diámetro hidrodinámico de las partículas  $\langle d_z \rangle$  y el índice de polidispersidad  $Q$  de la distribución de tamaños de los liposomas (Tabla 5.1). Estos resultados se promediaron entre cinco diferentes medidas para cada concentración.

[PC]:[Chol]	$\langle \Gamma \rangle$ [s <sup>-1</sup> ]	$\mu_2$ [s <sup>-2</sup> ] x10 <sup>3</sup>	$D_z$ [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ] x10 <sup>-12</sup>	$d_z$ [nm]	$Q$
1:0	1090,7 ± 23,8	103015,2 ± 13751,7	3,4 ± 0,07	144,7 ± 3,2	0,086 ± 0,01
1:0.1	1058,9 ± 3,4	186819,4 ± 43048,8	3,3 ± 0,01	148,9 ± 0,5	0,166 ± 0,03
1:0.2	1118,4 ± 12,1	150076,5 ± 43847,7	3,5 ± 0,04	141,1 ± 3,8	0,119 ± 0,03
1:0.3	1133,1 ± 38,9	118666,2 ± 38065	3,5 ± 0,12	139,3 ± 4,7	0,091 ± 0,02
1:0.5	1087,3 ± 65,1	126657,1 ± 112481,6	3,4 ± 0,2	145,5 ± 8,9	0,101 ± 0,08

Tabla 5.1: Características de la distribución de tamaños de varias soluciones de liposomas con diferentes relaciones de concentración [PC]:[Chol]

Los resultados de estos análisis se comparan con los resultados proporcionados por el software incluido en el equipo analizador de tamaños (Tabla 5.2) para las diferentes relaciones de concentración de fosfatidilcolina y colesterol.

[PC]:[Chol]	Cumulantes		Software	
	$d_z$ [nm]	$Q$	$d_{eff}$ [nm]	PDI
1:0	144,7 ± 3,2	0,086 ± 0,01	143 ± 4,4	0,08 ± 0,01
1:0.1	148,9 ± 0,5	0,166 ± 0,03	149,8 ± 1,4	0,15 ± 0,02
1:0.2	141,1 ± 3,8	0,119 ± 0,03	141,1 ± 0,5	0,11 ± 0,03
1:0.3	139,3 ± 4,7	0,091 ± 0,02	136,9 ± 3,5	0,11 ± 0,02
1:0.5	145,5 ± 8,9	0,101 ± 0,08	140,6 ± 4,6	0,11 ± 0,02

Tabla 5.2: Comparación de las características de la distribución de tamaños de liposomas proporcionadas por el equipo analizador de tamaños y las obtenidas con el método de cumulantes, las medidas fueron realizadas después de la extrusión y se promediaron entre 4 muestras de liposomas para cada relación de concentraciones [PC]:[Chol]

El diámetro efectivo ( $d_{eff}$ ) e índice de polidispersidad (PDI) proporcionados por el software del equipo, son similares al diámetro hidrodinámico ( $d_z$ ) y al índice de polidispersidad ( $Q$ ) obtenidos con el método de cumulantes, para las muestras con fracción de colesterol variable.

### 5.1.2. Distribuciones de Tamaños Obtenidas Mediante la Inversión de Laplace

Utilizando el algoritmo detallado en la sección 4.3 se obtuvieron las distribuciones de tamaños, para las diferentes relaciones de concentración [PC]:[Chol]. La figura 5.1 muestra la distribución de tamaños obtenidas con la inversión de Laplace y el ajuste de mínimos cuadrados utilizando  $\alpha = 2, 4$  y  $\Gamma_0 = 110$ , para la relación de concentraciones [PC]:[Chol]=1:0,2.

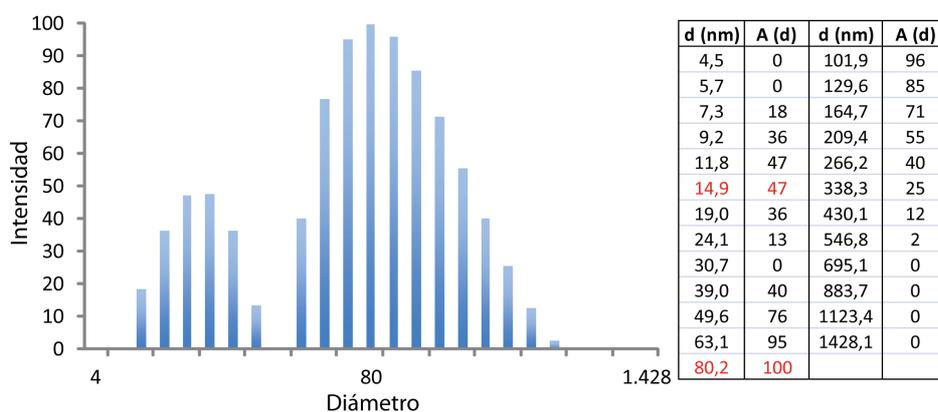


Figura 5.1: Distribución de Tamaños correspondiente a una muestra de relación de concentraciones [PC]:[Chol]=1:0,2 obtenida con el método de mínimos cuadrados.  $d_z = 141 \text{ nm}$  y  $Q = 0,12$

La Figura 5.1 indica que la solución con relación de concentraciones [PC]:[Chol]=1:0,2 tiene una gran concentración de liposomas con tamaños de 14,9 nm y 80,2 nm. Los valores máximos de la distribución indican que los tamaños a los que corresponden son los tamaños más probables en la solución de liposomas. Las distribuciones obtenidas se comparan con las distribuciones proporcionadas por el software de análisis de datos del equipo (Figura 5.2)

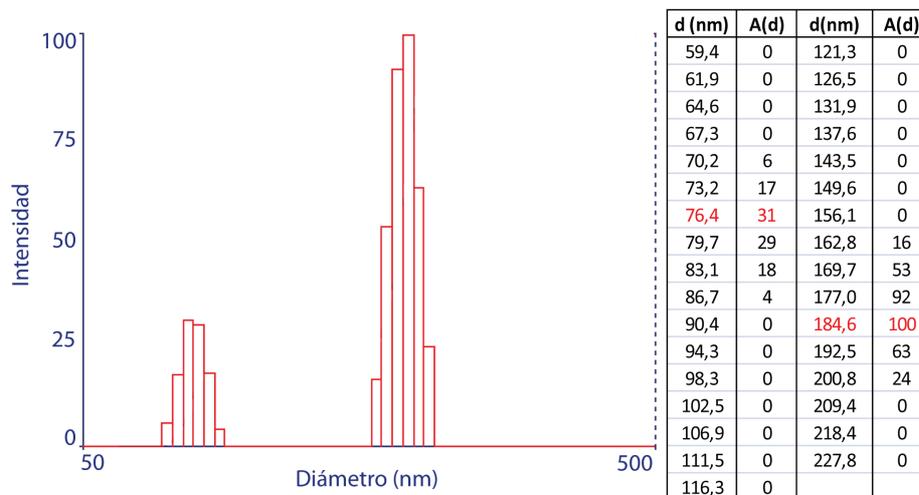


Figura 5.2: Distribución de Tamaños correspondiente a una muestra de relación de concentraciones [PC]:[Chol]=1:0,2 con  $d_{eff} = 140,9\text{ nm}$  y  $PDI = 0,123$  obtenida con el programa del equipo analizador de tamaños

Se puede observar que los tamaños correspondientes a los máximos de la distribución calculada con el programa desarrollado (Figura 5.1) son menores a los tamaños más probables de las distribuciones entregadas por el equipo (Figura 5.2).

### 5.1.3. Efecto de la Relación de Concentraciones de Fosfatidilcolina y Colesterol en el Tamaño y Estabilidad de los Liposomas

La figura 5.1 muestra una distribución de tamaños típica obtenida en estos ensayos, esta tiene un primer máximo para un diámetro  $d_{max1}$  y un segundo para  $d_{max2}$ . El análisis de estabilidad de las muestras se realizó considerando solo la evolución temporal del diámetro efectivo y del índice de polidispersidad, obtenidos con el método de cumulantes, más no de los parámetros  $d_{max1}$  y  $d_{max2}$  ya que el diámetro efectivo describe el comportamiento de los dos máximos de la distribución. El análisis de estabilidad y la evolución de las muestras se realizaron después del proceso de extrusión, en la Tabla 5.3 se indican los parámetros de la distribución de tamaños de las muestras antes y después del proceso de extrusión, para cada una de las relaciones de concentraciones [PC]:[Chol].

[PC]:[Chol]	Muestras no extruídas		Muestras extruídas	
	$d_{eff} [nm]$	PDI	$d_{eff} [nm]$	PDI
1:0	2429.9	0,289	139,1	0,079
1:0,1	3465,2	0,314	151,3	0,128
1:0,2	2597,7	0,197	140,9	0,123
1:0,3	709,0	0,399	133,8	0,102
1:0,5	1470,6	0,327	139,2	0,111

Tabla 5.3: Características de la distribución de tamaños de las muestras con colesterol antes y después del proceso de extrusión

La incorporación de colesterol en los liposomas de fosfatidilcolina, resulta en un cambio significativo en el diámetro efectivo de algunas de las muestras no extruídas. Sin embargo para las muestras extruídas la adición de colesterol en cualquier concentración no causa ningún un cambio significativo en el diámetro efectivo de las partículas. El cambio en el diámetro e índice de polidispersidad después del proceso de extrusión es notorio, este proceso es determinante en la obtención de tamaños nanométricos de los liposomas preparados. La evolución para una muestra con relaciones de concentraciones [PC]:[Chol]=1:0,2 se muestra en la Figura 5.3. La Tabla 5.4 muestra los promedios en el tiempo, para las diferentes relaciones de concentraciones [PC]:[Chol].

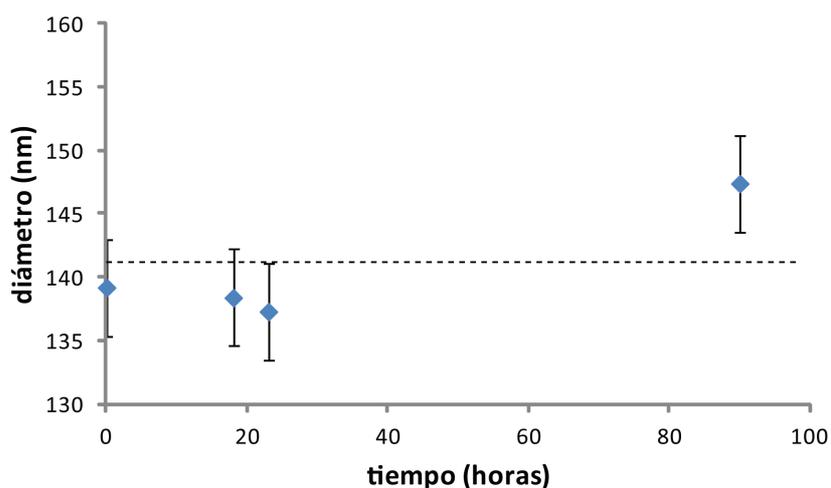


Figura 5.3: Evolución temporal del diámetro efectivo para la relación de concentraciones [PC]:[Chol] = 1:0,2. El diámetro efectivo promedio  $d_{eff} = 141,1$  se muestra con la línea entrecortada y la desviación estándar 3,8 en el valor para cada tiempo.

La Figura 5.4 muestra la dependencia del diámetro efectivo, obtenido con el análisis de cumulantes, con la concentración de colesterol en la solución.

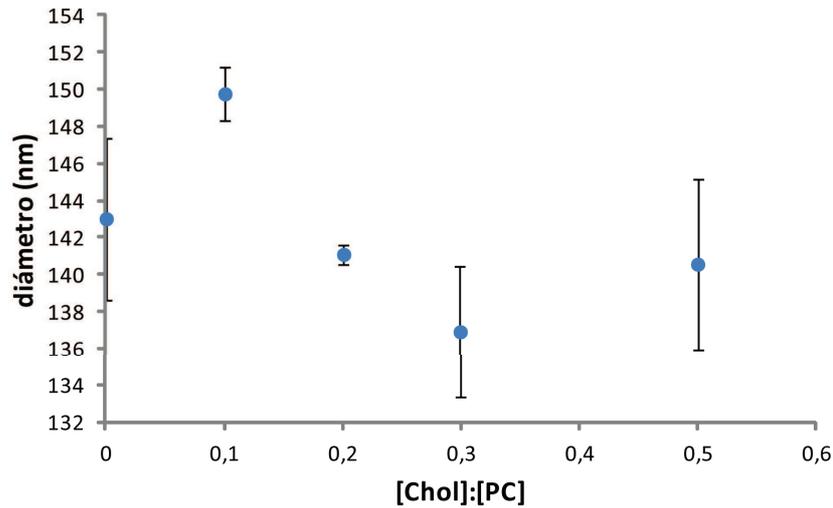


Figura 5.4: Dependencia del promedio del diámetro efectivo de los liposomas con la concentración de colesterol. Las desviaciones estándar se indican en la Tabla 5.4 para cada muestra.

$[PC]:[Chol]$	$d_{eff}$	$PDI$
1:0	$143 \pm 4,4$	$0,08 \pm 0,01$
1:0,1	$149,8 \pm 1,4$	$0,15 \pm 0,02$
1:0,2	$141,1 \pm 0,5$	$0,11 \pm 0,03$
1:0,3	$136,9 \pm 3,5$	$0,11 \pm 0,02$
1:0,5	$140,6 \pm 4,6$	$0,11 \pm 0,02$

Tabla 5.4: Promedio en el tiempo del diámetro efectivo e índice de polidispersidad (PDI) de la distribución de tamaños de liposomas

De los resultados de la Tabla 5.4 se obtiene que las relaciones de concentraciones  $[PC]:[Chol] = 1:0,3$  y  $1:0,2$  son las que produjeron los liposomas más estables debido a que muestran el menor diámetro efectivo e índice de polidispersidad. La dependencia del diámetro efectivo con la concentración de colesterol en la solución se muestra en la Figura 5.4. Para la preparación de muestras que contengan penicilina, se decidió trabajar con la relación  $[PC]:[Chol] = 1:0,2$ .

## 5.2. Suspensiones de Liposomas Encapsulando Penicilina

### 5.2.1. Diámetros Promedio Obtenidos Mediante el Método de Cumulantes

A continuación se detallan los resultados de diámetro efectivo obtenidos mediante el análisis de cumulantes de la FAC y la distribución de tamaños a las que se llegaron siguiendo el algoritmo de mínimos cuadrados no negativos en la inversión de Laplace. Se estudiaron las soluciones de liposomas preparadas manteniendo una relación de concentraciones [PC]:[Chol]=1:0,2 y variando la relación de concentración [PC]:[PEN]. Las características de las distribuciones de tamaño se muestran en la Tabla 5.5, para las diferentes relaciones de concentración.

[PC]:[PEN]	$\langle \Gamma \rangle$ [s <sup>-1</sup> ]	$\mu_2$ [s <sup>-2</sup> ]	$D_z$ [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ] x10 <sup>-12</sup>	$d_z$ [nm]	$Q$
1:0	1118,4 ± 12,1	150076,5 ± 43847,7	3,47 ± 0,04	141,1 ± 3,8	0,119 ± 0,03
1:0,05	1271,4 ± 14,6	120131,8 ± 30263,9	3,95 ± 0,05	124,1 ± 1,4	0,074 ± 0,01
1:0,1	1209,6 ± 27,4	130836,1 ± 26408,4	3,76 ± 0,08	130,4 ± 2,9	0,089 ± 0,01
1:0,2	1214,9 ± 54,0	34968,45 ± 27397,2	3,78 ± 0,17	130,0 ± 5,6	0,045 ± 0,03

Tabla 5.5: Características de la distribución de tamaños de varias soluciones de liposomas con diferentes relaciones de concentración [PC]:[PEN]

Si comparamos estos resultados con los de la Tabla 5.1 vemos que la adición de penicilina provoca una disminución del tamaño del liposoma. Los resultados de estos análisis se comparan con los resultados proporcionados por el software incluido en el equipo analizador de tamaños (Tablas 5.6 para las diferentes relaciones de concentración de fosfatidilcolina y penicilina).

[PC]:[PEN]	Cumulantes		Software	
	$d_z$ [nm]	$Q$	$d_{eff}$ [nm]	PDI
1:0	141,1 ± 3,8	0,119 ± 0,03	141,1 ± 0,5	0,11 ± 0,03
1:0,05	124,1 ± 1,4	0,074 ± 0,01	123,9 ± 1	0,09 ± 0,002
1:0,1	130,4 ± 2,9	0,089 ± 0,01	131,4 ± 3,1	0,08 ± 0,02
1:0,2	130,0 ± 5,6	0,045 ± 0,03	130,3 ± 5,5	0,046 ± 0,03

Tabla 5.6: Comparación de las características de la distribución de tamaños de liposomas proporcionadas por el equipo analizador de tamaños y las obtenidas con el método de cumulantes, para varias soluciones de liposomas con diferentes relaciones de concentración [PC]:[PEN]

## 5.2.2. Distribuciones de Tamaños Obtenidas Mediante la Inversión de Laplace

Al igual que con las soluciones de fosfatidilcolina y colesterol, se obtuvieron las distribuciones de tamaños de las muestras que se prepararon variando la concentración de penicilina, como se detalla en la sección 4.3. Los valores de  $\alpha$  y  $\Gamma_0$  se han escogido dependiendo de que tan cercano a cero sea el residual  $\chi^2$ , estos valores no varían demasiado de una muestra a otra y determinan el rango de diámetros para los que se va a obtener las amplitudes.

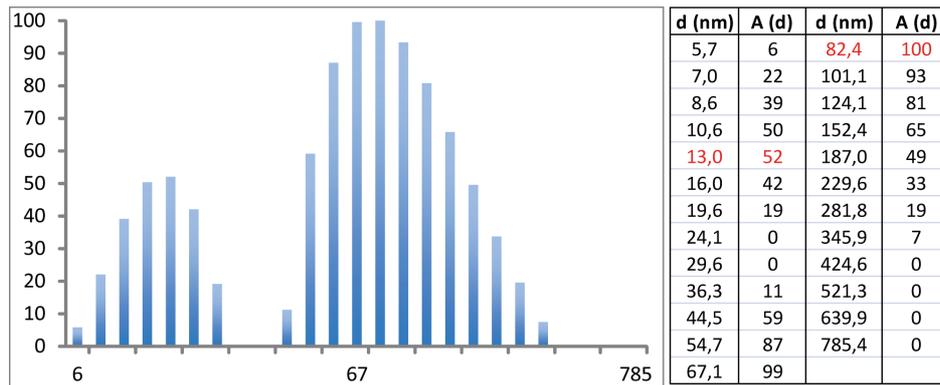


Figura 5.5: Distribución de Tamaños correspondiente a una muestra de relación de concentraciones [PC]:[PEN]=1:0,05. El método de cumulantes proporcionó un  $d_{eff} = 124,1 \text{ nm}$  con  $Q = 0,074$  para esta muestra

Los tamaños más probables en la solución de liposomas son los correspondientes a los máximos de la distribución, el ajuste de mínimos cuadrados de la solución con relación

de concentraciones  $[PC]:[PEN]=1:0,05$  que se realizó para obtener la distribución de la Figura 5.5 utilizó los valores de  $\alpha = 2,05$  y  $\Gamma_0 = 200$ , esta distribución indica que la solución tiene liposomas con tamaños alrededor de 13 nm y 82,4 nm.

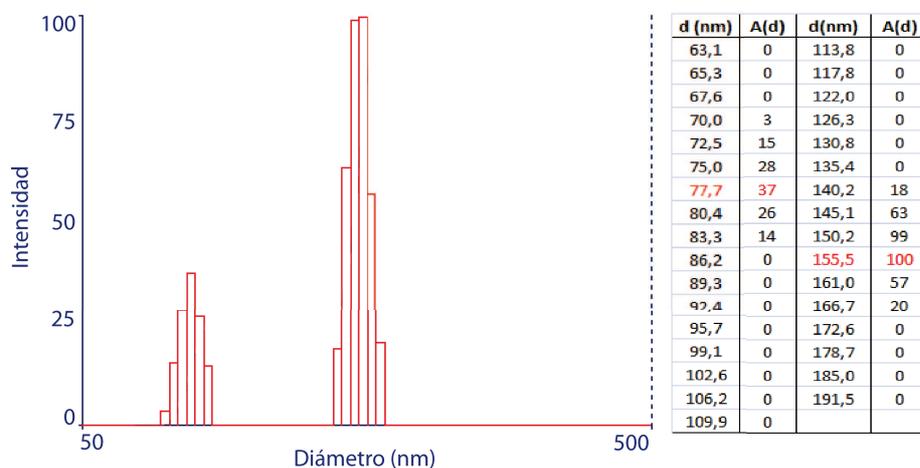


Figura 5.6: Distribución de tamaños correspondiente a una muestra de relación de concentraciones  $[PC]:[PEN]=1:0,05$  con valores de  $d_{eff} = 122,8$  y  $PDI = 0,089$  proporcionada por el equipo analizador de tamaños

Al comparar las distribuciones obtenidas con el programa desarrollado con a las distribuciones proporcionadas por el software del equipo de la Figura 5.6), observamos que los tamaños más probables son menores en las distribuciones calculadas que en aquellas entregadas por el equipo.

### 5.2.3. Efecto en la Distribución de Tamaños de la Relación de Concentraciones de Fosfatidilcolina y Penicilina

La tabla 5.7 muestra como varían el diámetro efectivo y el índice de polidispersidad de las distribuciones de tamaños de los liposomas después del proceso de extrusión de las soluciones.

$[PC]:[PEN]$	<i>Muestras no extruídas</i>		<i>Muestras extruídas</i>	
	$d_{eff}[nm]$	<i>PDI</i>	$d_{eff}[nm]$	<i>PDI</i>
1:0,05	2921,8	0,34	132,6	0,09
1:0,1	4296	0,34	148,5	0,13
1:0,2	812,1	0,35	168,7	0,12

Tabla 5.7: Características de la distribución de tamaños de las muestras con penicilina antes y después del proceso de extrusión

A través del método de cumulantes se obtuvieron los diámetros efectivos de todas las muestras preparadas. Los tamaños más pequeños se alcanzaron con la relación  $[PC]:[PEN]=1:0,05$ . Del análisis de la evolución en el tiempo de estos diámetros, después de la extrusión de la solución, se encontró una mayor estabilidad en el tiempo en la muestra con relación de concentraciones  $[PC]:[PEN]=1:0,1$ , la Figura 5.7 muestra la estabilidad de la muestra para esta relación de concentraciones.

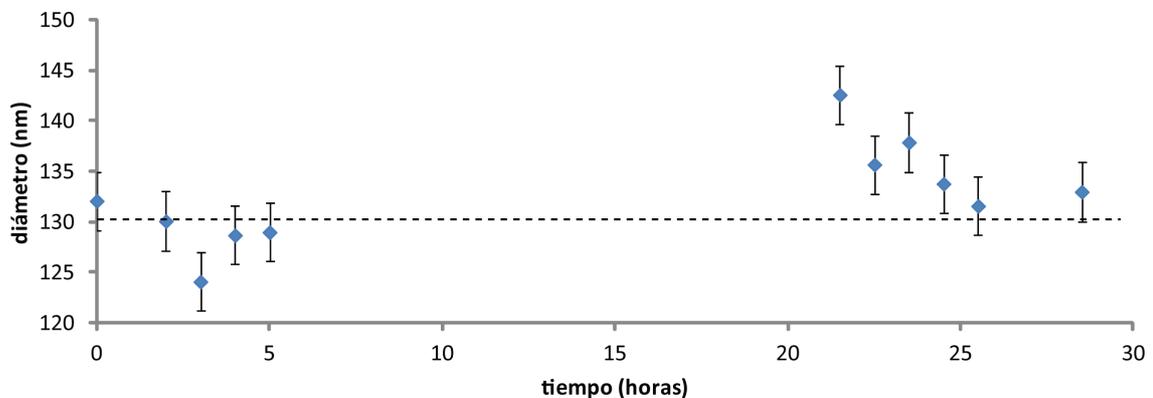


Figura 5.7: Evolución en el tiempo del diámetro efectivo para una muestra de liposomas de relación de concentraciones  $[PC]:[PEN]=1:0,1$ . El diámetro efectivo promedio  $d_{eff} = 130,4 nm$  se muestra con la línea entrecortada y la desviación estándar 2,9 en el valor para cada tiempo.

La Figura 5.8 muestra la dependencia del diámetro efectivo, obtenido con el análisis de cumulantes, con la concentración de penicilina en la solución.

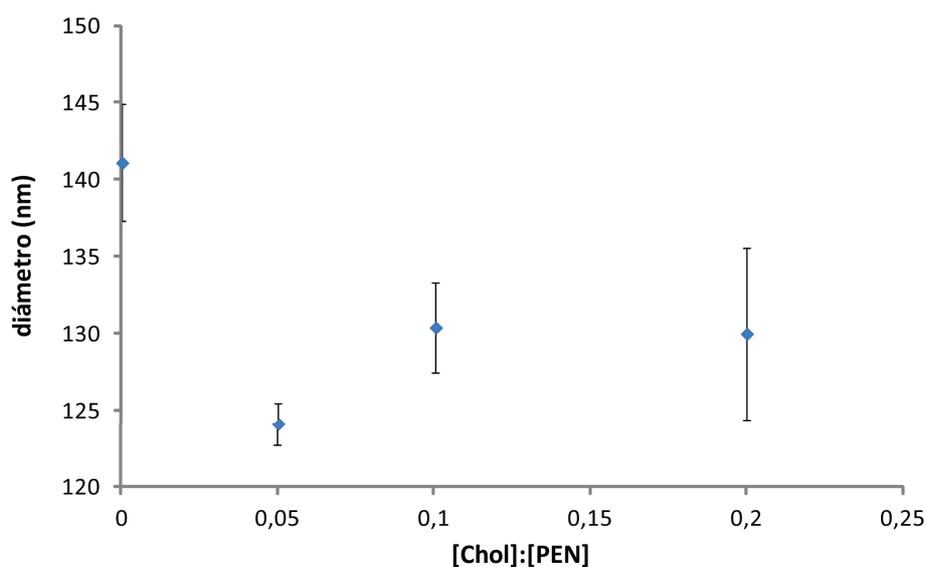


Figura 5.8: Dependencia del promedio del diámetro efectivo de los liposomas con la concentración de penicilina en la solución después del proceso de extrusión. Las desviaciones estándar se indican en la Tabla 5.5 para cada muestra.

### 5.3. Espectroscopía de Absorción

Se espera que los espectros de las soluciones preparadas proporcionen mayor información acerca del encapsulamiento de penicilina en los liposomas ya que, aparte de un ligero cambio en el tamaño promedio, no sabemos que otra influencia tiene la adición de penicilina en las soluciones base que van a ser evaporadas. La Figura 5.9 muestra la evolución con el tiempo del espectro de absorción de la muestra de relaciones de concentración  $[PC]:[PEN]=1:0,05$ ; obtenida mediante espectrofotometría.

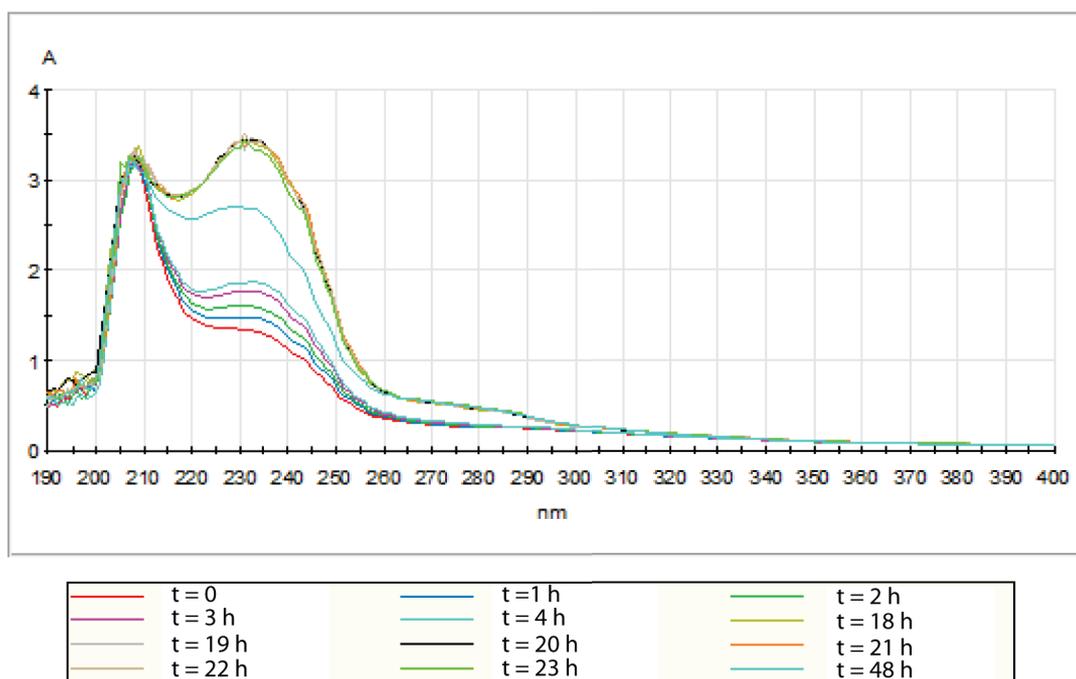


Figura 5.9: Evolución en el tiempo del espectro de absorción para una muestra de relaciones de concentración  $[PC]:[PEN]=1:0,05$ . Mientras avanza el tiempo, un segundo máximo empieza a aparecer en el espectro de absorción.

Se observa un crecimiento en el segundo pico de absorción a 230 nm, este aumento en la absorción del espectro de las soluciones extruídas se puede deber al apantallamiento inicial de la luz debido a las moléculas de fosfatidilcolina, colesterol y penicilina libres en la solución o debido a la reorganización de estas moléculas en la membrana, ya que el proceso de extrusión puede dejar pasar moléculas libres de colesterol y penicilina. Para saber a que se debe esta evolución de la absorción se obtuvieron los espectros de las soluciones de liposomas de fosfatidilcolina y colesterol con y sin la adición de penicilina y el espectro de la misma cantidad de penicilina en solución buffer que se muestran en la siguiente figura

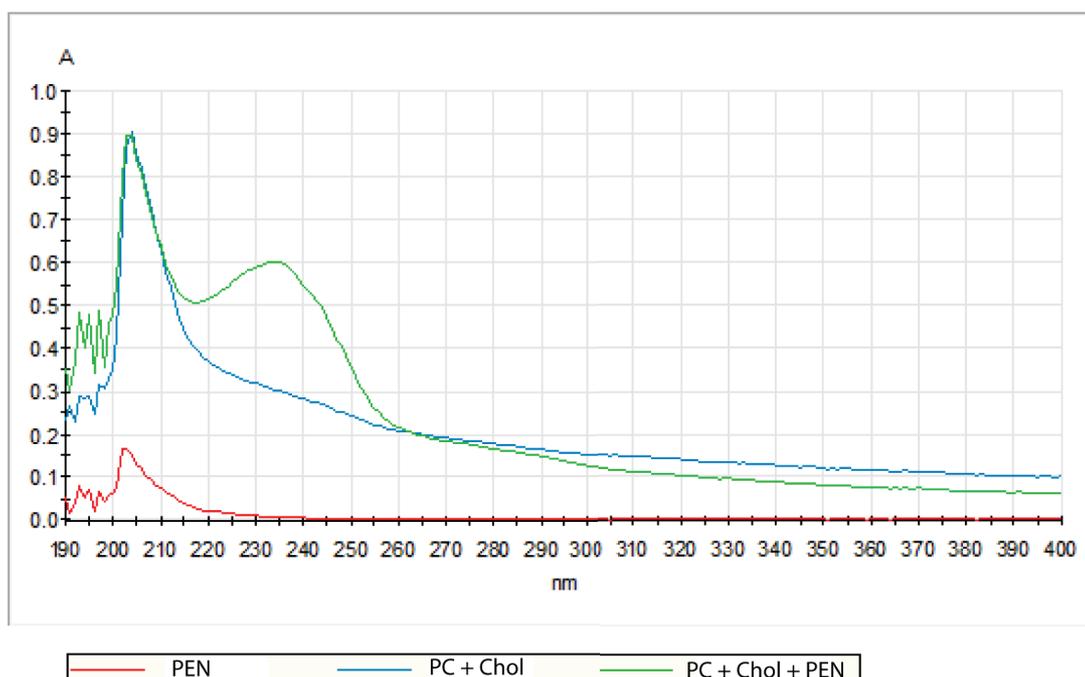


Figura 5.10: Comparación de los espectros de absorción de las soluciones de liposomas que contienen penicilina y las que no, para una muestra de relación de concentraciones  $[PC]:[PEN]=1:0,05$

La diferencia entre las soluciones de liposomas que no contienen penicilina con las que si la contienen (Figura 5.10) aparecieron en ciertas medidas de los espectros de absorción y no fue un resultado reproducible, lo que quiere decir que el segundo pico de absorción puede deberse también a un error sistemático en la medición de los espectros. La influencia del proceso de extrusión en el espectro de absorción se registra en la Figura 5.11 para la muestra de relación  $[PC]:[PEN] = 1:0,05$

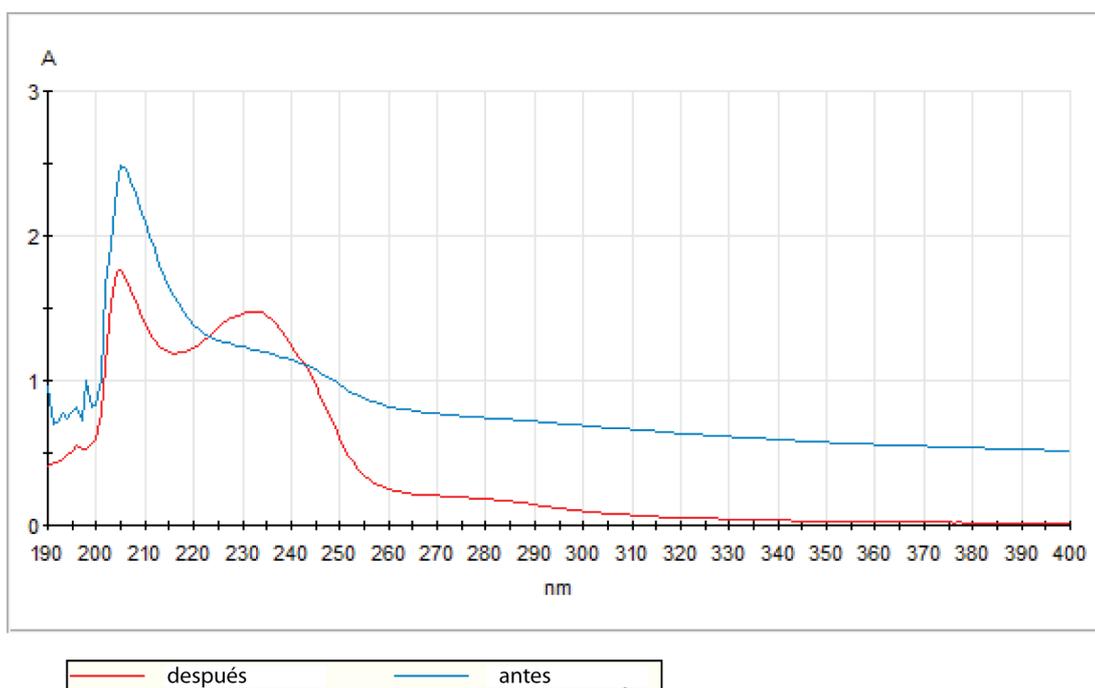


Figura 5.11: Espectros de absorción de una solución de liposomas con relación de concentraciones [PC]:[PEN]=1:0,05 antes y después del proceso de extrusión

La solución de liposomas encapsulando penicilina de relación de concentraciones [PC]:[PEN]=1:0,05 mostró el mayor cambio en el espectro después de la extrusión, debido a que existe menor cantidad de penicilina sin encapsular en la solución por lo que no se produce un menor apantallamiento de la luz. La longitud de onda en la que las soluciones de liposomas absorben la luz son las mismas para todas las muestras, aproximadamente 210 nm y 230 nm en caso de tener dos picos de absorción. Para descartar la opción del apantallamiento de la luz por las moléculas libres en la solución se debe implementar el procedimiento de ultracentrifugación de la solución para “lavar” la solución de todas las moléculas libres y poder medir solo la absorción debido a los liposomas.

# Capítulo 6

## Discusión y Conclusiones

En el presente trabajo se reporta el desarrollo de un método para la preparación de liposomas a escala de laboratorio, así como de su caracterización. Los liposomas de tamaño nanométrico se prepararon utilizando el método de evaporación-hidratación conjuntamente con la extrusión. La caracterización de sus tamaños se realizó mediante Dispersión Dinámica de Luz, específicamente se analizaron las funciones de correlación asociadas a la dispersión de luz para obtener el tamaño promedio de los liposomas así como información sobre la distribución de tamaños. Con esta información se estudió la evolución de los tamaños con el tiempo para encontrar la relación de concentraciones con la que se obtienen los liposomas más estables.

Los liposomas se prepararon con diferentes mezclas de fosfatidilcolina, colesterol y penicilina. Se observó que la incorporación de colesterol en los liposomas, no resulta en ningún cambio en el diámetro promedio de las muestras extruídas. Sin embargo, para los liposomas no extruídos, la adición de cierta concentración de colesterol produce un cambio significativo en su diámetro promedio (Tabla 5.1). La adición de penicilina a las soluciones resultó en liposomas de menor tamaño (Tabla 5.5). Los procesos de sonicación y extrusión produjeron un marcado cambio en el tamaño de los liposomas con diferentes relaciones de concentraciones de PC, Chol y PEN. En el conjunto de experimentos llevados a cabo para este trabajo en particular, al usar la relación de concentraciones  $[PC]:[Chol] = 1:0,2$  se obtuvieron los liposomas más estables y de menor tamaño (Tabla 5.4); por lo que fue la relación utilizada para estudiar el efecto de la concentración de penicilina en la solución de liposomas. Los tamaños más pequeños

de liposomas, y el menor Índice de Polidispersión se alcanzaron con la relación de concentraciones  $[PC]:[PEN] = 1:0,05$  (Tabla 5.7), las muestras más estables de las muestras preparadas fueron las de relación de concentraciones  $[PC]:[PEN] = 1:0,1$  (Figura 5.7).

El análisis inicial de las Funciones de Auto Correlación se realizó usando el método de cumulantes, los resultados de estos análisis se validaron con los resultados proporcionados por el software incluido en el equipo analizador de tamaños para las diferentes relaciones de concentración de fosfatidilcolina y colesterol (Tabla 5.2) y de fosfatidilcolina y penicilina (Tabla 5.6). El diámetro efectivo ( $d_{eff}$ ) e índice de polidispersidad (PDI) proporcionados por el software del equipo, son similares al diámetro hidrodinámico ( $d_z$ ) y al índice de polidispersidad ( $Q$ ) obtenidos con el método de cumulantes, para las muestras con fracción de colesterol y penicilina variable.

A pesar de que los diámetros hidrodinámicos y los índices de polidispersidad obtenidos con el método de cumulantes son muy cercanos a los proporcionados por el software del equipo analizador de tamaños de partículas, existe la inconsistencia entre el tamaño de poro usado en la extrusión,  $100\text{ nm}$ , con los diámetros efectivos obtenidos que fueron mayores a este valor en todos los casos. Ya que las distribuciones (Figura 5.2) se obtuvieron después de que la solución pasara por el proceso de extrusión, a través de membranas de  $100\text{ nm}$ , la existencia de una distribución para tamaños mayores a este valor también es una inconsistencia del software incluido en el equipo analizador de tamaños. Además ciertos parámetros necesarios para el ajuste de mínimos cuadrados, de las distribuciones proporcionadas por el equipo, son desconocidos. Todas estas justificaciones llevaron a desarrollar un ajuste independiente mediante la inversión de Laplace para obtener las distribuciones de tamaños a partir de la FAC (Secciones 5.1.2 y 5.2.2).

Teniendo en cuenta que la forma de la distribución es muy sensible a los parámetros  $\Gamma_0$  y  $\alpha$  que se elijan para construir la matriz ( $\mathbf{m}$ ) (Sección 4.3), suponemos que el equipo realiza el ajuste utilizando criterios que desconocemos para definir parámetros como estos. El algoritmo de mínimos cuadrados no negativos desarrollado para la obtención de las distribuciones bimodales de tamaño, es similar a los algoritmos de los programas EXSAMP y CONTIN [12]. Estos programas son aproximaciones para “sobre ajustar” los datos, estos entregan una distribución más realista con

estabilidad y reproducibilidad. Desafortunadamente, el número de parámetros extra requeridos generalmente exceden los grados de libertad tolerados, por lo tanto no existe una solución única. Por ejemplo cuando se usan un gran número de funciones exponenciales para representar la distribución casi continuamente, minimizar  $\chi^2$  resulta en distribuciones sin sentido debido a que la información requerida para reconstruir la distribución con tal detalle está enterrada en el ruido [12].

Al comparar las distribuciones obtenidas mediante el algoritmo desarrollado (Figuras 5.1 y 5.5) con las distribuciones proporcionadas por el software del equipo de la Figura 5.2 y 5.6, observamos que los tamaños más probables son menores en las distribuciones calculadas que en las entregadas por el equipo, esto se debe también a la sensibilidad del ajuste de mínimos cuadrados a la elección de los parámetros iniciales  $\Gamma_0$  y  $\alpha$ . Esta baja resolución se convierte en una clara desventaja de la técnica utilizada, una desventaja que ya ha sido reportada "las partículas deben diferir en tamaño en 50% o más para que la espectroscopía de foto correlación sea capaz de detectar dos picos" [29]. Además el método no provee datos reales de una "distribución de tamaños", sino un tamaño promedio y un estimado de la desviación estándar; una pequeña cantidad de pequeñas partículas se pueden "perder" fácilmente con un mayor número de partículas grandes y solo se pueden medir partículas pequeñas ( $< 3 \mu m$ ) con suficiente movimiento Browniano, todas las partículas grandes están fuera del rango del instrumento.

El análisis de la evolución temporal del tamaño promedio de los liposomas reveló que este se mantiene estable por al menos tres días, tiempo durante el cuál se hizo un seguimiento de su diámetro efectivo e índice de polidispersidad. Visiblemente la mayoría de suspensiones mantuvieron su característica coloidal, es decir no se formaron aglomerados ni se observó precipitación. Por lo que los liposomas preparados en este proyecto son útiles para el transporte de fármacos y pueden tener aplicaciones médicas.

Del análisis de espectroscopía se obtuvo que la variación de los espectros de absorción después del proceso de extrusión es más evidente con la relación de concentraciones [PC]:[PEN] = 1:0,05 debido a que existen un menor número de moléculas de penicilina sin encapsular en la solución lo que produce un menor apantallamiento de la absorción. La variación o evolución del espectro de absorción después de la extrusión de las muestras con las diferentes concentraciones de PEN (Figura 5.9) se puede deber tanto al apantallamiento de la luz, debido a los fosfolípidos (PC y Chol) y moléculas de PEN

libres en la solución; como a la reorganización de las moléculas de PEN y Chol en la membrana de los liposomas.

Los liposomas pueden llevar fármacos hidrofílicos mediante su encapsulamiento o fármacos hidrofóbicos mediante el fraccionamiento de estos fármacos en las regiones no polares [42]. Se espera que los liposomas, cuyos componentes son no tóxicos, se usen para la captura y entrega efectiva de fármacos en organismos humanos o animales. La calidad de la nanoformulación se podrá definir por la velocidad de liberación del fármaco, la especificidad de la liberación y la toxicidad de la formulación, estos parámetros son específicos para una formulación particular [41]. La eficacia del método de preparación se podrá evaluar mediante el nivel de encapsulamiento del fármaco. Para esto es necesario someter las muestras a ultracentrifugación de por lo menos  $70000rpm$  [8], que permitirá “lavar” los liposomas de los lípidos y otros solutos que se encuentran libres en la suspensión sin conformar ninguna estructura vesicular. Así se podrá descartar el apantallamiento debido a las moléculas solas suspendidas en la solución y evaluar cuantitativamente el nivel de encapsulamiento mediante el análisis de los espectros de absorción.

# Referencias

- [1] Kozubek, A., Gubernator, J., Przeworska, E., Stasiuk, M. 2000. Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes. *Acta Biochimica Polonica* Vol 47 3: 639-649
- [2] Bangham, A.D., Standish, M.M. and Watkins, J.C. 1965. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238-252.
- [3] Alsarra, I., Bosela, A.A., Ahmed, S.M., Mahrous, G.M. 2005. Proniosomes as a drug carrier for transdermal delivery of ketorolac. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 59. 485-490
- [4] Hallett, F. R., Nickel, B., Samuels, C., Krygsmann, P. Determination of vesicle size distributions by freeze-fracture electron microscopy. *J. El. Microscopy Techniques*. In press.
- [5] Hallett, F. R., Watton, J., Krygsmann, P. 1991. Vesicle sizing, Number distributions by dynamic light scattering. *Biophys. J. Biophysical Society.* 59: 357-362
- [6] Lasic, D. D. 1988. The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.* 256:1-11.
- [7] Bittman, R., S. Clejan, S. Lund-Kats, M. C. Phillips. 1984. Influence of cholesterol on bilayers of ester- and ether-linked phospholipids: permeability and <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance measurement. *Biochim. Biophys. Acta.* 772:117-126.
- [8] Pantos, A., T. Dimitris, P. Constantinos, G. Noumesis. 2005. Enhanced Drug Transport from Unilamellar to Multilamellar Liposomes Induced by Molecular Recognition of their Lipids Membranes. *Langmuir.* 21:6696-6702.
- [9] Instruction Manual for 90Plus/BI-MAS. Brookhaven Instruments Corporation.
- [10] Ehrenstein, G., H. Lecar. 1982. *Methods of experimental physics; v. 20 Biophysics.* Academic press, inc. London.

- [11] Ford, N.C. 1983. Theory and Practice of Photon Correlation Spectroscopy, in Measurement of Suspended Particles by Quasi-elastic Light Scattering. ed. B.E. Dahneke. Wiley-Interscience, New York.
- [12] Tscharnuter, W. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. Brookhaven Instruments Corporation.
- [13] Tinoco, I., Sauer, K., Wang, J., Puglisi, J. 2002. Physical Chemistry Principles and Applications in Biological Sciences. Prentice Hall. 4th Edition. 213-218.
- [14] Grumelard, J. 2004. Biomimetic Superstructures from Amphiphilic ABA - Triblock Copolymers. BASEL.
- [15] Goodsell, D. 2004. Biotechnology: lessons from Nature. Wiley-Liss Inc.
- [16] Cooper, R. A., Fischkoff, L. M., Shinitzky, M., Shattil, S.J. 1978. Factor influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid. Biochemistry. 17:327-331.
- [17] Taylor, M. G., Akiyama, T., Smith, I. C. P. 1981. The nuclear dynamics of cholesterol in bilayer membrane: a deuterium NMR study. Chem. Phys. Lipids. 29:327-339.
- [18] Oldfield, E., Chapman, D. 1972. Molecular dynamics of cerebrosidecholesterol and sphingomyelin-cholesterol interactions: implications for myelin membrane structure. FEBS Lett. 21:303-306.
- [19] Lasic, D.D. 1995. Handbook of Biological Physics. Chapter 10: Applications of Liposomes. Elsevier Science B.V. Volume 1: 490-504
- [20] Lasic, D.D., 1993, Liposomes: From Physics to Applications. Elsevier. Amsterdam.
- [21] Fidler, I.J., D. Fan, Y. Ichinose. 1989. Potent in situ activation of murine lung macrophages and therapy of melanoma metastases, Invas. Metastasis 9, 75-88.
- [22] van Holde, K. E., Johnson, C., Ho, P. 1998. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall. New Jersey.
- [23] Jackson, J. D. 1998. Classical Electrodynamics. John Wiley and sons. United States of America. Third Edition. pg 465.

- [24] Jackson, J. D. 1998. Classical Electrodynamics. John Wiley and sons. United States of America. Third Edition. pg 457.
- [25] Feynman, R. P. 1987. Física Vol. 2. Electromagnetismo y Materia.
- [26] Berne, B. J., Pecora, R. 2000. Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics. Dover Publications. New York.
- [27] Tanford, C. 1957. Physical Chemistry of Macromolecules. Wiley and Sons, New York.
- [28] McWhirter, J.G. 1980. A Stabilized Modelfitting Approach to the Processing of Laser Anemometry and other Photoncorrelation Data. *Opt. Acta*, 27, 83.
- [29] Provencher, S.W. 1979. Inverse Problems in Polymer Charac-terization: Direct Analysis of Polydispersity with Photon Correlation Spectroscopy, *Macromol. Chem.* 180, 201.
- [30] Provencher, S.W. 1982. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*. 27 (3): 229
- [31] Chen, Z., Rand, R. 1997. The Influence of Cholesterol on Phospholipid Membrane Curvature and Bending Elasticity. *Biophysical Journal* 73: 267-276
- [32] Parente, R. A., and B. R. Lentz. 1984. Phase behavior of largeunilamellar vesicles composed of synthetic phospholipids. *Biochemistry*. 23:2353-2362.
- [33] Domazou, A. S., and P. L. Luisi. 2002. Size distribution of spontaneously formed liposomes by the alcohol injection method. *J. Liposome Res.* 12:205-220.
- [34] Lasic, D. D. 1987. A general model of vesicle formation. *J. Theor. Biol.* 124:35-41.
- [35] Nyborg, W. L. 2001. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: General review. *Ultrasound Med. Biol.* 27:301-333
- [36] Brennen, C. E. 1995. Cavitation and Bubble Dynamics. Oxford University Press, New York.
- [37] Richardson, E., Pitt, W., Woodburyz, D. 2007. The Role of Cavitation in Liposome Formation. *Biophysical Journal* 93:4100-4107

- [38] Hanus, L., Ploehn, H. 1999. Conversion of Intensity-Averaged Photon Correlation Spectroscopy Measurements to Number-Averaged Particle Size Distributions. 1. Theoretical Development. *Langmuir*, 15, 3091-3100
- [39] Brookhaven Instruments Corporation's Data Analysis Software (BI-ISDA), version 6.5; Brookhaven Instruments Corporation. Holtsville, New York, 1989.
- [40] Brown, J.C., Pusey, P.N., Dietz, R. 1975. Photon Correlation Study of Polydisperse Samples of Polystyrene in Cyclohexane. *J Chem. Phys.*, 62, 1136.
- [41] Bhardwaj, U., Burgess, D. 2010. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*. 388:181-189, 2010.
- [42] Schreier, H., Bouwstra, J. 1994. Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery, *J. Control. Release* 30: 1-15.
- [43] Hunt, C., Tsang, S. 1981. Tocopherol retards auto-oxidation and prolongs the shelf-life of liposomes, *Int. J. Pharm.* 8: 101-110.
- [44] Wong, M., Thompson, T. 1982. Aggregation of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles, *Biochemistry* 21: 4133-4139.
- [45] Yoshioka, T., Sternberg, B., Florence, A.T. 1994. Preparation and properties of vesicles (niosomes) of sorbitan monoesters (Span 20, 40, 60, and 80) and a sorbitan triester (Span 85), *Int. J. Pharm.* 105: 1-6.



# ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

## FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA DE FÍSICA

### ORDEN DE EMPASTADO

De acuerdo a lo estipulado en el artículo 83 del Reglamento del Sistema de Estudios de las Carreras de Formación Profesional y de Postgrados, aprobado por el Consejo Politécnico en sesión del 16 de agosto del 2011 y una vez verificado el cumplimiento del formato de presentación establecido, se autoriza la impresión y encuadernación final del Proyecto de Titulación presentado por el señor **DAVID ANTONIO BRITO IMBAQUINGO**.

Fecha de autorización: Quito, D.M., 20 de mayo de 2013

  
Dr. Eduardo Ávalos  
**DECANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

