



UNA NUEVA  
APROXIMACIÓN  
EXPERIMENTAL EN  
DISPERSIÓN DINÁMICA  
DE LUZ

TESIS

Para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias Interdisciplinarias

Presenta:

Lic. José Alejandro Rivera Morán

Director de Tesis:

Dr. José Luis Arauz Lara



Abril 2019

## Comité Académico

Dr. Bernardo José Luis Arauz Lara

Director de tesis

Dra. Rosario Esperanza Moctezuma Martiñón

Sinodal

Dr. José Guadalupe Sampedro Pérez

Sinodal

Dr. Juan Rodrigo Vélez Cordero

Sinodal

# Agradecimientos

En esta etapa de mi preparación académica merecen reconocimiento especial a los integrantes del Instituto de Física:

Del laboratorio de Fluidos Complejos: Dr. José Luis Arauz, por recibirme en su laboratorio y realizar el proyecto. A la compañera y amiga del laboratorio “Marichuy” Martínez.

A los compañeros del posgrado: por el apoyo experimental y moral. Especial agradecimiento a los doctores que compartieron su conocimiento durante los cursos académicos, de los cuales aprecio su tiempo y dedicación. Y además, por su disponibilidad, apoyo e interés: Dr. Edgardo Ugalde, Dr. Alfredo Méndez y Dr. Said Aranda.

Por otro lado, el soporte de los seres queridos que también aportaron en su momento a mantener el enfoque y el ánimo de lo que fue esta etapa: a mi pareja, a mis padres y hermanos, a mis tíos y abuelos.

Valoro mi trabajo realizado durante este tiempo por todo lo que ofreció y lo que me desafió. Además, del conocimiento adquirido y otros fortalecidos a través de los meses, durante las clases, en el laboratorio y en discusiones.

# *Abstract*

The phenomenon of light scattering by colloidal particles has been well researched for decades, generating essential knowledge of how is the microscopic behavior of particles in diverse media and conditions; jointly the technological and scientific developments have participated in it in the form of new procedures and in the extension of the light scattering technique. On the other hand, it is interesting, from the scientific and industrial point of view, the study of the encapsulation of microscopic and nanometric particles by other systems of the same size scale, such as liposomes. This type of confinement comes in different forms and with different purposes (microbiological systems, in food, medicines, etc.), but the phenomenon has the same explainable scientific basis that can be transferred to other similar systems. Therefore, it is necessary to know the dynamics of particles confined in liposomes to find what properties influence their behavior and thus, understand their macroscopic behavior. The technique of dynamic light scattering is widely used in all areas where colloidal or similar suspensions are used, however, the versatility of the technique has changed by little unlike the systems, which they become increasingly complex. It is in this vision of innovation in the experimental technique in which this work is established: to complement the technique of dynamic light scattering to a “hybrid”, by adapting an optical arrangement that allows the visualization of samples in a parallel manner. In this work, we present the proposal of an experimental arrangement that combines the dynamic light scattering with videomicroscopy, with the purpose of both being a complement between themselves, generating an opening in the investigation of complex systems. Then the first applications in the use of this optical arrangement in known colloidal suspensions are presented, and then to return to the idea of the analysis of systems in confinement, where the first investigations of colloidal particles that move in the vicinity of the membranes are shown.



# Resumen

El fenómeno de dispersión de luz por partículas coloidales ha sido muy bien investigado por décadas, generando conocimiento esencial de cómo es el comportamiento microscópico de partículas en diversos medios y condiciones; conjuntamente los desarrollos tecnológicos y científicos han participado en ello en forma de nuevos procedimientos y en la ampliación de la técnica de dispersión de luz. Por otro lado, resulta interesante, desde el punto de vista científico e industrial, el estudio del encapsulamiento de partículas microscópicas y nanométricas por otros sistemas de la misma escala de tamaño, como son los liposomas. Este tipo de confinamiento se presenta en distintas formas y con distintos fines (sistemas microbiológicos, en alimentos, medicamentos, etc.), pero el fenómeno tiene la misma base científica explicable que puede ser trasladada a otros sistemas similares. Por lo tanto, es necesario el conocimiento de la dinámica de partículas confinadas en liposomas para encontrar qué propiedades influyen en su comportamiento y así, entender su conducta macroscópica. La técnica de dispersión dinámica de luz es ampliamente usada en todos los ámbitos en los que se trabaja con suspensiones coloidales o similares, sin embargo, la versatilidad de la técnica ha cambiado poco a diferencia de como lo hacen los sistemas de estudio, los cuales, se vuelven cada vez más complejos. Es en esta visión de innovación en la técnica experimental en la que se establece este trabajo: complementar la técnica de dispersión dinámica de luz a una “*híbrida*”, mediante la adaptación de un arreglo óptico que permite visualizar muestras de forma paralela. En este trabajo, se expone la propuesta de un arreglo experimental que conjunta la dispersión dinámica de luz con videomicroscopía, con la finalidad de que ambas sean un complemento entre ellas mismas, generando una apertura en la investigación de sistemas complejos. Después se presentan las primeras aplicaciones en el uso de este arreglo óptico en suspensiones coloidales conocidas, para luego retomar la idea del análisis de sistemas en confinamiento, en donde se muestran las primeras indagaciones de partículas coloidales que se mueven en las proximidades de las membranas liposomales.

# Contenido

1	Introducción .....	1
2	Dispersión de luz .....	4
2.1	Técnica de dispersión dinámica de luz.....	8
2.2	Funciones de correlación en dispersión dinámica de luz .....	11
2.3	Análisis del correlograma e interpretación física del sistema .....	15
3	Arreglo óptico para DLS vertical.....	18
3.1	Comparación del arreglo óptico .....	26
3.2	Similitudes con arreglos ópticos de técnicas diferentes de dispersión de luz .....	29
4	Aplicación experimental.....	31
4.1	Muestras.....	32
4.1.1	Soluciones acuosas y suspensiones coloidales.....	32
4.1.2	Vesículas.....	33
4.1.3	Celdas planas.....	35
4.1.4	Celdas tubulares para el sistema de dispersión en horizontal.....	38
4.2	Resultados .....	39
4.2.1	Partículas coloidales.....	41
4.2.2	Sistemas compuestos: vesículas con partículas.....	49
4.2.3	Discusión.....	58
5	Conclusiones.....	62

# Índice de figuras y tablas

## Figuras

<b>Figura 2.1.</b> Representación de una onda electromagnética	5
<b>Figura 2.2.</b> Esquema de la radiación electromagnética	6
<b>Figura 2.3.</b> Patrón de interferencia por la dispersión de luz	7
<b>Figura 2.4.</b> Esquema de un arreglo óptico para DLS	10
<b>Figura 2.5.</b> Traza de la variación de la intensidad de la luz	11
<b>Figura 3.1.</b> Arreglo óptico experimental híbrido	19
<b>Figura 3.2.</b> Desviación de la luz dispersada en las interfaces	21
<b>Figura 3.3.</b> Dominio de la función de refracción en DLS vertical	23
<b>Figura 3.4.</b> Intersección de los planos cartesianos en la alineación	24
<b>Figura 4.1.</b> Ensamble de la celda de electroformación	34
<b>Figura 4.2.</b> Ensamble de la celda plana para DLS	38
<b>Figura 4.3.</b> Funciones de correlación: concentraciones	40
<b>Figura 4.4.</b> Funciones de correlación: partículas en diferente medios	42
<b>Figura 4.5.</b> Modelos de las tasas de decaimiento	43
<b>Figura 4.6.</b> Distribución de los radios de las partículas de 300 nm	47
<b>Figura 4.7.</b> Distribución de los radios de las partículas de 500 nm	49
<b>Figura 4.8.</b> Funciones de correlación: vesículas medios acuosos	51
<b>Figura 4.9.</b> Visualización de vesículas con partículas coloidales	53
<b>Figura 4.10.</b> Funciones de correlación: muestras de PS 500 nm	55
<b>Figura 4.11.</b> Funciones de correlación: muestras FP 88 nm	56

## Tablas

<b>Tabla 3.1.</b> Relación entre ángulos de dispersión-ángulos de detección	22
<b>Tabla 4.1.</b> Protocolo de electroformación	34

## Símbolos y abreviaciones

<b>E</b> : campo eléctrico	$g_2(q, t)$ : función de correlación de la intensidad (de la luz dispersada normalizada)
<b>B</b> : campo magnético	$\Delta t$ : intervalo de tiempo
<b>S</b> : vector de Poynting	$D$ : coeficiente de difusión
<b>I</b> : irradiancia	$G(r, t)$ : función de correlación de la densidad de partículas
$v$ : volumen	$\Gamma$ : tasa de decaimiento de las funciones de correlación de la dispersión de luz
$\lambda$ : longitud de onda	$g_1(q, t)$ : función de correlación del campo (eléctrico dispersado normalizada)
<b>V</b> : volumen microscópico, volumen de dispersión	$F(q, t)$ : función de dispersión intermedia
<b>P</b> : potencia	<b>B</b> : línea base en la relación de Siegert
<b>W</b> : Watts, unidad de energía [energía/tiempo]	$\beta$ : intercepto en la relación de Siegert
<b>s</b> : segundo, unidad de tiempo	$R_H$ : radio hidrodinámico
$\mathbf{k}_i$ : vector de onda incidente	$K_B$ : constante de Boltzmann
$\mathbf{k}_f$ : vector de onda final	$T$ : temperatura
$\mathbf{q}(\theta)$ : vector de dispersión	$\eta$ : viscosidad
$\theta$ : ángulo de dispersión	$\mu$ : movilidad
$\pi$ : número pi	$\zeta$ : coeficiente de arrastre
$n$ : índice de refracción	$G(\Gamma)$ : distribución normalizada de las tasas de decaimiento
<b>DLS</b> : dispersión dinámica de luz ( <i>dynamic light scattering</i> )	$M(-\tau, \Gamma)$ : función generadora de momentos de la distribución
$\mathbf{r}$ : vector de posición	$K(-\tau, \Gamma)$ : función generadora de cumulantes
$t$ : tiempo (1)	$\kappa_i$ : coeficientes de los cumulantes
$\tau$ : tiempo (2)	
$\mathbf{n}_i$ vector de polarización de onda electromagnética incidente	
$\omega_i$ : frecuencia de la onda electromagnética incidente	

L1: lente 1 (arreglo experimental)  
 $n_{MA}$ : índice de refracción del medio acuoso  
 $n_V$ : índice de refracción del vidrio  
 $n_A$ : índice de refracción del aire  
 $\theta_1$ : ángulo de dispersión incidente  
 $\theta_2$ : ángulo de dispersión la luz refractada (interfaz medio acuoso/vidrio)  
 $\theta_3$ : ángulo de dispersión final, ángulo de detección  
 $\theta_c$ : ángulo crítico (refracción)  
M: unidad molar  
L2: lente 2 (arreglo experimental)  
DDM: microscopía dinámica diferencial, *differential dynamic microscopy*

TIRM: microscopía de reflexión total interna, *total internal reflection microscopy*  
PS: poliestireno  
 $w$ : peso (weight)  
g: gramos  
 $Pa$ : pascales, unidad de presión  
 $\Omega$ : resistencia, Ohm  
Egg PC: fosfatidilcolina (fosfolípido)  
 $V_{pp}$ : voltaje pico-pico  
 $Hz$ : Hertz, unidad de frecuencia  
*min*: minuto  
SUV's/LUV's: vesículas pequeñas/grandes de una sola capa  
 $H_2SO_4$ : ácido sulfúrico  
 $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno  
PP: precipitados

UNA NUEVA  
APROXIMACIÓN  
EXPERIMENTAL EN  
DISPERSIÓN DINÁMICA DE  
LUZ

# 1 Introducción

Cuando las partículas de una suspensión coloidal permanecen y desplazan dentro de un espacio comparable con el tamaño de una partícula, por alguna restricción de barrera o fuerzas externas, se dice que están en confinamiento <sup>[2]</sup>. Algunos ejemplos de suspensiones coloidales en confinamiento son: cuando el movimiento de sus constituyentes está delimitado a un espacio cuasi-bidimensional por la presencia de paredes <sup>[4, 36]</sup>; otros mediante la aplicación de campos externos de luz, como las pinzas ópticas, que son usadas para limitar y condicionar su desplazamiento <sup>[3]</sup>. Además, otro caso especial de sistemas coloidales confinados consiste en su encapsulamiento dentro de liposomas, también conocidos como vesículas <sup>[37]</sup>.

Las vesículas son cuerpos esféricos tipo “cascarón”, cuya membrana es una bicapa constituida de moléculas de fosfolípidos. Espontáneamente por entropía, estas moléculas se agregan unas con otras por la insolubilidad de sus colas hidrofóbicas al medio acuoso, dejando la cabeza hidrofílica expuesta al medio de su interior y al de exterior. Se pueden fabricar vesículas por distintas metodologías además de que contengan en su interior partículas coloidales en suspensión <sup>[9-11, 14, 15]</sup>. Estos sistemas compuestos por partículas encapsuladas en vesículas, a primera aproximación, tienen similitudes básicas con las células biológicas, por lo que el entender el comportamiento de partículas encapsuladas puede dar indicios sobre la comprensión del confinamiento celular <sup>[8, 23, 25, 27, 34]</sup>.

Inclusive no solo se puede ver como un modelo celular simplista, sino que el propio estudio del confinamiento de partículas y moléculas en vesículas es de interés farmacéutico para el desarrollo de medicamentos liberados por medio de vehículos biocompatibles, ya que podría conocerse el comportamiento del medicamento encapsulado en que si se agrega o es estable y en las condiciones de los parámetros que maximicen su eficiencia [5].

Sistemas similares a los de partículas coloidales confinadas en vesículas, y algunos otros ejemplos de confinamiento espacial [6-8, 12, 13, 25, 36, 37], ya se han estado estudiando pero de una forma descriptiva y por técnicas de microscopía como la confocal ultrarrápida y de fluorescencia; las cuales resultan efectivas para un rango de tiempo pero carecen de resolución temporal a tiempos de microsegundos y menores, algo que puede ser crucial para el estudio de las partículas coloidales [16, 17, 19, 20]. Pocos estudios se han hecho en cuanto a la aproximación experimental por dispersión de luz para el estudio de partículas en confinamiento [36], y por separado, otras investigaciones en el confinamiento de partículas dentro de vesículas [37]. Sin embargo, específicamente no se ha descrito algún estudio de confinamiento y que la aproximación experimental de estudio sea basada en el fenómeno de dispersión de luz.

La técnica experimental de dispersión dinámica de luz, como se mostrará en el capítulo siguiente más detalladamente, analiza la correlación de la intensidad de la dispersión de luz a lo largo del tiempo para extraer las propiedades dinámicas de las partículas coloidales, que son en sí los objetos dispersantes de luz. La ventaja de esta técnica es su resolución temporal la cual puede llegar ser del orden de los nanosegundos.

El modelo experimental de confinamiento que se presenta como el de la suspensión coloidal dentro de vesículas, muestra una complejidad conceptual dado que son dos sistemas de especies distintas que mantienen una estrecha relación, puesto que el movimiento de los elementos confinados dentro de las vesículas cambia solo por la presencia de una frontera, la cual contribuye a la aparición interacciones electrostáticas e hidrodinámicas entre las partículas y de ellas con la pared vesicular. Además, un arreglo experimental para dispersión de luz queda superado en cierta medida, en cuanto a especificidad de la región donde se realiza el experimento, y en la incertidumbre que genera al no tener una clara imagen de qué objetos son los que están dispersando. Con esta inquietud, en la manera de abordar experimentalmente a los sistemas de



confinamiento, en este trabajo se plantea la propuesta de un arreglo experimental tipo “híbrido” que conjunta la técnica de dispersión dinámica de luz y microscopía; con el objetivo de identificar visualmente a los componentes del sistema, así como de poder seleccionar una región de la muestra y sobre ésta ejecutar los experimentos de dispersión dinámica de luz. Con la información recabada, se procedería a la interpretación física de las funciones de correlación temporales para vislumbrar la dinámica de los sistemas confinados.

Para entrar al entendimiento de la propuesta del arreglo óptico experimental, primero se muestra la teoría y conceptos básicos de la dispersión de luz, además de la propia técnica de dispersión dinámica de luz. Luego, se describe la propuesta de aproximación experimental y se discuten sus ventajas frente a los arreglos ópticos convencionales para la práctica de la técnica de dispersión de luz, así como de sus limitantes. Finalmente, se exhibe la puesta en práctica del aparato propuesto con las mediciones de dispersión de luz en sistemas coloidales simples y sistemas mixtos de vesículas y partículas coloidales, para terminar con las conclusiones finales del trabajo.

# 2 Dispersión de luz

En primera instancia, de las ecuaciones de Maxwell se deduce que para un campo eléctrico variable con el tiempo,  $\mathbf{E}(t)$ , se genera un campo magnético  $\mathbf{B}(t)$  que es perpendicular a  $\mathbf{E}(t)$ . De la misma manera, un campo magnético variable genera uno eléctrico y ambos son perpendiculares. Con esto parte la descripción ondulatoria de la luz, la cual está compuesta por la unión de un campo eléctrico y uno magnético; ambos oscilantes en el tiempo y ortogonales entre sí, para conformar una onda electromagnética. Asimismo, se le asocia un vector de propagación a la onda electromagnética (vector de Poynting,  $\mathbf{S}$ ), el cual describe la magnitud y direccionalidad del flujo de energía de tal onda y es también ondulatorio en el tiempo y ortogonal a los dos campos anteriores (figura 2.1). El valor promediado en el tiempo del vector de Poynting  $\langle \mathbf{S} \rangle$  mide la *irradiancia*  $I$ , a su vez,  $I \propto E^2$ . Como el campo  $\mathbf{E}$  es más efectivo al ejercer fuerzas sobre las cargas dipolares que  $\mathbf{B}$ , es considerado mayoritariamente para la descripción de la luz, por lo que las ecuaciones de la dispersión de luz están expresadas en términos de este campo eléctrico <sup>[1]</sup>.

Una vez que se ha considerado a la luz como un fenómeno de naturaleza ondulatoria, por las variaciones armónicas en la magnitud de sus componentes de los campos  $\mathbf{E}$  y  $\mathbf{B}$ , se procede a describir el fenómeno de dispersión de luz que es la base del presente trabajo.

---

## Electromagnetic Wave

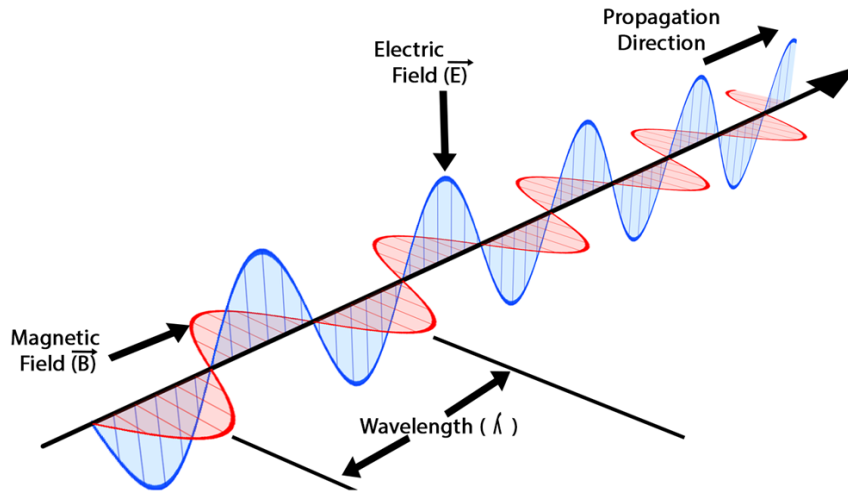
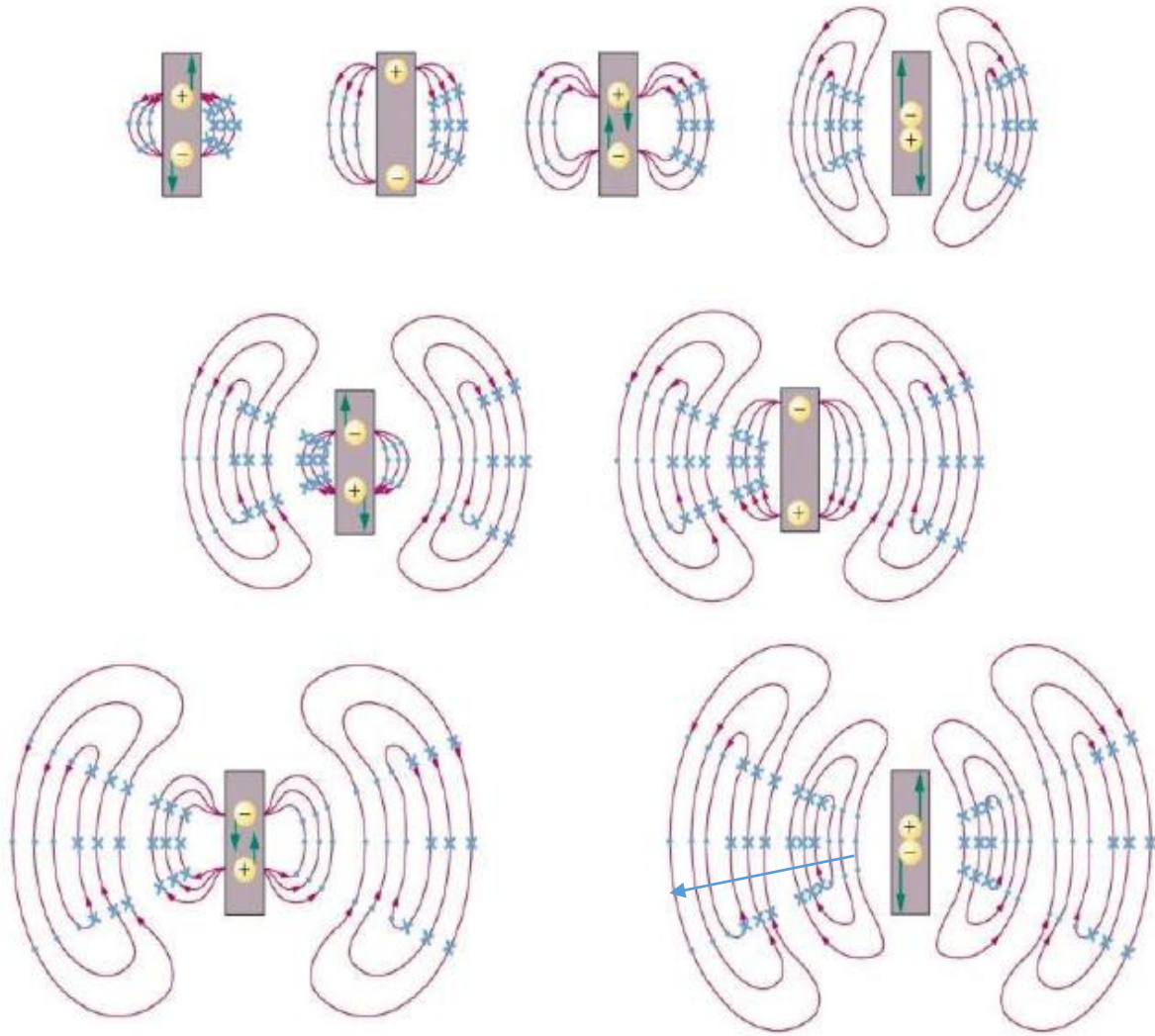


Figura 2.1. Representación de una onda electromagnética en donde se distingue la ortogonalidad de los campos **E** y **B**.

---

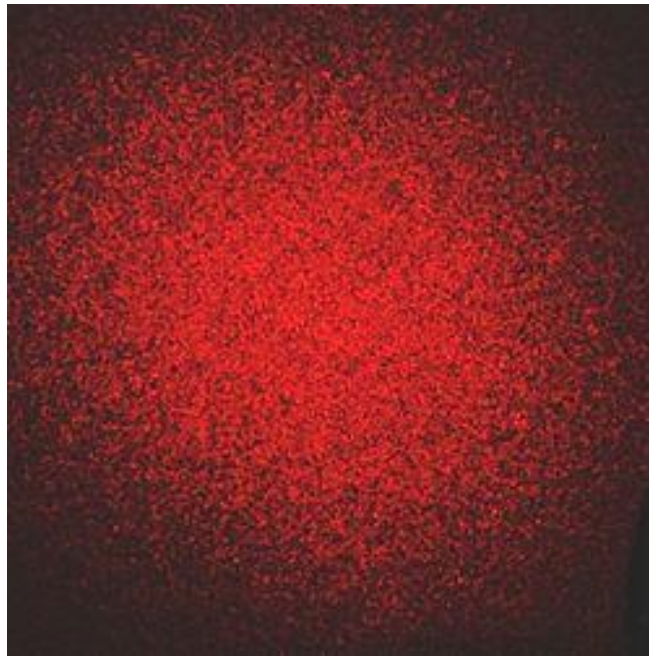
Supongamos que esta onda electromagnética incide sobre un volumen  $v$  tal que  $v < \lambda^3$  (siendo  $\lambda$  la longitud de la onda electromagnética), y que tiene ciertas características dieléctricas que dependen de la posición y el tiempo. El campo eléctrico incidente ejerce una fuerza proporcional sobre las moléculas del volumen dieléctrico, de manera que las polariza y forman los momentos eléctricos dipolares dentro del volumen. Los dipolos eléctricos se alinean y orientan hacia la dirección de la componente del campo **E** que tiene la mayor magnitud. Sin embargo, el campo eléctrico al oscilar con el tiempo, provoca que las moléculas del medio dieléctrico cambien de dirección y, por lo tanto, la orientación de los dipolos eléctricos oscile también con el tiempo. Este cambio de dirección de los dipolos involucra una aceleración de los mismos, y por electrodinámica, cuando se tienen cargas eléctricas aceleradas ocurre la emisión radiación electromagnética (figura 2.2). Como resultado de la propagación de la luz en medios dieléctricos, las moléculas re-irradian ondas electromagnéticas a todas direcciones, de la misma frecuencia y longitud de onda (dispersión elástica, sin pérdida de energía). Entonces este volumen es una fuente secundaria de radiación electromagnética <sup>[1, 16, 17]</sup>.



**Figura 2.2.** Esquema de la radiación electromagnética emitida por un dipolo que oscila. El cambio de orientación del momento dipolar eléctrico implica una aceleración, y a su vez, la aceleración de un dipolo eléctrico genera radiación electromagnética. Las curvas color violeta representan el campo eléctrico de la radiación dispersada mientras que los puntos y las cruces azules simbolizan al campo magnético, que sale y entra perpendicular al plano. Además, es evidente el sentido de la propagación (como una fuente de radiación) y de la longitud de onda, indicadas con la flecha azul.

Pero este volumen  $v$  al que se le puso atención es solo una fracción de un volumen macroscópico  $V$  del que la luz puede incidir. Entonces cada subvolumen  $v$  será una fuente secundaria de emisión de luz, que en conjunto, conforman al volumen  $V$ . Además cada subvolumen tiene propiedades dieléctricas un poco distintas y depende de la posición y del tiempo, por lo que la radiación total final, es la superposición de

todas las ondas radiadas por los subvolúmenes que llegan a interferir una con otras de manera destructiva o constructivamente, total o parcialmente <sup>[1, 16, 17]</sup>. En general, este volumen en donde incide la luz puede estar compuesto por cualquier elemento dieléctrico, como lo son las partículas coloidales, lo que generan patrones de interferencia como los de la figura 2.3. Como estas partículas están sujetas al movimiento Browniano, ocurren fluctuaciones en las propiedades dieléctricas en el volumen  $V$  ocasionando que la intensidad de la luz dispersada también fluctúe. De esta manera, el espectro particular de dispersión está dado por las propiedades de los elementos dispersantes, las cuales son: su forma, tamaño y estructura; así como de sus propiedades dinámicas que están dadas en conjunto con el medio en el que se hallen.



**Figura 2.3.** Patrón de interferencia que proviene de la dispersión de luz de una suspensión coloidal. Se distingue por tener un aspecto moteado dado por la interferencia destructiva y constructiva que la luz tiene en esa precisa posición e instante. Este patrón fluctúa en las intensidades de acuerdo al movimiento Browniano de las partículas coloidales.

---

Es importante tener en cuenta que la evidencia experimental de la radiación dispersada total es la *irradiancia*, a su vez manifestada como luz, ya que la energía que se irradia por la aceleración de los dipolos eléctricos es en forma de fotones <sup>[1]</sup>.

Por consiguiente, la rapidez del flujo de energía es la potencia  $\mathcal{P} = [W/s]$ , conocida también como intensidad. Por lo tanto, al mencionar el término *intensidad* se alude fundamentalmente al concepto de *irradiancia*, con lo cual en el presente trabajo, se tratan ambiguamente los conceptos de *irradiancia* con el de *intensidad* de la luz y se denotan como  $I$ . Sin embargo, la teoría y la técnica de análisis se sustenta en la descripción electromagnética de la luz, por lo que una vez registrada la luz, se procede a relacionarla con el campo eléctrico dispersado al que está asociada.

Cuando la luz incide sobre el volumen  $V$ , ahora renombrado como *volumen de dispersión*, ésta continúa propagándose hacia delante de acuerdo con su vector de onda incidente  $\mathbf{k}_i$ . Por otro lado, la luz que es dispersada se propaga a todas direcciones según su vector de onda final  $\mathbf{k}_f$ . La diferencia de estos dos vectores es el llamado vector de dispersión  $\mathbf{q}(\theta) = \mathbf{k}_f - \mathbf{k}_i$  y su magnitud es

$$|\mathbf{q}(\theta)| = q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.1)$$

donde  $n$  es el índice de refracción del medio,  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz y  $\theta$  es el *ángulo de dispersión* comprendido entre el haz incidente que se propaga recto y el rayo de luz dispersado <sup>[14, 15, 17, 21, 22]</sup>.

En la siguiente sección, se explica cómo es adquirida la luz dispersada experimentalmente, así como su análisis para extraer la información física que relaciona al sistema dispersante.

## 2.1 Técnica de dispersión dinámica de luz

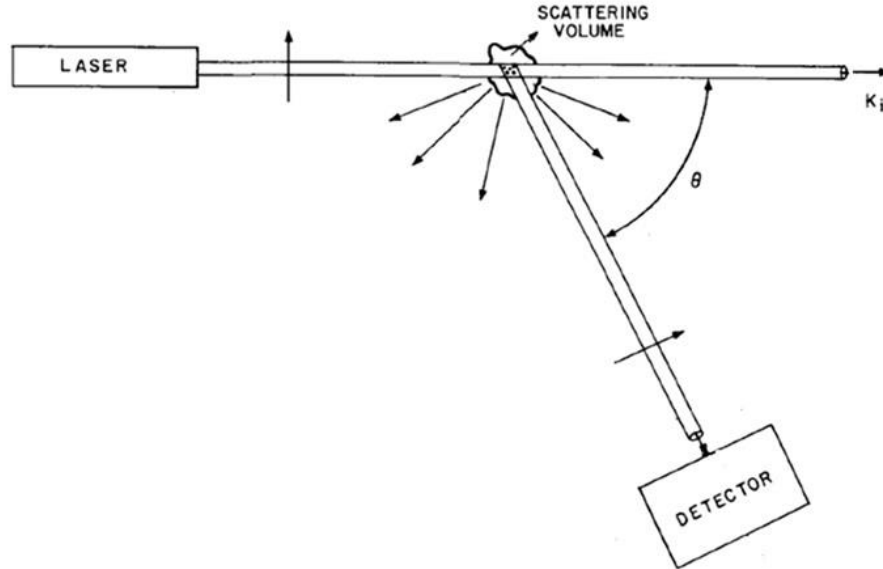
La técnica de dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering* o DLS, por sus siglas en inglés), tiene su sustento en el análisis de las fluctuaciones del campo eléctrico dispersado mediante la aplicación de funciones de correlación y sus

consiguientes procesamientos. Con esto, se obtiene información del sistema que se está estudiando, ya que las características de su función de correlación están relacionadas con propiedades físicas como la forma de las partículas, tamaño promedio, al igual que propiedades dinámicas. A continuación, se describe la técnica de dispersión dinámica de luz.

Para la práctica de un experimento de dispersión dinámica de luz, se establece un arreglo óptico para manipular la luz y lograr el efecto de dispersión (figura 2.4). Como fuente de onda electromagnética plana, monocromática y coherente, se emplea el haz de un láser, descrita como:  $\mathbf{E}_i(\mathbf{r}, t) = \mathbf{n}_i E_0 \exp i[\mathbf{k}_i \cdot \mathbf{r} - \omega_i t]$ . Esta onda muestra una polarización  $\mathbf{n}_i$ , amplitud de  $E_0$ , un vector de onda incidente  $\mathbf{k}_i$ , frecuencia  $\omega_i$  y longitud de onda  $\lambda$ . La característica de este tipo de onda es que los frentes de onda son planos y ortogonales al vector de onda. Después, el haz se hace enfocar, por una lente, para iluminar intensamente un volumen muy reducido de la muestra. Esto tiene el propósito de que tal diminuto volumen pueda ser considerado como un conjunto de subvolúmenes de fuentes secundarias de la reirradiación, como se mencionó anteriormente. A un determinado ángulo de dispersión  $\theta$  se tiene un colector de la luz, el cual es una lente que capta la luz que es dispersada hacia esa misma dirección de  $\theta$ ; la misma lente enfoca la luz dispersada hacia la entrada de una fibra óptica. Por consiguiente, la luz adquirida es conducida por la fibra hasta la entrada de un fotomultiplicador. Este instrumento electrónico va detectando los fotones que van siendo recogidos de la dispersión y amplifica la señal luminosa en forma de fotoelectrones. A la salida del fotomultiplicador, la señal es de tipo pulsos de corriente que son proporcionales a la cantidad de fotones que incidieron en el detector por unidad de tiempo. En seguida, estos pulsos de corriente llegan a dar con el correlador, que computa la *función de correlación de la intensidad* de la luz dispersada. Finalmente, es sobre esta función con la que se traslada la información experimental a su interpretación física electromagnética, cuya teoría es la que se aplica para extraer las propiedades dinámicas del sistema como el coeficiente de difusión y desplazamiento cuadrático medio, principalmente <sup>[16, 17, 19, 20]</sup>.

Existen diferentes técnicas experimentales de dispersión de luz que difieren ya sea en el arreglo óptico o en la manera de adquirir y procesar la información. De manera particular, la dispersión dinámica de luz es una técnica en la que se analiza la variación

temporal de la intensidad de la luz dispersada, es decir, se calcula la correlación de la intensidad de la dispersión. Como se verá en la siguiente sección, una función de correlación es una herramienta matemática comúnmente usada para el análisis de señales o procesos estocásticos; la cual, mide el cambio de alguna propiedad dependiente del tiempo o de la posición con respecto a ella misma, o con respecto a otra propiedad con la que se tenga dependencia. De manera que aplicada esta herramienta a la dispersión de luz, se mide el grado de correlación de la intensidad de la luz con respecto a ella misma pero a lo largo del tiempo.

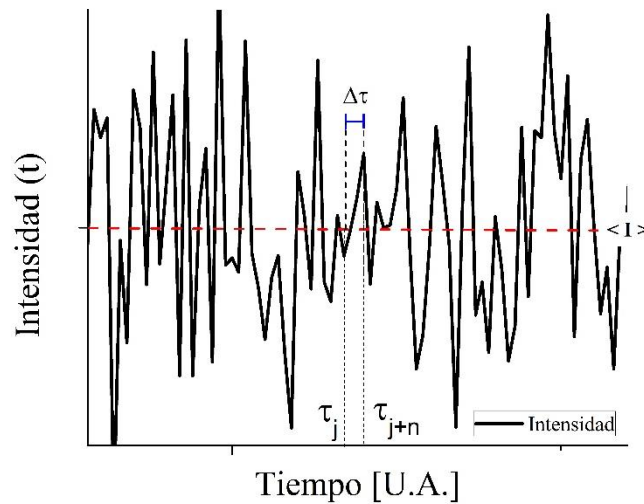


**Figura 2.4.** Esquema básico de un arreglo óptico para la práctica de dispersión dinámica de luz. Las flechas son las lentes, donde la primera enfoca el haz principal (de vector de onda  $\mathbf{k}_i$ ) en la muestra. La luz dispersada (de vector de onda  $\mathbf{k}_f(\theta)$ ) es enfocada en la entrada del detector por la segunda lente. *Imagen adaptada de B. J. Berne, R. Pecora, Dynamic Light Scattering. J. Wiley & Sons Inc. (1976).*



## 2.2 Funciones de correlación en dispersión dinámica de luz

La razón por la cual se presentan fluctuaciones en la intensidad de la luz (figura 2.5) al hacer un experimento de *DLS* a una muestra, es porque las partículas presentes están sujetas al movimiento Browniano, por lo que las propiedades dieléctricas en el volumen de dispersión fluctúan erráticamente debido al movimiento aleatorio de las partículas y, por lo tanto, también el campo eléctrico total dispersado fluctúa. La rapidez con la que cambia el patrón de dispersión, engloba las características de la muestra, es decir, la información que hay en las interacciones entre las partículas dispersantes con el medio en el que se mueven. Estas propiedades que describen tales interacciones se logran conocer mediante el análisis de las fluctuaciones, al aplicar las funciones de correlación temporales. La función de correlación temporal mide el promedio temporal del valor de la intensidad expresada como:  $g_2(q, t)$ .



**Figura 2.5.** Traza de la variación de la intensidad de la luz, con respecto al tiempo, debido a un evento de dispersión.

---

Para que la señal de la dispersión sea tratada con las funciones de correlación temporales, debe de cumplir con algunas propiedades:

- Ser una *propiedad estacionaria*; lo que quiere decir que el promedio temporal de dicha propiedad sea independiente del tiempo de inicio de la medición.
- Que el tiempo de la medición sea muy grande comparado con el tiempo en el que suceden las fluctuaciones, y
- Que la intensidad fluctúa alrededor del valor promedio temporal.

Con estas consideraciones, el promedio temporal de la variable  $I$  se representa como

$$\langle I \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t) dt \quad (2.2)$$

donde  $T$  es el tiempo finito de observación. La propiedad  $I$  fluctúa alrededor de su promedio temporal, como se distingue en la figura 2.5.

En experimentos de *DLS*, se analizan las fluctuaciones temporales de los valores de la intensidad de la luz dispersada con respecto a ella misma a lo largo del tiempo, es decir, que la propiedad  $I(t)$  va a tener un valor distinto que  $I(t + \tau)$ , donde  $\tau$  es un tiempo posterior a  $t$ , por lo que se alude a una *autocorrelación* temporal y que se define

$$\langle I(0)I(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t) I(t + \tau) dt \quad (2.3)$$

Si el tiempo de la medición se secciona en intervalos de tiempo  $\Delta t$  tales que  $t = j\Delta t$ ,  $\tau = n\Delta t$ ,  $T = N\Delta t$  y entonces  $t + \tau = (j + n)\Delta t$ , y considerando que estos intervalos son lo suficientemente cortos para suponer que la propiedad  $I$  varía muy poco dentro del intervalo, es válida la aproximación:

$$\langle I(0)I(\tau) \rangle \cong \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N I_j I_{j+n} \quad (2.4)$$

Para tiempos de  $\tau$  cortos tales que  $\tau \sim t$  se tiene que  $\langle I(0)I(\tau) \rangle \approx \langle I(0)I(0) \rangle = \langle I^2 \rangle$ , lo que implica que la propiedad de la intensidad tiene valor máximo en este rango de tiempos y está correlacionada. En cambio, para tiempos largos de  $\tau$  donde ya ha transcurrido tiempo tal que  $\tau > t$ , entonces la propiedad  $I(t)$  cuando  $I(t + \tau)$  ya no se

parecen y se descorrelacionan, de acuerdo con  $\langle I^2 \rangle \geq \langle I(0)I(\tau) \rangle$ . Con esto el  $\lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle I(0)I(\tau) \rangle = \langle I(0) \rangle \langle I(t) \rangle$  y la correlación decrece en su valor. Entonces, la función de correlación de la intensidad normalizada es:

$$g_2(q, t) = \frac{\langle I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t)^2 \rangle} \quad (2.5)$$

De forma experimental, el correlador computa la función de correlación temporal efectuando las cuentas como se indica en la ecuación (2.4). En el dispositivo se tienen los  $n$  canales donde se almacena la información de los pulsos de corrientes que llegaron a cada intervalo  $\Delta t$  consecutivo en la medición. Luego correlaciona la información de cada canal según lo indica el contador  $n$  de las sumas, es decir, matemáticamente realiza cada sumatoria:  $\sum_{j=1}^N I_j I_{j+1}$ ,  $\sum_{j=1}^N I_j I_{j+2}$ , ...  $\sum_{j=1}^N I_j I_{j+N}$  y lo mismo para cuando  $j$  comienza a aumentar hasta  $N$ . Existen correladores en los que los intervalos de tiempos son logarítmicos, lo que permite que en una medición se adquiera información por duraciones desde nanosegundos hasta horas.

Por otro lado, para unir la información proporcionada por las funciones de correlación de  $g_2$  con la teoría basada en la dispersión del campo eléctrico, primero se relacionan conceptualmente la teoría electromagnética con la teoría física estadística: en el régimen diluido coloidal, la ecuación de difusión puede expresarse en términos del coeficiente de difusión  $D$  y de la función de correlación de la densidad de partículas  $G(r, t)$ :

$$\frac{\partial}{\partial t} G(r, t) = D \nabla^2 G(r, t) \quad (2.6)$$

que al calcularle su transformada de Fourier, se obtiene una ecuación diferencial de la difusión en términos de la función de dispersión intermedia  $F(\mathbf{q}, t)$ , y del cuadrado del vector de dispersión:

$$\frac{\partial}{\partial t} F(\mathbf{q}, t) = -q^2 D F(\mathbf{q}, t) \quad (2.7)$$

y que tiene solución

$$F(\mathbf{q}, t) = e^{-q^2 D t} = e^{-\Gamma t} \quad (2.8)$$

Ahora, la función de correlación temporal del campo eléctrico normalizado es

$$g_1(\mathbf{q}, t) = \frac{\langle E(\mathbf{r}, t) \rangle \langle E^*(\mathbf{r}, t + \tau) \rangle}{\langle E(\mathbf{r}, t)^2 \rangle} \quad (2.9)$$

La función de dispersión intermedia  $F(\mathbf{q}, t)$  se relaciona con la función de correlación temporal del campo eléctrico dispersado (2.9):

$$\langle E(\mathbf{r}, t) \rangle \langle E^*(\mathbf{r}, t + \tau) \rangle \propto F(\mathbf{q}, t) \quad (2.10)$$

Por lo que se encuentra que la función de correlación del campo eléctrico presenta un decaimiento exponencial, de acuerdo con

$$|g_1(\mathbf{q}, t)| = e^{-\Gamma \tau} \quad (2.11)$$

Esta ecuación relaciona a la función de correlación, que tiene un trasfondo enorme de teoría electrodinámica, con las propiedades físicas y medibles de un sistema microscópico descrito por física estadística, mostrando su extensión al análisis e interpretación de las mediciones de *DLS*.

Finalmente queda por unir la información experimental, dada por la función  $g_2(q, t)$ , con la teoría de la función de correlación del campo dispersado  $g_1(\mathbf{q}, t)$ , y así tener todas las relaciones involucradas para extraer las características físicas y propiedades del sistema. Por consiguiente, la ecuación que enlaza a estas funciones de correlación experimental y teórica, respectivamente, es la conocida *relación de Siegert*:

$$g_2(q, t) = B + \beta[|g_1(\mathbf{q}, t)|^2] \quad (2.12)$$

donde  $B$  es la línea base de la función  $g_2(q, t)$  cuando  $t \rightarrow \infty$  que depende del experimento y por lo usual tiene un valor de 1;  $\beta$  es un parámetro que depende de la coherencia también llamado *intercepto*. Muchos correladores en realidad computan la

función de correlación como  $g_2(q, \tau) - B$ , dándole a  $B = 1$ :  $g_2(q, \tau) - 1 \equiv g_{2-1}$ . En ocasiones la muestra es diluida o, por circunstancias experimentales, la línea base  $B$  no alcanza el valor de uno y trae como consecuencia un mal cálculo de  $g_1$  y por consiguiente, del cálculo de las propiedades dinámicas de la muestra [16, 17, 19, 27, 32, 33].

En resumen, a partir de un experimento de *DLS* se adquiere la luz que es dispersada por partículas (de diferentes características dieléctricas que el del medio de suspensión) y se analizan las variaciones temporales de la intensidad, provenientes de la señal luminosa, mediante su función de correlación temporal de la intensidad  $g_2(q, \tau)$ . A su vez la correlación de la intensidad es trasladada, mediante la relación de Siegert, a su descripción equivalente electromagnética: la función de correlación temporal del campo  $g_1(q, \tau)$ . Esta última función se relaciona con la función de dispersión intermedia  $F(\mathbf{q}, t)$ , la cual está implicada en propiedades de un sistema de partículas.

### 2.3 Análisis del correlograma e interpretación física del sistema

Como se vio en la sección anterior, la función de correlación temporal del campo  $g_1$  presenta un decaimiento exponencial de acuerdo a la ecuación (2.11). En el caso de un sistema de partículas monodispersas, y con los apropiados factores experimentales de  $B$  y  $\beta$ , se puede hallar la tasa de decaimiento  $\Gamma$  de la función exponencial. Dado que  $\Gamma = q^2 D$ , se puede calcular el valor del coeficiente de difusión para cuando esta tasa de decaimiento tiene las características de un decaimiento unimodal. A partir de esto, se pueden conocer ya sea el valor de la viscosidad de bulto ( $\eta$ ) del medio acuoso o el radio hidrodinámico de las partículas dispersantes ( $R_H$ ), mediante la relación de Einstein-Stokes para la difusión traslacional

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (2.13. a)$$

$$D = \mu K_B T = \frac{K_B T}{\zeta} \quad (2.13. b)$$

donde  $K_B T$  es la energía térmica (con la constante de Boltzmann  $K_B = 1.3806 JK^{-1}$  y la temperatura  $T$ ). Ambos parámetros  $\eta R_H$  están ligados con la movilidad  $\mu$  de las partículas en el medio, u opuestamente con el coeficiente de arrastre  $\zeta$  de las partículas.

Si el sistema de partículas es casi monodispersa, donde hay un pequeño ancho en la distribución de tamaños, se realizan mediciones de dispersión de luz en multiángulo, es decir, realizar experimentos de *DLS* a diferentes ángulos y preferentemente en intervalos angulares cortos. El propósito es disminuir los efectos de la polidispersidad al determinar las tasas de decaimiento  $\Gamma$  y relacionándolos con su respectivo vector de dispersión  $q^2$  mediante un gráfico  $\Gamma$  vs  $q^2$ . Entonces el valor promedio de  $D$  es la pendiente de una regresión lineal de tal gráfica.

No obstante, la mayoría de los sistemas coloidales no son monodispersos y no muestran un solo modo de decaimiento en la función de correlación de  $g_1$ , por lo que tiene que representarse como una distribución normalizada de tasas de decaimientos  $G(\Gamma)$ :

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma \quad (2.14)$$

El método de Cumulantes se basa en las relaciones conjuntas que hay entre  $g_1(\tau)$  y la *función generadora de momentos de la distribución*:  $M(-\tau, \Gamma) = g_1(\tau)$ ; y de la relación entre el logaritmo de  $g_1(\tau)$  con la *función generadora de cumulantes de la distribución*:  $K(-\tau, \Gamma) \equiv \ln[g_1(\tau)] = \ln[M(-\tau, \Gamma)]$ . Con esto, puede calcularse la expansión del logaritmo de  $g_1(\tau)$  en términos de los cumulantes de la distribución  $\kappa_i$ . El  $m$ -ésimo cumulante de la distribución  $\kappa_m(\Gamma)$  está dado por la  $m$ -ésima derivada de  $K(-\tau, \Gamma)$  con respecto a  $\tau$

$$K_m(\Gamma) = \frac{d^m K(-\tau, \Gamma)}{d(-\tau)^m} \quad (2.15)$$

Con esto, se muestra la expansión de  $\ln[g_1(\tau)]$  de acuerdo con los cumulantes hasta orden 3:

$$\ln[g_1(\tau)] = -\overline{\Gamma}\tau + \frac{\kappa_2}{2!}\tau^2 - \frac{\kappa_3}{3!}\tau^3 + \dots \quad (2.16)$$

Al extraer los coeficientes  $\kappa_1$  al  $\kappa_3$ , se conocen las propiedades del sistema:  $\kappa_1$  describe el promedio de las tasas de decaimiento de la distribución y se puede conocer de aquí el coeficiente de difusión promedio;  $\kappa_2$  es la varianza y;  $\kappa_3$  mide la asimetría de la distribución.

De la misma manera se puede hacer la suposición de que se haga la expansión sobre  $g_{2-1}(\tau)$ , asumiendo que la línea base es exactamente uno. De esta manera

$$\ln[g_2(\tau) - 1] = \ln\frac{\beta}{2} - \overline{\Gamma}\tau + \frac{\kappa_2}{2!}\tau^2 - \frac{\kappa_3}{3!}\tau^3 + \dots \quad (2.17)$$

Sin embargo, estas aproximaciones dependen de que la línea base tenga el valor de uno o muy cercano para que sea confiable. Además, también depende de la cantidad de luz que llegue a los detectores; pues si el sistema que se analiza es muy diluido, la función  $g_{2-1}(\tau)$  tendría una línea base menor y el cómputo de la correlación se vería afectada [17, 32].

Si el correlador usado permite computar solo a  $g_2$ , se utilizan métodos de ajuste no lineales que determinan, a partir del experimento, los valores más fidedignos para  $B$  y  $\beta$  dando así el cálculo más confiable de  $g_1$ , en términos de su expansión [32, 33].

Es importante hacer notar que la teoría repasada, únicamente es válida para cuerpos esféricos y sus aproximaciones sustentadas. Con otra forma geométrica deben de hallarse las correcciones en las ecuaciones de la teoría electrodinámica, porque estas se resuelven considerando la forma de los elementos dispersantes de la radiación electromagnética, y de ahí, desglosar la teoría consecuente también descrita por la geometría.

# 3 Arreglo óptico para DLS vertical

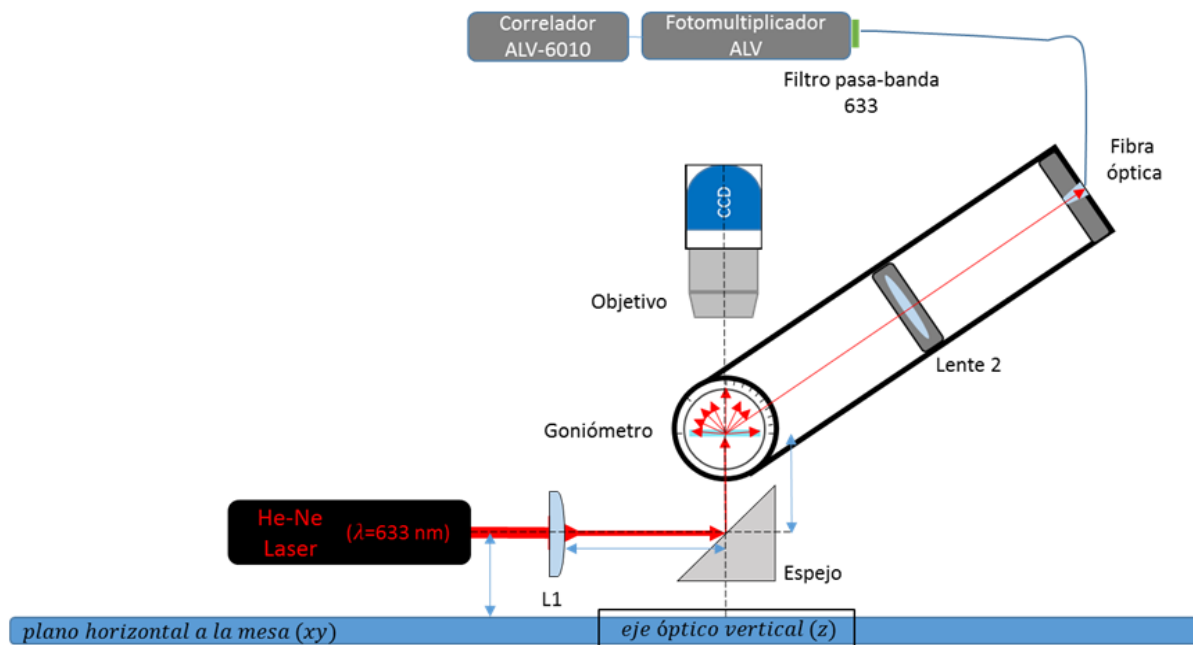
El avance en la complejidad de los estudios en materia condensada blanda demanda el desarrollo de nuevas metodologías experimentales y teóricas para la comprensión de interacciones microscópicas, que aún están fuera del alcance de la interpretación o por la incapacidad de adquirir la información experimental específica, ya sea por el uso de las metodologías convencionales y/o poco flexibles. Las modificaciones en las técnicas de dispersión han llevado al desarrollo de otras cuantas que buscan precisamente adecuarse a los requerimientos experimentales con los que se pueda extraer información del sistema de primera instancia o por medio de la obtención de otra propiedad física [7, 13, 22, 25-28, 35]. Hacia este sentido de innovación va la motivación del presente trabajo, incentivado por la exploración experimental en muestras complejas.

En el Laboratorio de Fluidos Complejos, se diseñó y construyó un arreglo óptico peculiar que permite la práctica conjunta de experimentos de dispersión dinámica de luz y de la visualización de la muestra. Además, para lograr observar la muestra se usa una celda de geometría plana (la cual se describe a detalle en el siguiente capítulo), a diferencia de las tubulares que comúnmente se usan. La idea es que una vez hecho el reconocimiento visual de la muestra, aparte de poder extraer información adicional de



la misma muestra, se pueden realizar mediciones de *DLS* localizadas en una región de interés. A continuación, se describe el arreglo experimental “híbrido” construido para muestras complejas.

Como se observa en la figura 3.1, el arreglo óptico tiene como fuente de luz un láser He-Ne (Melles Griot) el cual emite un haz con longitud de onda ( $\lambda$ ) de  $633 \text{ nm}$  y potencia de salida de  $12.6 \text{ mW}$ . El haz es guiado hacia una primera lente L1 (distancia focal  $200 \text{ mm}$ ) que enfoca la luz exactamente en el interior de la celda de la muestra. Para que la luz llegue por debajo y de manera perpendicular a la celda de la muestra, se cambia el plano de incidencia del haz, es decir, de ir horizontal sobre el plano de la mesa óptica, cambia al plano perpendicular de dicha superficie. Lo anterior se hace en el segmento comprendido entre la lente L1 y la muestra, en donde un espejo levanta verticalmente al haz, perfectamente alineado con la dirección perpendicular a la superficie de la mesa.



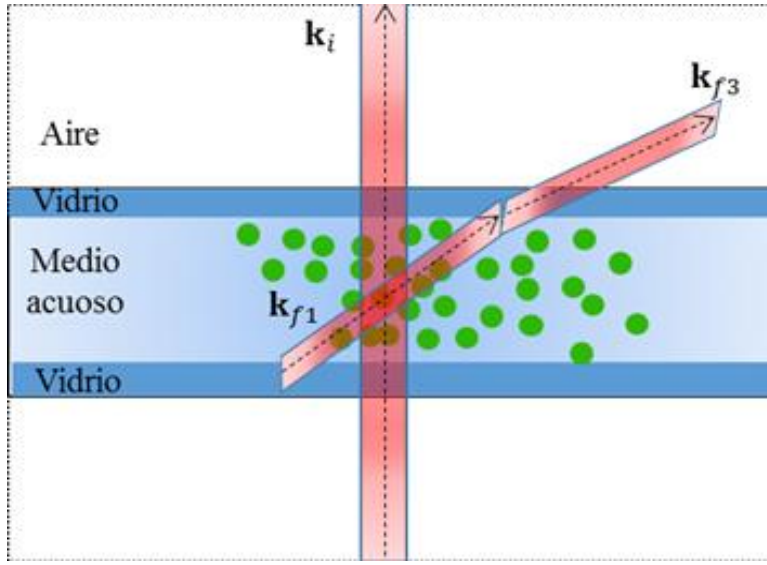
**Figura 3.1.** Arreglo óptico experimental híbrido que conjunta dos técnicas experimentales: *DLS* y videomicroscopía.

Este segmento entre la lente L1 y el centro de la celda de la muestra, se compone por el segmento horizontal *lente-espejo* y el segmento vertical *espejo-muestra*, por lo que se tiene que considerar que estas longitudes sumen conjuntamente los **20 cm** de la distancia focal. Sin embargo, el segmento vertical es la altura resultante de las alturas *mesa-muestra* menos la altura *mesa-haz*. Esto quiere decir que se tiene que considerar primero la altura del haz con respecto a la mesa, para después determinar conjuntamente la configuración de las distancias *lente-espejo* y *espejo-muestra*.

Una vez que ocurre el fenómeno de dispersión de luz en la muestra, como siguiente paso es coleccionar esta luz que es dispersada a un ángulo  $\theta$  determinado. No obstante, se deben considerar los aspectos causados por el diseño plano de la celda y por la configuración del mismo arreglo óptico.

Al fijar la atención en la celda de la muestra, el haz incide sobre la superficie inferior de la celda de manera perpendicular, de modo que el rayo transmitido por la interfaz *aire/vidrio* no se desvía por refracciones sino que continúa recto en su trayectoria, al igual cuando atraviesa por la segunda interfaz *vidrio/medio acuoso*. Una vez que el haz cruza esta interfaz, es enfocado justo adentro de la celda por la lente L1 y es en este punto focal donde se forma el volumen de dispersión para que la luz interactúe con las partículas y dispersen la luz a todas direcciones con ángulo de dispersión  $\theta_1$ . Sin embargo, la geometría plana de la celda provoca que la luz dispersada sea refractada al pasar por las interfaces superiores (*medio acuoso/vidrio* y *vidrio/aire*), cambiando su vector de onda (Figura 3.2). Para este fin, es introducido el término de “ángulo de detección”,  $\theta_3$  (vector de onda  $\mathbf{k}_{f3}$ ), el cual indica el ángulo al que se ubica el detector para captar la luz de dispersión de  $\theta_1$  (vector de dispersión  $\mathbf{k}_{f1}$ ).

A continuación, se muestra el análisis de las refracciones de la luz dispersada, basado en la ley de Snell, para determinar el ángulo de dispersión de la luz en función del ángulo de detección, el cual es el ángulo medido por el goniómetro y el que se tiene el control experimental, del que se hablará más adelante.



**Figura 3.2.** Desviación de la luz dispersada, de  $\mathbf{k}_{f1}(\theta_1)$  a  $\mathbf{k}_{f3}(\theta_3)$ , en las interfaces. Puede notarse que la región de color rojo mas intenso, es la noción de lo que se considera *volumen de dispersión*, determinado por el ángulo de dispersión.

De la ley de Snell, se tiene que  $n_{MA} \sin(\theta_1) = n_V \sin(\theta_2)$ , donde  $n_{MA}$  es el índice de refracción del medio acuoso,  $\theta_1$  es el ángulo de dispersión de la luz,  $n_V$  es el índice de refracción del vidrio y  $\theta_2$  es el ángulo de refracción que toma la luz dispersada al pasar por el vidrio de la celda. Aquí obtenemos que el ángulo inicial es:  $\theta_1 = \sin^{-1}[(n_V/n_{MA}) \sin(\theta_2)]$ . Continuando el análisis para la siguiente interfaz *vidrio/aire*, similarmente se tiene que  $n_V \sin(\theta_2) = n_A \sin(\theta_3)$ , donde  $n_A$  es el índice de refracción del aire y  $\theta_3$  es el ángulo final de refracción, con el que se alinea el detector. De aquí  $\sin \theta_2 = (n_A/n_V) \sin(\theta_3)$ , obteniendo la ecuación que nos indica el ángulo de dispersión que se mide en función del ángulo al cual se detecta la luz dispersada:

$$\theta_1 = \sin^{-1} \left\{ \left( \frac{n_A}{n_{MA}} \right) \sin \theta_3 \right\} \quad (3.1)$$

Gráficamente, se muestra el dominio de la ecuación 3.1 en donde se evidencia el ángulo crítico de dispersión, el cual es  $\theta_c = \sin^{-1}(n_A/n_{MA})$ . Es de apreciarse que no hay algún ángulo de detección con el que podamos registrar la luz dispersada de ángulos  $\theta_1 > 49^\circ$ , al menos para las soluciones acuosas usadas. Esto no quiere decir que no se

dispersa luz hacia ángulos mayores, sino que esa luz experimenta el fenómeno de reflexión total interna, originado por la geometría plana de la celda. Experimentalmente es comprobable tal suceso (para ángulos superiores al crítico) ya que no se percibe señal proveniente de la luz que pueda ser correlacionada, sino que se mide el ruido de fondo de los equipos electrónicos sin correlación alguna. Además, por el modo de construcción del arreglo experimental, solo fue posible ubicar el detector en un rango angular corto, y convenientemente se pudo establecer en ángulos de  $60^\circ$  y  $70^\circ$ , con los que se registra la luz dispersada a los ángulos de  $40^\circ$  y  $45^\circ$ , aproximadamente.

A su vez, la ecuación (3.1) mantiene una variable experimental que es el índice de refracción, que está dado por las propiedades del medio acuoso de la suspensión coloidal. Los medios acuosos empleados en el desarrollo de este trabajo fueron: agua (Milli-Q), soluciones acuosas de glucosa al 0.2 M y de sacarosa al 0.2 M. Sus índices de refracción, a una temperatura de  $20^\circ$  C, son 1.333, 1.338 y 1.342 respectivamente. Con esto, se modifican ligeramente los valores del ángulo de dispersión y por consecuencia el ángulo de detección, ya que ahora  $q = q(n, \theta)$ . En la tabla siguiente, se muestran los ángulos de dispersión para cuando el detector está en un ángulo dado.

Ángulo de detección	$\theta_3 = 60^\circ$		$\theta_3 = 70^\circ$	
	$\theta_1$	$ \mathbf{q}(\theta_1) $ [nm <sup>-1</sup> ]	$\theta_1$	$ \mathbf{q}(\theta_1) $ [nm <sup>-1</sup> ]
Agua	40.62	0.00918	44.95	0.01011
Solución de glucosa 0.2 M	40.33	0.00916	44.61	0.01057
Solución de sacarosa 0.2 M	40.19	0.00915	44.52	0.01009

**Tabla 3.1.** Relación entre los ángulos de dispersión con los ángulos de detección, dados por los índices de refracción de los medios acuosos. También se muestra la magnitud de los vectores de dispersión correspondientes.

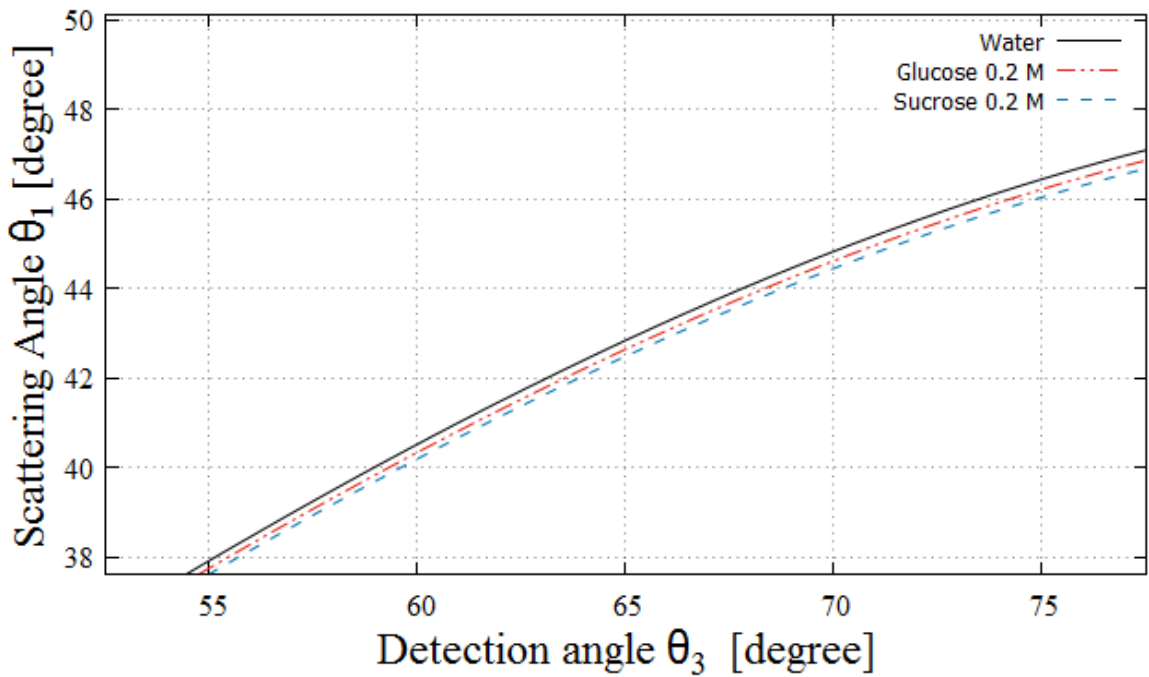
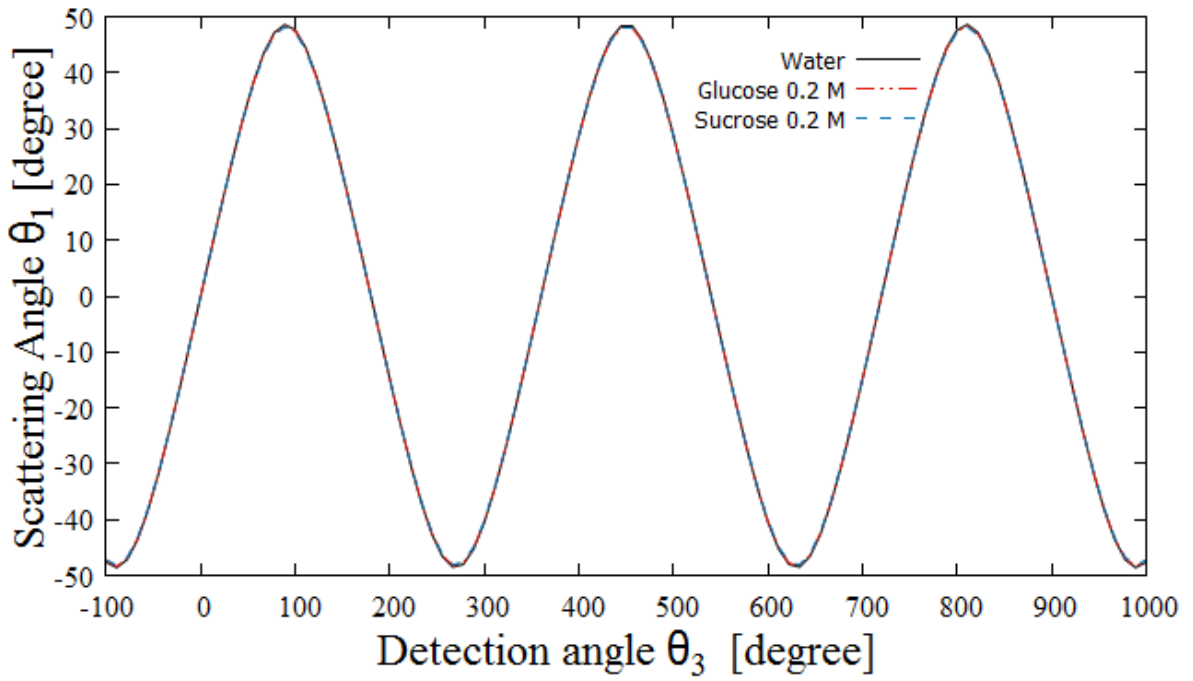
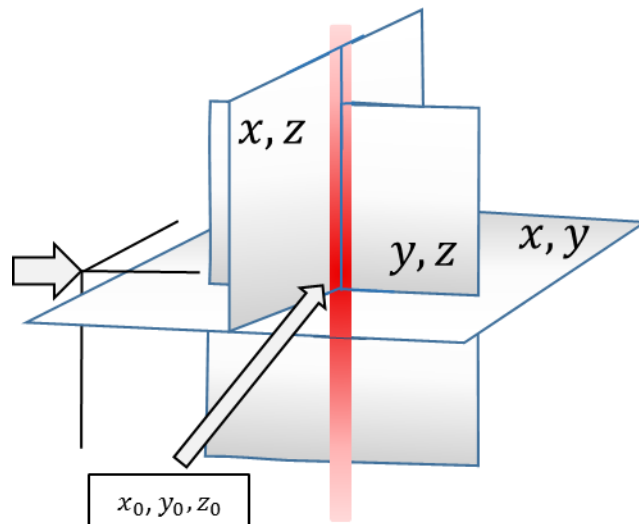


Figura 3.3. Dominio de la función senoidal que relaciona el ángulo de detección con el ángulo de dispersión. Además se deduce el fenómeno de reflexión total interna, por lo que se llega a un ángulo máximo de dispersión tal que pueda ser detectado.

El siguiente segmento del arreglo óptico es el *sistema de óptica de recolección* y tiene por objeto el coleccionar la luz que es dispersada a un  $\theta_3$ . Este conjunto está compuesto por una lente *L2* biconvexa (distancia focal  $15\text{ cm}$ ) y una fibra óptica (ThorLabs, multimodal  $488$  a  $633\text{ nm}$ ) que están unidos al goniómetro mediante un riel óptico. El goniómetro permite rotar la instrumentación óptica mediante su unión conjunta con un riel óptico. Para que el goniómetro y el sistema de recolección funcionen adecuadamente a la par y así capten la luz de interés, deben de estar alineados con respecto a los planos imaginarios que conforman el espacio (figura 3.4). Para esto, la altura del centro de giro del goniómetro y la de la celda deben coincidir en  $z_0$ ; además el punto de giro debe estar alineado con los planos de incidencia  $xz$  y  $yz$ , es decir, con la intersección de los planos. A su vez, la lente *L2* y la fibra óptica deben que están sujetos en el riel, deben de estar alineados con el eje óptico que recorre el haz.



**Figura 3.4.** La intersección perpendicular de los planos cartesianos  $(x_0, y_0, z_0)$  indica el punto de la muestra donde ocurre la dispersión de luz por el haz (rojo). La flecha de la izquierda alude a la línea normal del centro de giro del goniómetro. Su punto debe de orientarse con con el plano  $xy$  cuando  $z=0$  y con el plano  $yz$  cuando  $x=0$ . La óptica del riel (estando a  $0^\circ$  en el goniómetro) se orienta con el eje óptico de la luz, esto es, con el plano  $xz$  cuando  $y=0$  y con el plano  $yz$  cuando  $x=0$ .

Las ubicaciones de la lente  $L2$  y de la fibra óptica en el riel, están en una configuración particular, que de acuerdo a las distancias de separación entre ellos, se le conoce como " $2f$ ", aludiendo a una distancia de dos distancias focales. La lente  $L2$  se encuentra separada del volumen de dispersión por una longitud igual a dos veces su distancia focal. Igualmente, la fibra óptica está a una distancia igual a dos distancias focales de la lente  $L2$ .

Una vez captada la luz, es conducida por la fibra óptica hasta la entrada del detector. Ahí, se cuenta con un filtro de ancho de banda  $633\text{ nm}$  que discrimina otras longitudes de onda diferentes para solo contar los fotones con la misma longitud de onda. El detector con el que se cuenta es un fotomultiplicador ALV-SD/SIPD *Single Photon Detector* (Langen, Alemania), el cual, cuenta con un divisor de haz tipo  $50\% : 50\%$  para dividir la luz de dispersión en dos señales con la misma intensidad. Cada señal luminosa incide sobre un tubo fotocatódico totalmente independiente con el otro para que, posteriormente, se pueda realizar una correlación tipo "*pseudo*" *cross*, la que se explica más adelante. Por ahora, los fotones continuamente llegan a los detectores (de área  $A$ ) cada unidad de tiempo y son amplificados en forma de fotoelectrones por los dos fotocátodos. La señal de salida es en forma de pulsos corriente que, como se infiere, estas corrientes son proporcionales al flujo de los fotones incidentes y las relaciona para cuantificar el promedio de fotones que llegan al detector por unidad de tiempo.

Luego, las señales de salida van a un correlador ALV-5000 *Multiple Tau Digital Realtime* (Langen, Alemania), el cual cuenta con una interfaz computacional para su control. Es en este punto en donde se computa la función de correlación temporal de la intensidad de luz dispersada como:  $g_{2-1}$ . Para efectos estadísticos, las mediciones experimentales de las dispersiones de luz fueron realizadas en el modo temporal de correlación "*pseudo*" *cross*, la cual es una manera de correlacionar las dos señales entre ellas para eliminar efectos negativos en el cómputo de la correlación debido a pulsos tardíos y tiempos muertos entre las mediciones. La construcción de la función de correlación es mostrada en tiempo real en la computadora. Asimismo, el software del correlador permite realizar el análisis de la función de correlación para determinar el radio hidrodinámico de las partículas en la muestra, por medio de la implementación computacional del paquete de Cumulantes, descrito en el capítulo anterior.

De manera adjunta al arreglo experimental, se cuenta con un sistema óptico independiente que permite visualizar de la muestra. Tal sistema está compuesto por un objetivo de microscopio (10X/50X Olympus) que hace imagen sobre el sensor CCD de una cámara digital (Watek, 30FPS, B/W). A su vez, la cámara está conectada a un grabador DVD y monitor para observar directamente la muestra. Una cualidad con la que cuenta este pequeño sistema de videomicroscopía es que utiliza la misma luz del haz como fuente de iluminación, por lo que garantiza que lo que se está visualizando es la región de la muestra en la que se realiza el experimento de dispersión de luz.

### 3.1 Comparación del arreglo óptico

Para comenzar esta sección, primero se describe brevemente un arreglo óptico clásico que realiza experimentos de dispersión dinámica de luz para luego hacer la apropiada comparación con el arreglo óptico propuesto en la sección anterior. El sistema óptico que se toma como ejemplo se encuentra en el laboratorio de Fluidos Complejos (IF-UASLP). En primer lugar, el equipo para dispersión de luz cuenta con un láser Lixel 95 que emite un haz de  $\lambda = 488 \text{ nm}$ , que es guiado por espejos hasta una lente, la cual, enfoca la luz en el centro de una celda tubular centrada en el goniómetro (BrookHaven BI-200SM). El goniómetro tiene incorporado un contenedor de cuarzo relleno con decalina (decahidronaftaleno, Sigma-Aldrich) que, al tener un índice de refracción similar al cuarzo y vidrio de la celda, ofrece la ventaja de que toda el área transversal del haz sea efectiva para incidir sobre la muestra, ya que la superficie curva de la celda se vuelve “invisible” por el igualamiento de índices de refracción y así, los bordes del haz no son refractados y las reflexiones son disminuidas. Además, el goniómetro tiene un sistema interno para el flujo de agua que está conectado a un recirculador independiente (Science/Electronics, Miamisburg, Ohio, EE.UU.) para controlar la temperatura del sistema.

La luz dispersada es recuperada por el sistema óptico de recolección que consta de una lente biconvexa para colecta la luz dispersada enfocarla a la fibra óptica; este sistema está en una configuración del tipo  $2f$ , lo que significa que la lente está a una distancia de separación igual a dos distancias focales del centro de la muestra y también



de la fibra óptica. La luz es guiada por la fibra hasta la entrada del fotomultiplicador ALV-SD/SIPD *Single Photon Detector*. La salida es del tipo pulsos de corriente que van al correlador ALV-5000 *Multiple Tau Digital Realtime* para computar la función de correlación temporal  $g_{2-1}$ , de la misma manera como se explicó en la sección anterior.

Comúnmente, el goniómetro de los arreglos ópticos para dispersión, realiza el movimiento angular de manera paralela con respecto a la superficie de la mesa óptica, a diferencia del sistema óptico propuesto, en el que el movimiento lo hace perpendicular. Para las configuraciones de arreglos experimentales que barren los ángulos de manera paralela a la mesa óptica aquí se denominan como *arreglos en horizontal*. En cambio, el arreglo experimental que se ha introducido en este trabajo, se alude como *arreglo en vertical*. En seguida se exhiben las ventajas que ofrece el arreglo en vertical sobre su contraparte, al igual que sus pormenores.

Como la emisión de la dispersión de luz es en forma radial, los arreglos en horizontal toman como provecho esta característica gracias a la geometría cilíndrica de su celda y del contenedor de cuarzo. Así, los haces dispersados inciden normalmente sobre las superficies de la celda y del contenedor, por lo que no son refractados en las interfaces. Con esto, el ángulo de dispersión es el mismo ángulo de detección y se deja de lado la dependencia del índice de refracción en el ángulo de detección.

En el arreglo en vertical es de destacarse la posibilidad de observar una muestra y seleccionar una región de interés para realizar los experimentos de dispersión de luz. Sin embargo, al usar como fuente de iluminación la luz monocromática del láser, es de esperarse que se observen fenómenos de difracción en algunas muestras, creando así imágenes toscas y difíciles de interpretar. Al ser un aparato armado, se puede contrarrestar en ocasiones esta indeseada característica, al colocar una fuente de luz blanca sobre el camino óptico antes de la muestra, y así, visualizar más nítidamente la muestra. Solo quedaría en revisar después, al remover la lámpara, si la cámara CCD sigue siendo iluminada por la fuente monocromática del láser para asegurar que la zona de visualización sigue siendo la zona efectiva de la dispersión de luz. Hay que resaltar que lo anterior es posible dada la geometría plana de la celda pues, si se usara una con superficie curva el efecto de aberración haría hacer complicado el obtener una imagen clara del interior de la muestra; además el objetivo del microscopio puede verse

comprometido en el rango distancia al que le es posible recoger observar la muestra; y todavía más inalcanzable si se tiene un contenedor de cuarzo u otro dispositivo de baño térmico.

Un punto clave en cuanto a la dispersión de la luz en la celda plana es que es muy susceptible a las inclinaciones de las superficies que pudieran tener los vidrios que conforman la celda, ya sea por fabricación o por el ensamblado. Las inclinaciones influyen directamente en una inadecuada adquisición de la luz dispersada por un ángulo de detección erróneo. Una manera de corroborar que las superficies de la celda están completamente horizontales es en verificar que el haz del láser que se propaga siga apuntando sobre una referencia que indique la verticalidad del camino óptico del haz.

La libertad con la que se pueden manipular las celdas de la muestra ofrece las posibilidades de explorar más del sistema, y es de gran importancia cuando la muestra está hecha de diferentes especies o es inhomogénea. Para el caso del arreglo en vertical, el hecho de desplazarse sobre el plano horizontal da la ventaja de realizar los ensayos de dispersión de luz a múltiples áreas, incluso a diferentes profundidades de la muestra al ajustar levemente su altura con el punto de enfoque y giro del goniómetro. En cambio, en un arreglo en horizontal, la posición de la celda está fija y así restringe a este tipo de arreglos a registrar solo la dispersión de luz proveniente del bulto de la muestra.

Todo sistema coloidal tiende a sedimentarse; unos lo hacen rápido y otros llegan a durar hasta días. A veces, esta influencia de la gravedad puede ser útil y otras en las que es un problema, especialmente cuando se trata de cuerpos coloidales grandes. En una celda plana que se usa en un arreglo óptico en vertical, llega el momento en que ya no es un problema, incluso puede ser vista como ventaja, pues una vez que las partículas llegan a sedimentar, el movimiento por la gravedad deja de influenciar y se puede registrar la dispersión sin el efecto de la gravedad, ya que el haz incide por el fondo donde se depositan las partículas. En cambio, al usar el tubo para el arreglo en horizontal, las partículas sedimentan y ya no se puede obtener dispersión de la muestra porque se sedimentó y el haz incide por otro plano que no es el fondo, por lo que en cierto momento, la luz “pierde de vista” a los sistemas coloidales.

### 3.2 Similitudes con arreglos ópticos de técnicas diferentes de dispersión de luz

- *DDM (Differential Dynamic Microscopy)*. Es una técnica de dispersión de luz en la que emplea videomicroscopía para adquirir los patrones moteados de dispersión en secuencias de imágenes. Una imagen es resultado de la superposición del haz o fuente principal de iluminación junto con la luz dispersada por las partículas de la muestra. El arreglo óptico en vertical que es propuesto en este trabajo, al contar con la óptica elemental para videomicroscopía, y además con la implementación de filtros adecuados, podría ser capaz de adquirir videos de la misma manera que un arreglo convencional para la técnica de dispersión de *DDM*. Por otra parte, el análisis de las imágenes se realiza por algoritmos en donde se aplican transformadas de Fourier a tales imágenes. Se cuantifica la variación temporal de la intensidad por pixel, generando más estadística para el cómputo de la llamada *función de estructura de la imagen*. De aquí se puede computar al mismo tiempo la dispersión estática y dinámica de luz. Esta técnica pertenece a los métodos de dispersión del régimen del campo cercano o región de Fresnel <sup>[34]</sup>.
- *TIRM (Total Internal Reflection Microscopy)*. En esta técnica de dispersión de luz se usa como fuente de luz a un campo eléctrico débil que es propagado a través de la interfaz donde ocurre el fenómeno de reflexión total interna. Para esto, el haz del láser es guiado y se hace incidir sobre una interfaz *vidrio/medio acuoso*, de manera que el ángulo de incidencia sea mayor al ángulo crítico de reflexión interna. La luz propagada a través de la interfaz es suficiente para que las partículas cercanas a esta interfaz sean susceptibles al campo eléctrico y en consecuencia dispersen la luz. Con la ayuda de videomicroscopía básica es posible observar adecuadamente la región muestra que está en la vecindad de la interfaz, además de que está añadido un sistema de detección para coleccionar la luz dispersada. Esta técnica puede ser adaptada al arreglo óptico en vertical, al manipular angularmente el espejo que levanta verticalmente al haz y guiar la luz del láser paralelamente sobre el plano  $xz$ . Mediante una calibración del

ángulo que es desviado es posible encontrar la posición correcta del espejo para que ocurra la reflexión total interna en la celda. El análisis de la información obtenida se hace primero al transformar la variación de la intensidad a una traza de alturas. Luego, se realiza el tratamiento estadístico de las alturas basándose en la distribución de Boltzmann, que relaciona la probabilidad de encontrar a una partícula a una cierta altura de la interfaz con el potencial de esa superficie.

La finalidad es mostrar que el arreglo óptico propuesto puede adaptarse sencillamente para realizar otras técnicas de dispersión de luz, con la variante distintiva y única de que lograría explorar estas técnicas anteriores probando con más ángulos de dispersión.

# 4 Aplicación experimental

El desarrollo de este trabajo tiene por meta el proponer una alternativa experimental para sistemas complejos en los que se requiere conocer a detalle al sistema. Particularmente, aquí se combinan las técnicas de dispersión dinámica de luz con la de microscopía, Aparte de mostrar la aplicabilidad del arreglo experimental en sistemas de partículas coloidales, se exponen las primeras exploraciones en sistemas confinados empleando este arreglo, específicamente de suspensiones coloidales confinados en vesículas. Mostrando el panorama de que las aplicaciones en el uso del arreglo óptico son en sí interesantes para el estudio de sistemas confinados.

Para revisar el funcionamiento del arreglo óptico vertical, se midieron las funciones de correlación de suspensiones coloidales de poliestireno (PS) de tamaños de  $300\text{ nm}$  y  $500\text{ nm}$ , en los medios de: agua milli-Q, glucosa  $0.2\text{ M}$  y sacarosa  $0.2\text{ M}$ . La serie de experimentos realizados fueron en un total de 10 ciclos de 20 mediciones con duración de 15 segundos cada una. La función de correlación de la intensidad final va a ser el promedio de todas las mediciones individuales. Debido a la restricción angular determinada por la geometría de la celda y por el arreglo óptico en sí, los únicos ángulos accesibles fueron los ángulos de dispersión de  $40^\circ$  y  $45^\circ$ , aproximadamente.

A continuación, se detalla la composición de las muestras, coloidales y de vesículas, al igual que el proceso de fabricación de la celda plana para la muestra. Luego se muestran los resultados de *DLS* obtenidos por el arreglo vertical correspondientes a las suspensiones coloidales, al igual que las primeras observaciones puntuales de la técnica sobre vesículas

## 4.1 Muestras

Se emplearon partículas de poliestireno (PS) de dos tamaños diferentes:  $300\text{ nm}$  y  $500\text{ nm}$  en suspensiones de concentración de  $1 \times 10^{-4} \% w_{\text{solidos}}/\text{volumen}$ . En las secciones siguientes se detallan las preparaciones de las suspensiones coloidales. Por otro lado, como la técnica de dispersión de luz está idealmente pensada para analizar muestras con partículas microscópicas, esto es de tamaños entre decenas de nanómetros hasta algunos pocos micrómetros, no es de menospreciar la facilidad con la que se puede contaminar alguna las muestras por otro tipo de partículas ajenas. Es por ello que las preparaciones de las soluciones acuosas fueron filtradas (tamaño de poro  $0.1\ \mu\text{m}$ , Whatmann) y las muestras fueron realizadas dentro de una cámara cerrada herméticamente con manipulación a través de guantes.

### 4.1.1 Soluciones acuosas y suspensiones coloidales

Para preparar de forma muy limpia las soluciones y suspensiones, se usó agua milli-Q (resistividad:  $13.4\ \text{M}\Omega$ ) filtrada con filtros Whatman de Nylon  $0.1\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Se elaboraron las soluciones acuosas independientemente al agregar el peso determinado de sacarosa (*D(+)* sacarosa, Caledon Laboratories, peso molecular:  $342.30\ \text{g/mol}$ ) y de glucosa (dextrosa anhidra, Fermont, peso molecular:  $180.16\ \text{g/mol}$ ) para una molaridad de  $0.2$  cada una. Posteriormente, las soluciones fueron filtradas por filtros de Nylon  $0.1\ \mu\text{m}$ . Finalmente, para evitar el crecimiento de microorganismos, se les añadió un volumen de solución de ázida de sodio ( $\text{NaN}_3$ , Sigma

de México, peso molecular:  $65.02 \text{ g/mol}$ ), previamente filtrada, para llegar a una concentración final de  $3 \text{ mM}$  <sup>[31]</sup>.

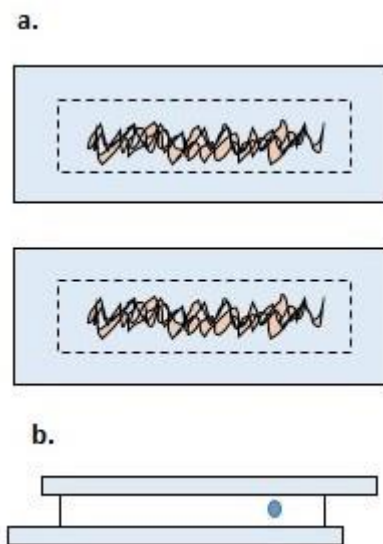
Estas soluciones acuosas fueron analizadas por un refractómetro (Anton Paar) dando como resultado los índices de refracción, a  $20^\circ \text{ C}$ , del agua ( $n_W = 1.333$ ) y de las soluciones de glucosa ( $n_G = 1.338$ ) y sacarosa ( $n_S = 1.342$ ). Además se obtuvieron los valores de viscosidad  $\eta$ , a  $20^\circ \text{ C}$ , por la técnica de reología (Anton Paar) de las mismas: agua milli-Q,  $\eta_W = 1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ; solución acuosa de glucosa  $0.2 \text{ M}$ ,  $\eta_G = 1.13 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ; y solución acuosa de sucrosa  $0.2 \text{ M}$ ,  $\eta_S = 1.19 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ . Las soluciones se mantuvieron en refrigeración a  $4^\circ \text{ C}$  hasta antes de su uso.

Por otro lado, las suspensiones coloidales se prepararon de la siguiente manera. Primero, las partículas de PS  $0.3$  y  $0.5 \mu\text{m}$  de diámetro, (Thermo Scientific) se limpiaron mediante un proceso de diálisis para retirar el contenido de surfactante que tienen añadido para su estabilización. El procedimiento constó de lavados consecutivos con agua milli-Q (resistividad:  $13.4 \text{ M}\Omega$ , tamaño de poro del filtro  $0.2 \mu\text{m}$ ) de 5 horas de duración, en máxima agitación magnética, durante tres días. Una vez terminado el proceso de diálisis, se prepararon las suspensiones coloidales a concentraciones de  $0.1, 0.01, 0.001$  y  $0.0001 \%$ , para cada uno de los medios acuosos filtrados.

#### 4.1.2 Vesículas

**Elaboración de vesículas por electroformación:** sobre dos portaobjetos limpios que están recubiertos por una película conductiva (ITO, *Indium Tin Oxide*), se esparcen  $8 \mu\text{l}$  de fosfolípidos Egg PC (L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina, concentración:  $5 \text{ mg/ml}$ , Avanti Polar Lipids) dentro de un área delimitada. Para evaporar completamente el cloroformo con el que están dispersados los fosfolípidos, se colocan los vidrios dentro de una cámara de vacío por al menos una hora. Al terminar, se prepara la cámara de electroformación (figura 4.1): los vidrios con sus superficies conductoras se ponen cara a cara, separados mediante un espaciador rectangular de teflón (grosor  $2 \text{ mm}$ ) y sellados con grasa de silicón de alto vacío. El espaciador cuenta con dos orificios diminutos por donde, en uno, se introduce una aguja de jeringa para rellenar el espacio con una solución de sacarosa  $0.2 \text{ M}$ , mientras que por el otro orificio es expulsado el

aire del interior. Luego, se lleva la cámara a un horno ( $60^{\circ} \pm 3^{\circ} C$ ) en el que permanecen hasta completar el proceso de electroformación. Finalmente, se anclan los caimanes uno a cada extremo de uno de los vidrios y, de esta manera, los cables se conectan con un generador de funciones.



**Figura 4.1.** Caricatura del ensamblaje de la celda de electroformación. A) Manera de esparcir el fosfolípido sobre la superficie de los vidrios ITO. B) Ensamblaje de la celda, donde se aprecia el orificio del espaciador para llenar la celda. La superficie de los vidrios que quedaron con la película de fosfolípidos quedaron cara a cara dentro de la celda.

**Protocolo de electroformación:** con el uso de un generador de funciones, se aplica un campo eléctrico variable de forma senoidal. El protocolo se resume en la siguiente tabla, donde se muestran los parámetros a controlar:

Voltaje ( $V_{pp}$ )	Frecuencia ( $Hz$ )	Duración ( $min$ )
1.0	10	15
1.5	10	15
2.0	10	15
2.5	10	15
2.0	3	15

**Tabla 4.1.** Protocolo de electroformación. Los pasos seguidos están por orden descendente.



Para la preparación de vesículas con partículas coloidales encapsuladas, se usó el mismo procedimiento. Lo único que cambió fue la solución acuosa utilizada por una suspensión coloidal de partículas dispersas en solución de sacarosa  $0.2 M$ . De esta forma, se obtiene una mezcla de vesículas con partículas en sus interiores además de partículas coloidales que quedaron por fuera de las vesículas.

La técnica de electroformación no permite el control sobre el ensamble de las moléculas de fosfolípidos, por lo que al final, se pueden observar no solo vesículas sino también vesículas con multicapas de membrana, vesículas pequeñas y grandes de tamaños de  $50$  a  $150 nm$  de diámetro (*SUVs* y *LUVs* por sus siglas en inglés). Además, el encapsulamiento de las partículas en vesículas tampoco es controlable por lo que hay una amplia distribución en la cantidad de partículas que quedaron dentro y fuera de las vesículas.

### 4.1.3 Celdas planas

La elaboración de la celda plana (figura 4.2) comienza desde la limpieza de los vidrios de cubreobjetos y portaobjetos. Se colocan los vidrios sobre un rack de teflón que puede ser introducido en un vaso de precipitados. Una ronda de lavado consiste en, primero, un lavado con isopropanol en agitación rápida y a temperatura alta (mayor a  $80^\circ C$ ). Después, se enjuaga un par de veces con agua milli-Q para remover rastro del alcohol. Luego se repite la forma de lavado pero usando ahora agua milli-Q. Una vez terminado, se enjuagan con agua limpia para volver a hacer el lavado con isopropanol. En general, se repite la ronda de lavado dos veces más (tres en total). El tiempo requerido por lavado con cada solvente es de diez minutos. Cuando termina el último lavado, que se hace con agua, se escurre el excedente de agua y se alistan para el siguiente tratamiento.

Luego, los vidrios son tratados con un lavado agresivo de ácido que ayuda más a la limpieza y, funciona como la primera parte de la funcionalización de ellos. La mezcla de ácidos empleada para este fin se lo conoce comúnmente como solución “piraña” y está compuesta por siete partes de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ , Caledon Labs.) mas tres partes de peróxido de hidrógeno al 30% ( $H_2O_2$ , Fermont Labs.) a temperatura

ambiente. En seguida, se introducen los vidrios al interior del vaso de precipitados en donde se preparó la solución ácida. Se dejan inmersos durante diez minutos. En caso de reutilizar la solución piraña, se tiene que reactivar la reacción química al adicionar peróxido de hidrógeno además de calentar la mezcla ( $\sim 65^\circ \text{C}$ ). Por cuestión de seguridad se indica que, durante el proceso del lavado con ácido, deben de realizarse dentro de una campana de extracción porque se expiden vapores nocivos durante la reacción química.

Luego, se retiran los vidrios y se enjuagan dentro de su vaso de PP limpio con abundante agua filtrada. Se repite el enjuague seis veces. Por tratarse del manejo de desechos de ácidos, se advierte explícitamente que se tienen que depositar tales desechos en un contenedor adecuado y debidamente etiquetado, en donde se indique el contenido y su peligrosidad. De manera similar, la solución piraña debe almacenarse en un recipiente apropiado y debidamente marcado.

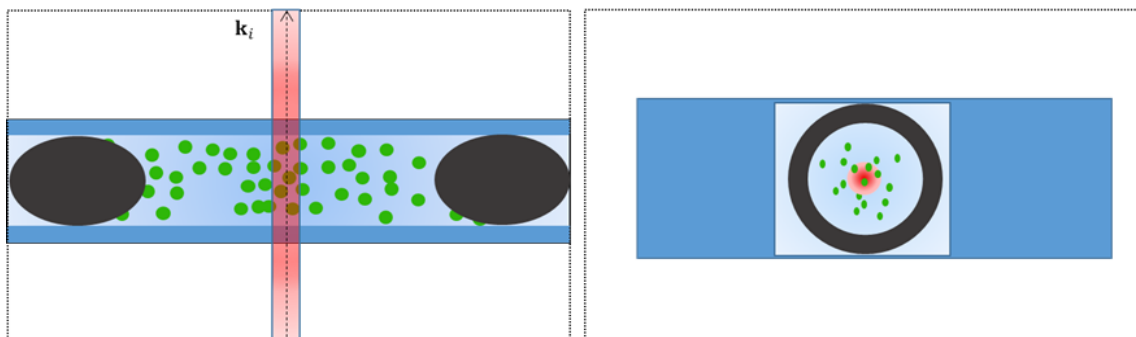
Inmediatamente del último enjuague, se escurre el agua de los vidrios y éstos son llevados a secar al horno ( $110^\circ \text{C}$ ) por al menos tres horas para asegurar su secado. Una vez secos, se llevan al Plasma Cleaner (PDC-001, Harrick Plasma) durante dos minutos para dar el último tratamiento a las superficies de los vidrios antes de que sean funcionalizadas. En esta parte, los vidrios reciben el aire limpio ionizado que remueve las últimas trazas de contaminantes, además de dejar a las superficies con propiedad hidrofílica.

Ahora, continúa el proceso de funcionalización de los vidrios. Dentro de una cámara de vacío y apoyados por un rack sin fondo, se colocan los vidrios con una cara enfrentando a la superficie de la base de la cámara de vacío; a su vez el rack está sobre una superficie de vidrio limpia; encima de esta superficie y por debajo de los vidrios, se esparcen  $20 \mu\text{l}$  de (3-aminopropil) trietoxisilano (Sigma-Aldrich). El tiempo de vacío es de dos horas para permitir que una buena parte de las moléculas sean vaporizadas y se adsorban a las superficies expuestas de los vidrios. Este método de silanización se le conoce como vaporización. Una vez terminado el tiempo, los vidrios son colocados dentro del horno ( $65^\circ \text{C}$ ) durante una noche para permitir una apropiada fijación de las moléculas con las superficies de los vidrios.

Para terminar la funcionalización, se colocan  $100 \mu l$  de una solución de ácido hialurónico sobre la cara del vidrio funcionalizada. Con la ayuda de una película de parafilm, se esparce este volumen sobre un área determinada de la superficie del vidrio. Después se incuban los vidrios en el horno a una temperatura de  $45^\circ C$  por dos horas, para que se haga más efectivo la unión de las moléculas del ácido hialurónico con las moléculas del trietoxisilano. Al finalizar la incubación, adentro de una cámara de guantes, se enjuagan las superficies funcionalizadas de los vidrios usando agua milli-Q. Para concluir, se secan mediante el flujo de nitrógeno.

Finalmente se construyen las celdas planas que almacenarán a las muestras. Dentro de un espacio libre de polvo y corrientes de aire, como lo es una cámara de guantes, trabajamos nuestros vidrios para elaborar las celdas. La forma de armar la celda es primero con la manipulación del espaciador (anillo de goma previamente limpiado) y el portaobjetos, son pegados entre sí con de grasa de silicón. Antes de colocar el cubreobjetos como una tapa, se introduce un volumen de la muestra dentro del contenedor formado. Igualmente, el portaobjetos se une con el espaciador mediante la pegadura con grasa de silicón. Entonces la celda formada tiene las caras funcionalizadas de los vidrios colocadas una frente a la otra, separadas por el espaciador de  $2.5 mm$  de grosor.

También puede usarse el pegamento epóxico bicomponente de Epo Tek en lugar de la grasa de silicón. El curado de la resina se lleva unas 24 h en asegurarse de que está seca para poder introducir la muestra y otras 24 h para esperar el curado de la selladura con la tapa. Mediante esta pegadura, la celda es muy estable en mantener a la muestra sin evaporaciones por lo que dura mucho tiempo.



**Figura 4.2.** Celda plana ensamblada (no a escala). Se muestran los vidrios que conforman a la celda en color azul marino, color negro es el espaciador de goma, verde son las partículas coloidales y en degradado rojo el haz del láser. Izquierda: vista en corte transversal. Derecha: celda vista desde encima.

---

#### 4.1.4 Celdas tubulares para el sistema de dispersión en horizontal

Para el caso del sistema de dispersión tradicional, se emplean tubos de ensayo hechos de vidrio de grado óptico. De igual manera, para prevenir contaminación por partículas extrañas y cerciorarnos de la limpieza los tubos, éstos pasan por un procedimiento lavado: se comienza por colocar a los tubos en un rack para poder llenarlos con alcohol isopropanol. Éstos se introducen a un vaso de precipitados y se agrega agua destilada al vaso hasta cubrir una altura equiparable con la altura del llenado de los tubos. Después se llevan a sonicar por media hora. Pasado el tiempo, se recambia el alcohol, y si se desea también del agua, repitiendo el paso de sonicación. Luego se retira el alcohol y se rellenan los tubos con agua milli-Q filtrada para repetir el proceso de sonicación. Una vez terminado los lavados, los tubos son llevados a secar al horno ( $110^{\circ}C$ ) por al menos tres horas para asegurar su secado. Finalmente, se dejan atemperar para poder trabajar con ellos. Cabe señalar que todo el procedimiento de lavado se realiza con la protección de los tubos dentro contenedores con tapa, como pueden serlo vasos de precipitado con tapa.

Este tipo de celdas son muy fáciles de manejar ya que la muestra para analizar solamente es introducida mediante pipeta, asegurándose únicamente de cubrir el

volumen mínimo, que va de acuerdo a la altura a la que el haz de luz esté con respecto a la altura de la celda. Para terminar, se sella la celda al colocar un tapón de plástico para evitar fuga del fluido contenido de la muestra y contaminación.

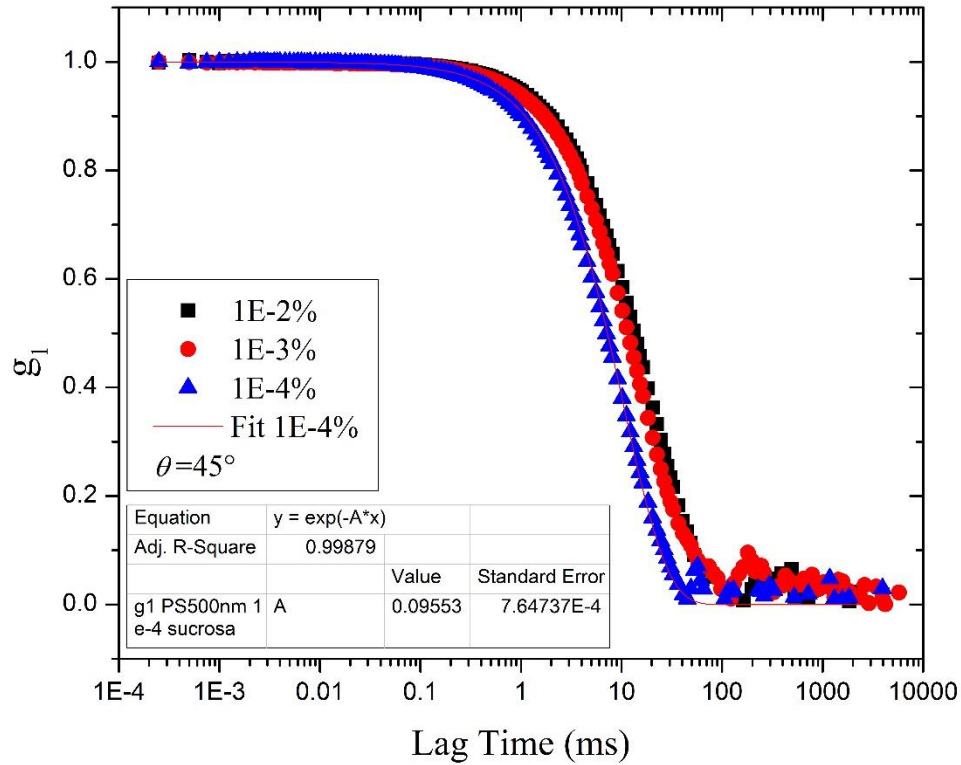
## 4.2 Resultados

La primera prueba realizada en el arreglo óptico tuvo el objetivo de conocer la concentración adecuada para obtener la función de correlación del campo  $g_1$ . Esta concentración debe de no ser muy alta para que valgan las condiciones de movimiento libre difusivo. La manera de conocer esa concentración es midiendo las funciones de correlación de la suspensión a distintas concentraciones y, la muestra que exhiba un decaimiento con buena relación a su tamaño, será la concentración que se va a tener en cuenta para hacer los experimentos. Para esto, se analizó la suspensión coloidal de partículas de poliestireno de diámetro de  $500 \text{ nm}$  a concentraciones de:  $0.01\%$ ,  $0.001\%$  y  $0.0001\%$   $w_{\text{sólidos}}/v$ , las cuales su medio acuoso fue sacarosa  $0.2 \text{ M}$ .

De las tres muestras se obtuvieron sus funciones de correlación del campo  $g_1$  (figura 4.3) mediante la conversión de los datos experimentales de  $g_{2-1}$ , usando la relación de Siegert, donde experimentalmente se conoce también a  $\beta$ . Entonces  $g_1 = [|g_{2-1}|/\beta]^{1/2}$ . El resultado de esto es mostrado en la gráfica de la figura 4.3.

Del ajuste de los datos usando como función modelo a la ecuación (2.11) para el decaimiento exponencial de  $g_1$ , se tiene que  $\Gamma = 0.09553 \text{ ms}^{-1}$  y el cuadrado del vector de dispersión es  $q^2 = 0.000103 \text{ nm}^{-2}$ . De acuerdo con la ecuación (2.8) se encuentra que  $D = 92.747 \text{ nm}^2/\text{ms}$  y entonces  $R_H \approx 200 \text{ nm}$ .

El tamaño deducido es aceptable si se tiene en cuenta que se han asumido las consideraciones ideales (que el tamaño de las partículas es de distribución tipo monodispersa y que el decaimiento  $\Gamma$  es monomodal, al suponer que todos los procesos difusivos tienen la misma magnitud) para un sistema de partículas coloidales que, estrictamente no es tan ideal. Además, el correlador impone de antemano que  $B = 1$  lo que condiciona a que no se puedan medir correctamente las funciones de correlación para sistemas coloidales que presentan un valor distinto para  $B$  en su experimento.



**Figura 4.3.** Funciones de correlación (correlogramas) de suspensiones coloidales con diferentes concentraciones en porcentaje de *peso de sólidos/volumen*.

Sin embargo, al comparar los resultados de esta prueba con las otras concentraciones, se estableció que la concentración óptima, de entre las tres, para los experimentos sería la concentración mas diluida. Las dos suspensiones coloidales de concentraciones  $1 \times 10^{-2} \%$  y  $1 \times 10^{-3} \%$ , parecen presentar efectos de enjaulamiento (las partículas no difunden libremente debido a que su difusión a tiempos se acorta por la presencia de muchas partículas), ya que sus tiempos de decaimiento son equivalentes para partículas de  $1 \mu m$ , aproximadamente.

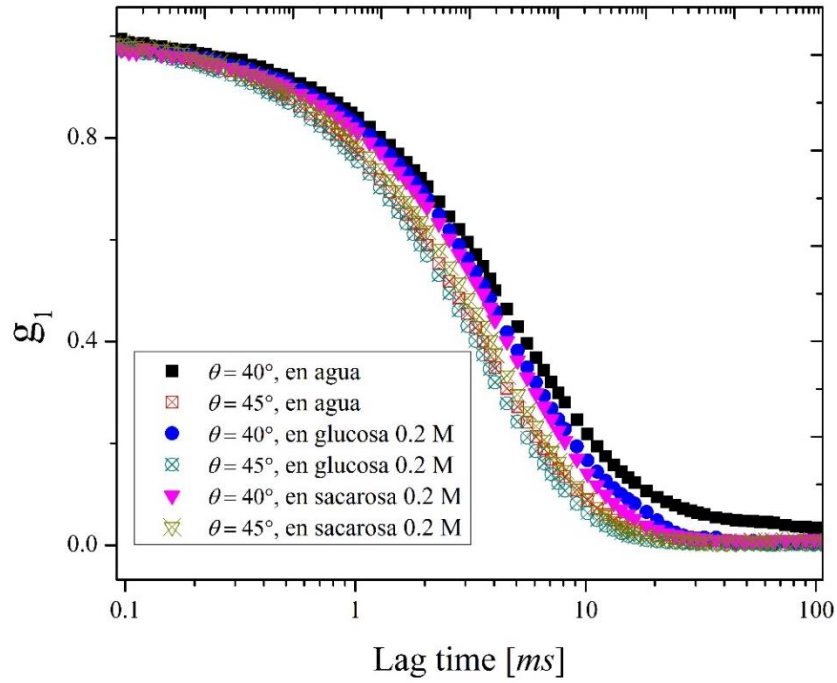
En la siguiente sección, se presentan los resultados de la puesta a prueba del arreglo óptico en vertical, al cotejar los resultados obtenidos para el tamaño de las partículas con la misma información que muestra el fabricante. Las suspensiones coloidales con las que se experimentó fueron hechas de partículas de poliestireno de tamaños (diámetros) de  $300\text{ nm}$  y  $500\text{ nm}$  dispersas en agua (especificaciones en sección 4.1.1), en medios acuosos de glucosa y sacarosa al  $0.2\text{ M}$ .

#### 4.2.1 Partículas coloidales

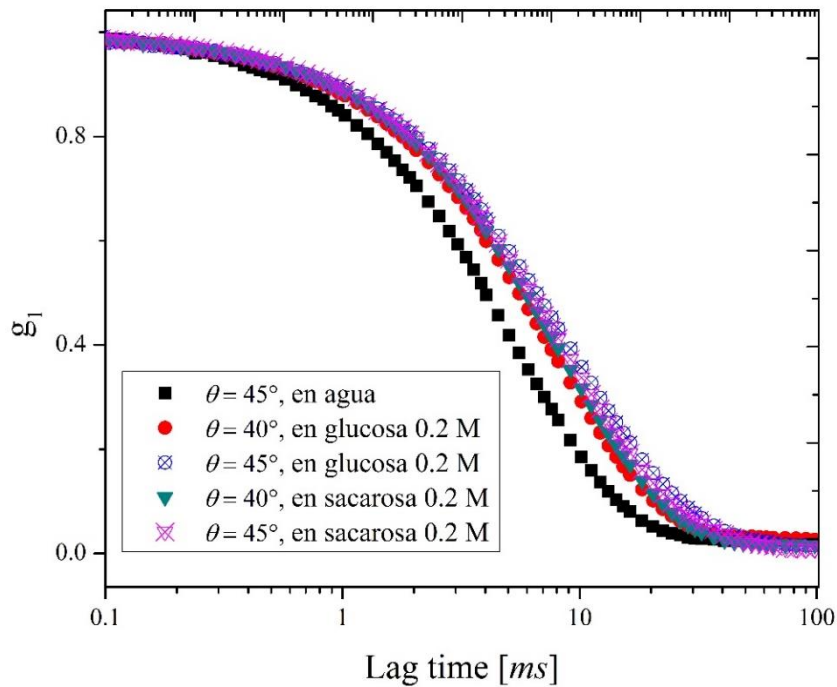
Al realizar experimentos de dispersión dinámica de luz a las muestras antes mencionadas, experimentalmente se obtuvieron sus funciones de correlación de la intensidad,  $g_{2-1}$ , y con la aplicación de la relación de Siegert (sección 2.2), se pudo hacer el traslado a las funciones de correlación del campo,  $g_1$ , que es la relación directa experimental de las partículas coloidales suspendidas en los medios acuosos con su interpretación y validez teórica. A continuación, se muestran las funciones de correlación del campo (figura 4.4).

Como se mostró en la sección 2.2, la función de correlación del campo tiene un comportamiento de decaimiento exponencial que depende de las propiedades ópticas de los elementos dispersantes, por medio del vector de dispersión, así como de sus propiedades físicas dadas por su coeficiente de difusión:  $[\Gamma] = [q^2 D] = s^{-1}$ . Al hacer un análisis sobre la ecuación del modelo y aplicando los valores específicos analíticos de los sistemas, se llegan a obtener curvas del modelo de funciones de correlaciones (figura 4.5). Estos modelos predicen que las curvas tienen un comportamiento en el decaimiento dado por una fuerte relación con el ángulo de dispersión, ya que el aumento en solo cinco grados indica una caída de la función más rápida con diferencia de alrededor de dos a cuatro milisegundos, con respecto a las curvas medidas con otro ángulo de dispersión.

### Partículas poliestireno 300 nm



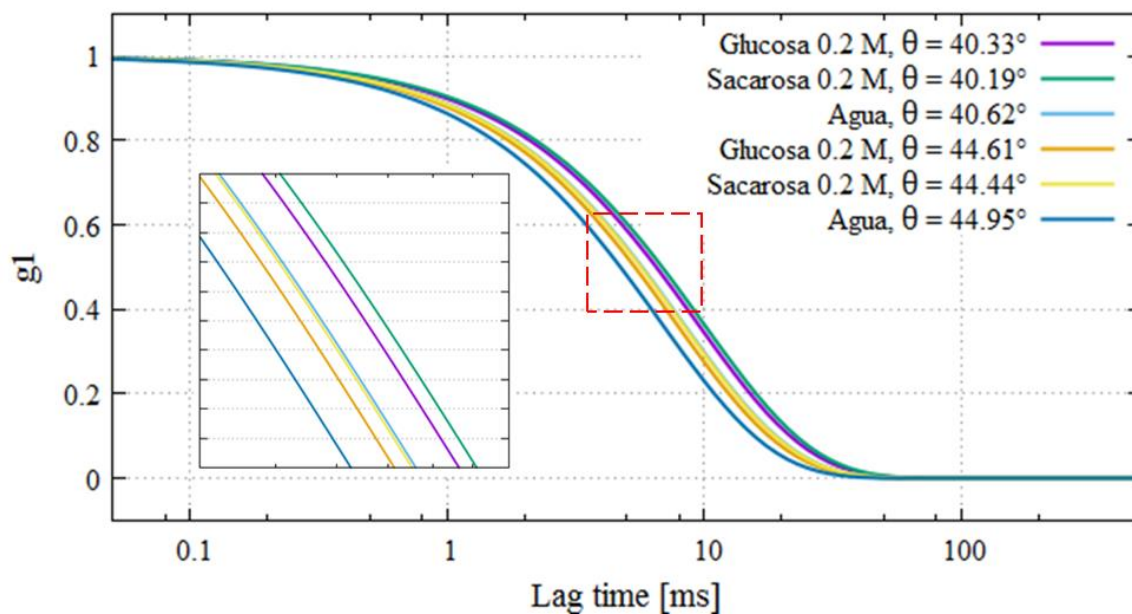
### Partículas poliestireno 500 nm



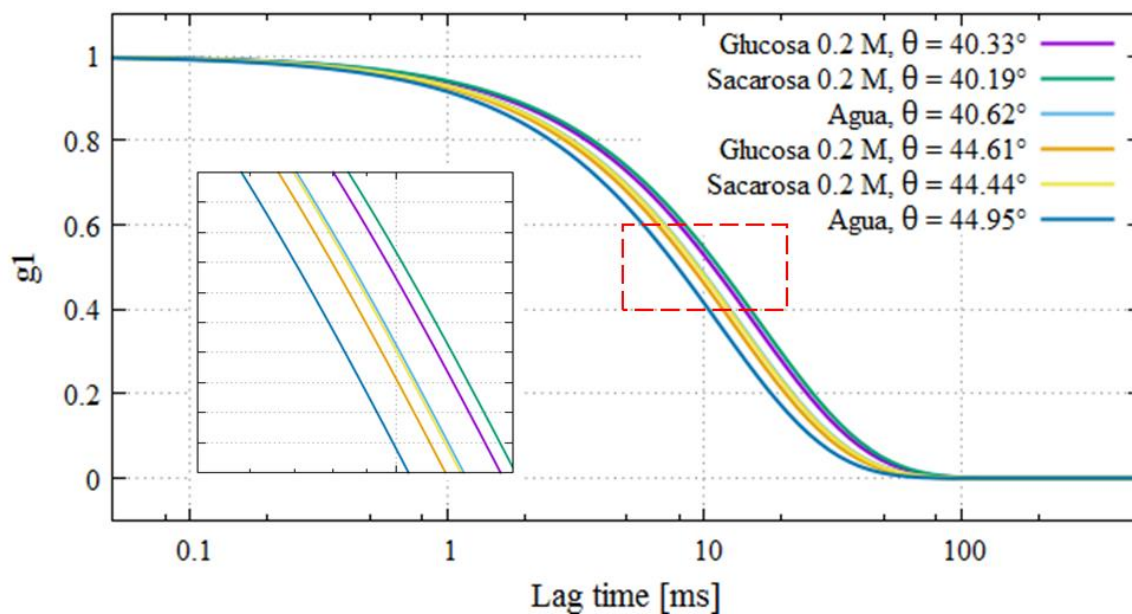
**Figura 4.4.** Funciones de correlación del campo dispersado por partículas coloidales en diferente medios. Estas mediciones se registraron usando el arreglo óptico en vertical para realizar DLS. Por cuestiones ilustrativas, se tomó el espacio de tiempo de 0.1 a 100 ms.



### Modelo de $\Gamma$ // PS 300 nm



### Modelo de $\Gamma$ // PS 500 nm



**Figura 4.5.** Modelos de las tasas de decaimiento esperadas para los sistemas coloidales, en donde se considera que todos los parámetros (temperatura, viscosidad, índice de refracción y tamaño) siempre son los mismos. Arriba: serie de funciones para partículas de 300 nm, Inset: ventana de tiempo de 4 a 10 ms. Abajo: serie de funciones de correlación para partículas de 500 nm. Inset: ventana de tiempo de 5 a 15 ms.

Retomando los hallazgos experimentales, las funciones de correlación del campo muestran un comportamiento parecido al modelo, puesto que los tiempos de decaimientos son similares cuando se tienen los mismos ángulos dispersión. Para las partículas de tamaño de  $300\text{ nm}$ , se tiene la separación de las funciones de correlación de acuerdo con su ángulo de dispersión, pero de forma contraria al modelo, es decir, que las funciones de  $g_1$  que tienen una descorrelación mas tempranamente son las que tienen un ángulo de dispersión de  $\theta_1 = 40^\circ$  y no como se esperaría por la teoría que sson las de  $\theta_1 = 40^\circ$  las que tienen un decaimiento tardío. Para el caso de las partículas de tamaño de  $500\text{ nm}$ , también se tiene una separación de las funciones de correlación, de acuerdo a su ángulo de dispersión, pero la diferencia entre ambos grupos no es tan evidente como lo establece el modelo. Sin embargo, estas funciones de correlación si siguen al modelo en cuanto a observar que las funciones con ángulos de dispersión  $\theta_1 = 45^\circ$  decaen temporalmente antes de las que tienen un  $\theta_1 = 40^\circ$ .

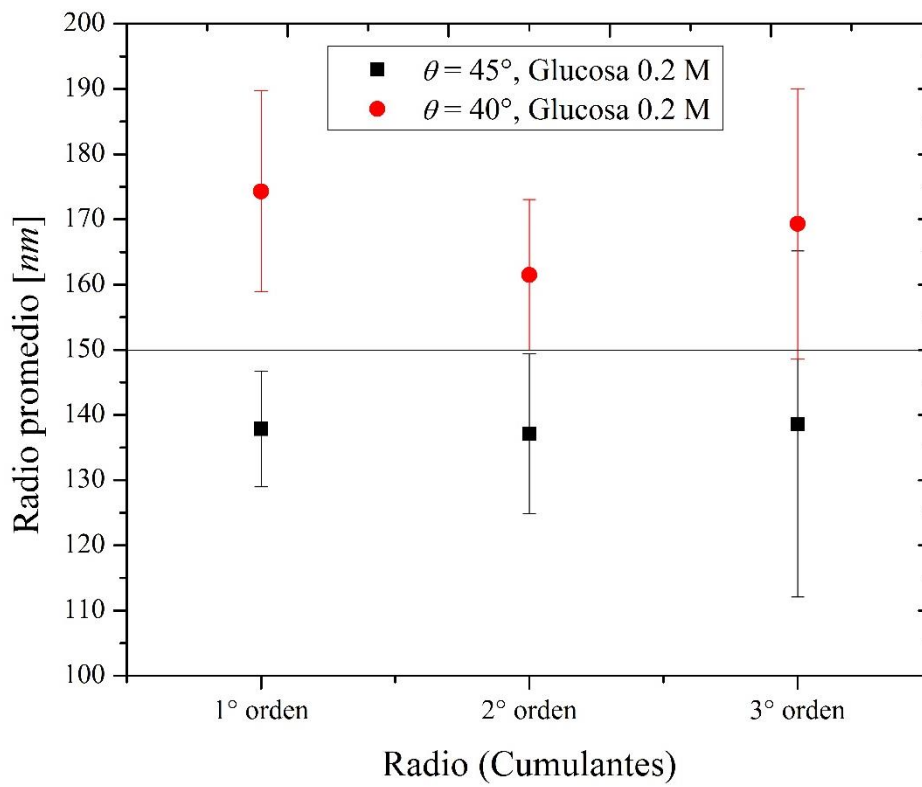
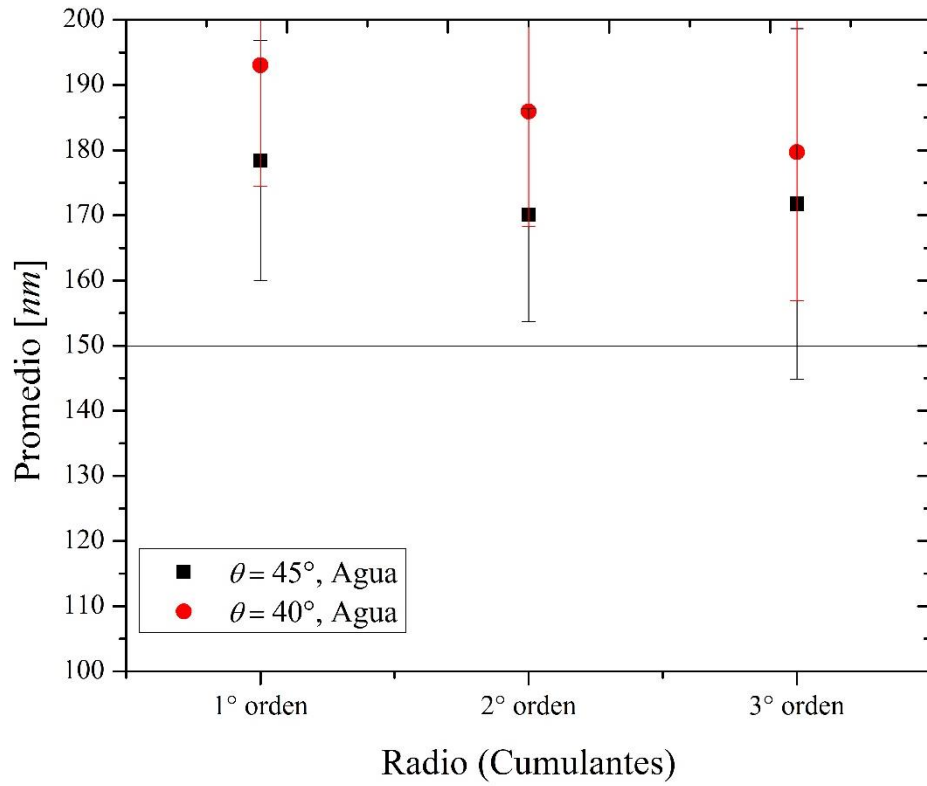
Según los modelos, el segundo factor de importancia es la viscosidad del medio acuoso, las curvas de funciones de correlación que tienen el mismo ángulo de dispersión, los decaimientos que ocurren primero son los que tienen viscosidades menores, lo que se relaciona con difusiones más rápidas. Para las partículas de  $500\text{ nm}$ , hay una casi concordancia en el orden de decaimiento dictaminado por las viscosidades. Las funciones de correlación, asociadas a las partículas de  $500\text{ nm}$  en los diferentes medios acuosos, que decaen primero y en ese orden, son: agua- $45^\circ$ , glucosa- $45^\circ$ , sacarosa- $45^\circ$ , agua- $40^\circ$ , glucosa- $40^\circ$  y sacarosa- $40^\circ$ . Experimentalmente, el comportamiento observado es casi reproducido, siguiendo el mismo orden de decaimiento: agua- $45^\circ$ , glucosa- $40^\circ$ , sacarosa- $40^\circ$ , sacarosa- $45^\circ$  y glucosa- $45^\circ$ .

De lo anterior se resume que los hallazgos para las funciones de correlación del campo, comparados con los modelos teóricos ideales, se tienen similitudes en cuanto al comportamiento dictado por el ángulo de dispersión. En cuanto a la influencia de la viscosidad, también se tienen algunas similitudes. Mediante este análisis está claro que ligeras diferencias en los parámetros físicos de las muestras (temperatura, índice de refracción, viscosidad, tamaño) determinan en gran medida el comportamiento de las funciones de correlación asociadas a ellas.

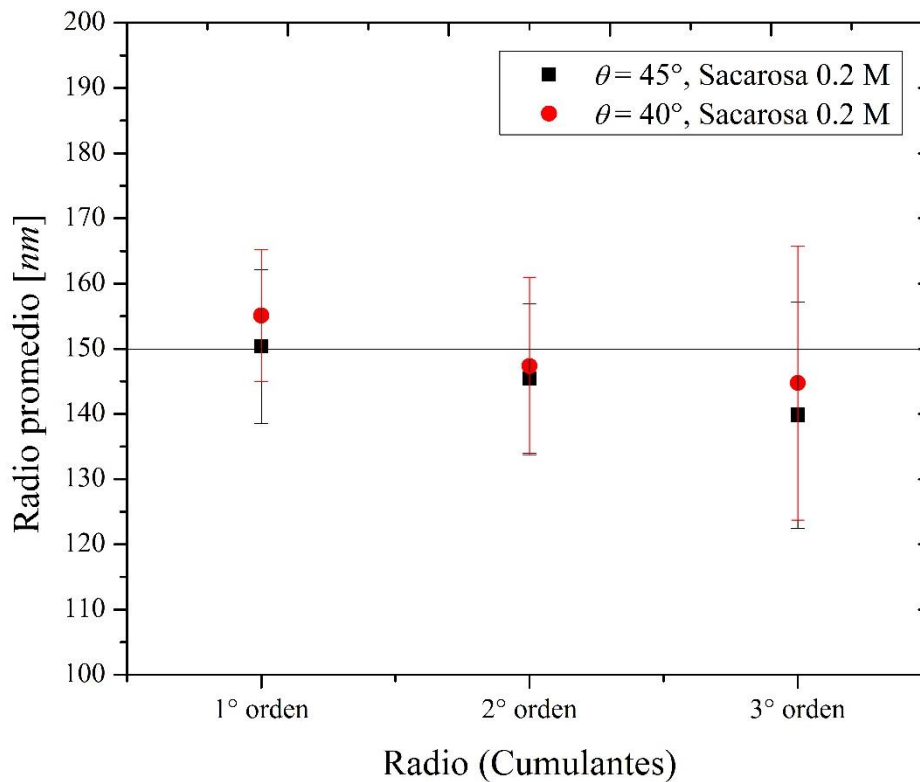
Por otra parte, se analizaron las funciones de correlación que se obtuvieron de una serie de mediciones sobre cada una de estas muestras. Tal análisis fue realizado por el software ALV, el cual se basa en la aproximación de Cumulantes (sección 2.3) y calcula los momentos de la función según la ecuación (2.17). De este análisis, se obtienen los valores promedios de los radios hidrodinámicos de las partículas que están en la muestra. Además, estos radios se calculan hasta un tercer grado. A continuación se presentan las distribuciones de los valores promedios de los radios, los que son están comparados con la línea de referencia que indica el radio de las partículas proporcionado por el fabricante.

Para las partículas de menor tamaño, las de  $300\text{ nm}$ , como se mencionó previamente, a pesar de que sus funciones de correlación del campo parecen no coincidir del todo con los modelos, el análisis de los resultados de los radios hidrodinámicos, calculados por la técnica de Cumulantes, dan tamaños comparables con los datos de las partículas dados por el fabricante (figura 4.6), con una diferencia no mayor ni menor al 20%. Es en el caso de cuando el medio es más viscoso (sacarosa 0.2 M) que los tamaños medidos son más cercanos al valor de las partículas. Además, parece que la variación angular en las mediciones, mejore los resultados de los tamaños.

Por otra parte, del ajuste por Cumulantes para las muestras de coloides de  $500\text{ nm}$ , se obtuvieron los valores del radio hidrodinámico, calculado hasta 3° orden. A partir de estos resultados, también se hizo un análisis cualitativo de certidumbre (figura 4.7). Los promedios de los radios hidrodinámicos, hasta el 3° orden, exhiben una diferencia significativa con la medida del radio real de las partículas. Dentro de los tres medios acuosos, el caso en que mayor diferencia tuvo fue para el del medio de agua. Conforme va aumentando el valor de la viscosidad, los radios medidos se acercan al valor de los  $250\text{ nm}$ . Y, comparando entre las mediciones a diferentes ángulos, no parece haber una mejor aproximación de un ángulo u otro.

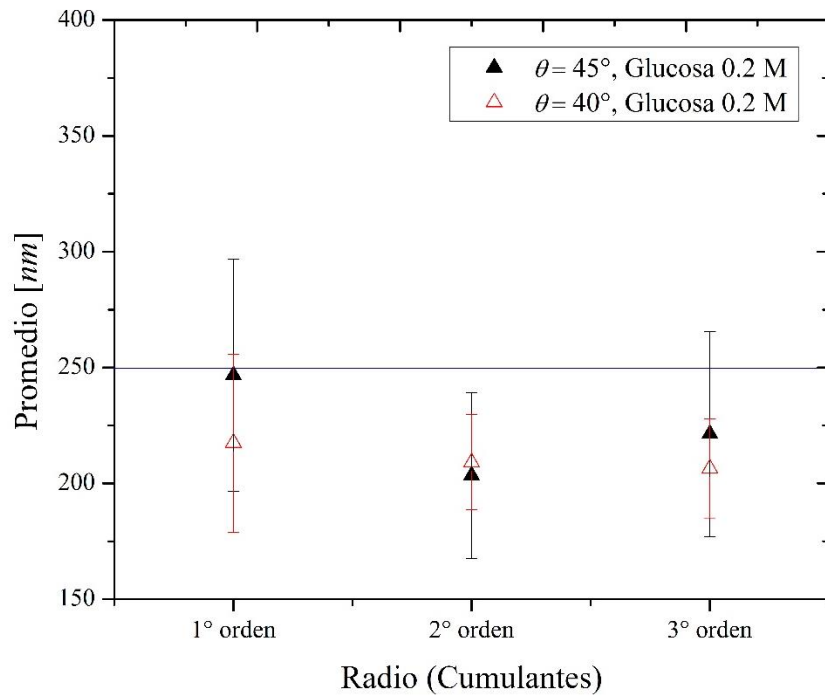
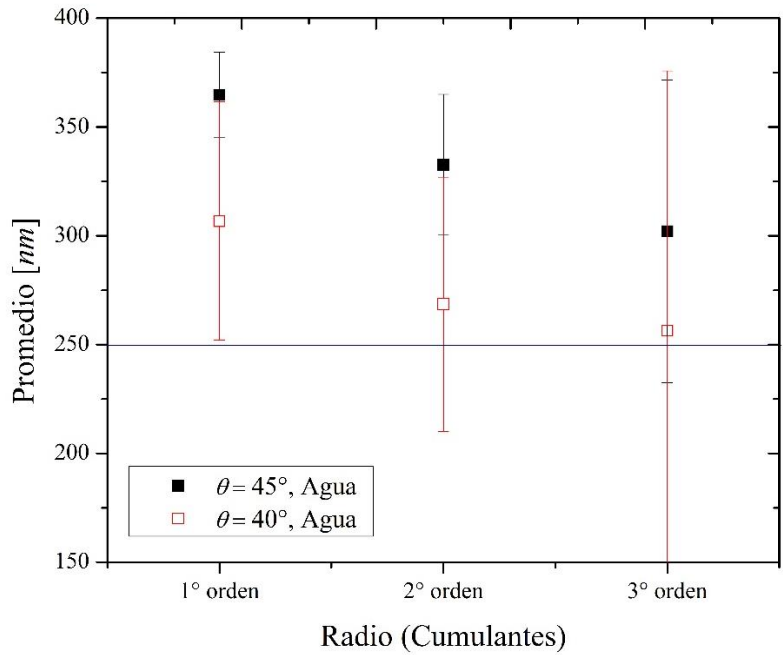


Continua pie de figura en la siguiente página

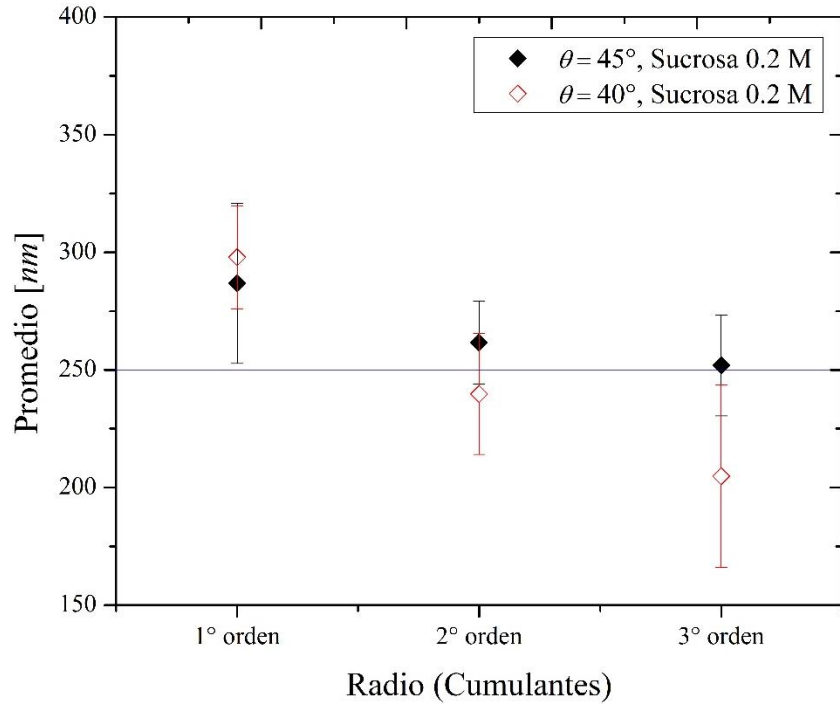


**Figura 4.6.** Distribución de los radios de las partículas con tamaño de 300 nm (radio de 150 nm). La variación de los radios medidos con respecto a los determinados por el fabricante, no sobrepasan el 33% agua, en glucosa 26% y en sacarosa el 13%.

---



Continua pie de figura en la siguiente página



**Figura 4.7.** Distribución de los radios de las partículas con tamaño de 500 nm (radio de 250 nm)

Como se mencionó en la sección 2.3, esta aproximación se puede realizar si se considera que, el tamaño de las partículas es de distribución tipo monodispersa y que la tasa de decaimiento  $\Gamma$  sea monomodal al suponer que todos los procesos difusivos tienen la misma magnitud. Además, como se pudo distinguir, que todas las variables del sistema tienen un rol en la obtención de la función de correlación adecuada, es decir, que cualquier cambio en los valores de alguna de estas propiedades para una misma muestra, pueden dar mediciones ligeramente diferentes pero que se traducen a cambios evidentes en los análisis de los tamaños de las partículas.

#### 4.2.2 Sistemas compuestos: vesículas con partículas

El sistema coloidal que se quiere medir por dispersión dinámica de luz usando el arreglo experimental en vertical, es uno que consiste en partículas coloidales confinadas en el interior de vesículas. Por medio de la visualización de las vesículas se

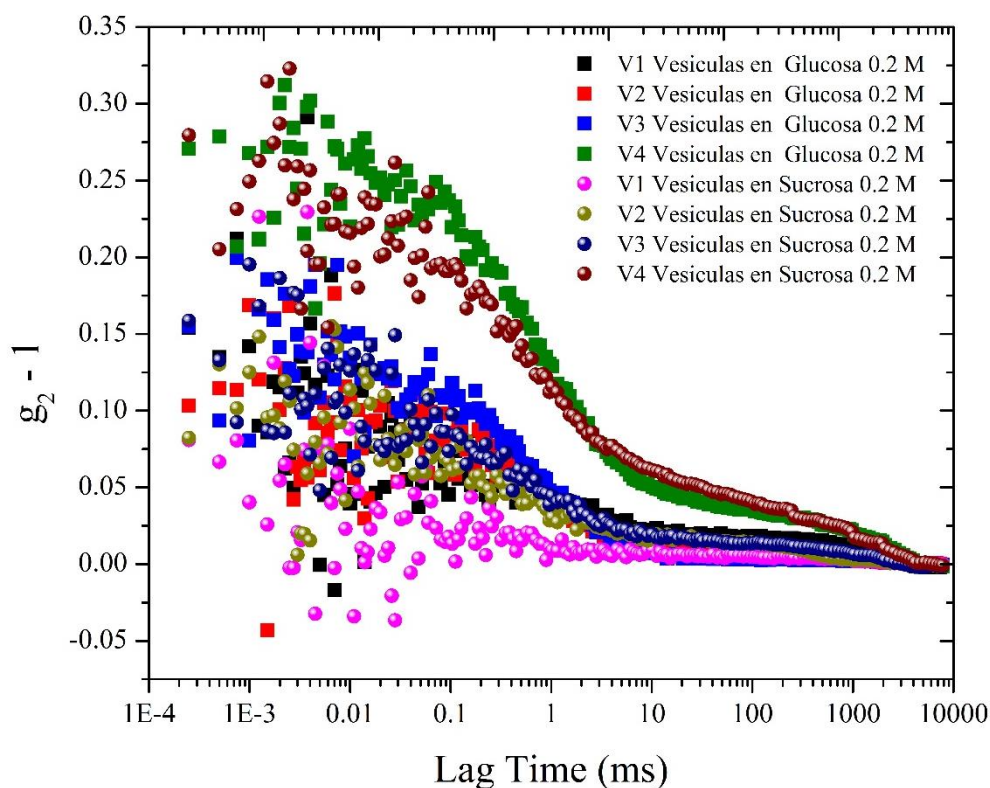
selecciona la región de la muestra que se pretende analizar. Y con la adquisición de las funciones de correlación del campo, que es dispersado en primera instancia por las partículas coloidales, se pretende dar interpretación de la dinámica de los coloides.

Para comenzar se presenta la siguiente cuestión: ¿cómo distinguir una suspensión de vesículas en donde el medio acuoso del interior es el mismo que el del exterior? En principio no es posible la visualización de las vesículas debido a que los índices de refracción de ambos medios es el mismo, y por lo tanto, no se tiene un contraste óptico para percibir las. Lo que comúnmente sucede es que se preparan suspensiones de vesículas diluidas en un medio acuoso con diferente índice de refracción. Esto es, hacer la suspensión de vesículas dispersas en solución de glucosa  $0.2 M$  para obtener tal contraste y, además usar microscopía de contraste de fases, poder visualizar a las vesículas. Sin embargo, para efectos de los experimentos de dispersión de luz, este ajuste para ganar contraste óptico hace que las vesículas sean “visibles” por la luz; en consecuencia se hacen elementos dispersantes de luz además de las partículas coloidales, las cuales son de la única especie de la que se quiere extraer la información.

En primeros experimentos de *DLS* sobre las suspensiones de vesículas, hechos en un arreglo óptico horizontal para dispersión de luz, muestran que por sí mismas las vesículas dispersan luz, independientemente de si se tiene un contraste o no en los índices de refracción de los medios acuosos de la parte interna y externa (Figura 4.8). La diferencia es que con el contraste de los índices de refracción la dispersión de luz se tiene un poco más de intensidad de luz en la dispersión que en el caso de cuando no hay contraste.

La gráfica mostrada solo tuvo fines únicamente cualitativos en cuanto a discernir si la membrana vesicular mostraba o no interacción con la luz incidente y observar si podía dispersar la luz. La forma de las curvas y la baja señal en la correlación es producto de la baja intensidad de la luz dispersada (aunado con que al ángulo de dispersión fue de  $90^\circ$ ), la cual fue la mínima para generar apropiadamente las operaciones estadísticas. No obstante, no fue lo suficiente para observar un comportamiento completo de la muestra y obtener más información medible.



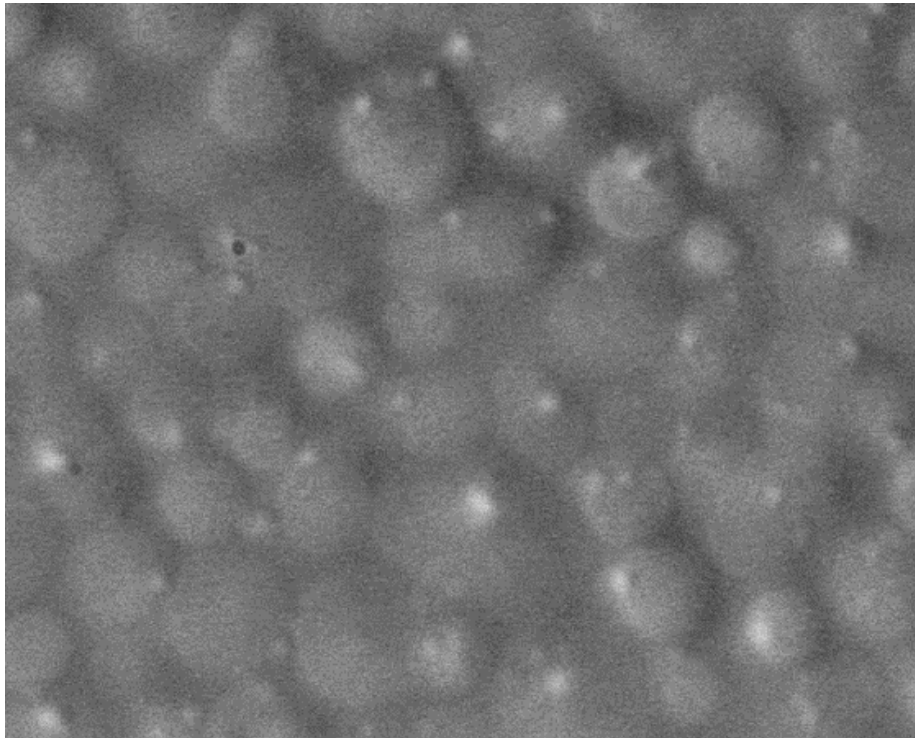
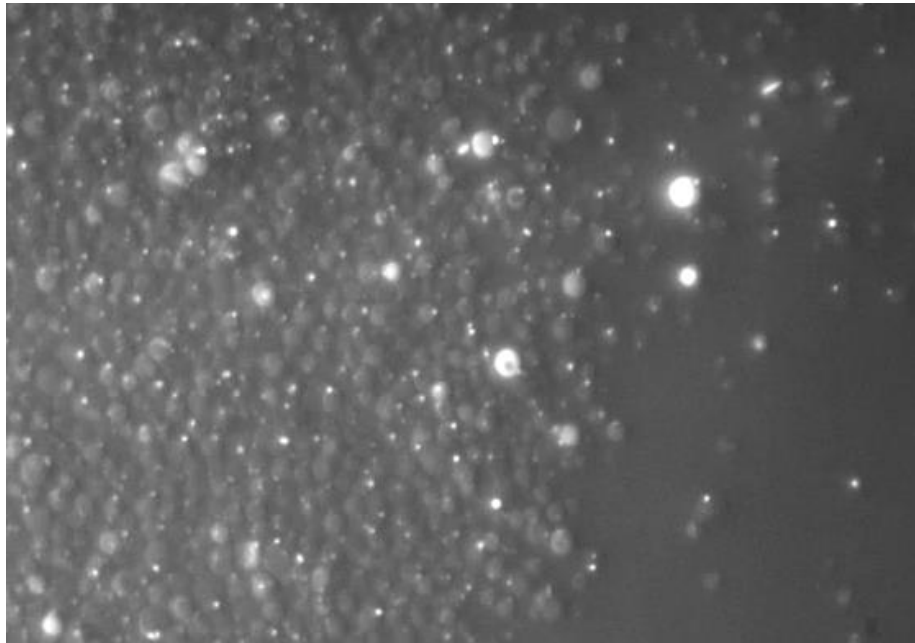


**Figura 4.8.** Funciones de correlación de la intensidad de luz ( $g_{2-1}$ ) de vesículas suspendidas en dos medios acuosos diferentes. V1 es para una concentración de vesículas del 10% v/v en la suspensión, V2 es para concentración del 20% v/v, V3 para una de 30% v/v y V4 para una de 40% v/v.

Con esto se tiene que la propia bicapa lipídica es otro elemento dispersante de luz y no puede ser despreciada en los experimentos. Además, de esta prueba se deduce que es posible usar las muestras de vesículas suspendidas en medios acuosos de glucosa para que también puedan ser observadas al microscopio, ya que la bicapa seguiría dispersando luz independientemente del medio. La suspensión de vesículas que tiene la concentración del 40% v/v en glucosa, tiene las características de que hay suficientes vesículas consistentes en dispersar la luz y que su señal dispersión sea apreciable; además de que el índice de refracción permite la visualización de las vesículas por microscopía (figura 4.9).

En las imágenes de la figura 4.9, se observa un cúmulo de vesículas que han sedimentado en la celda plana. Esta muestra de vesículas fue hecha junto con partículas coloidales de **500 nm** para poder encapsular algunas de ellas. En la imagen del aumento con **50X** se puede distinguir que las partículas están cerca de las membranas vesiculares, algunas otras en el medio acuoso de la suspensión. Después de un seguimiento de la muestra, se observó que las partículas interactúan con la membrana y que muy pocas permanecen en el bulto interno de las vesículas.

Una vez teniendo información de las partículas coloidales en los medios acuosos y con esta primera información de la dispersión de luz de las vesículas, se avanzó con la medición de las funciones de correlación de la muestra de partículas coloidales encapsuladas en vesículas las cuales, que por método de su elaboración, tienen partículas encapsuladas y otras libres en el medio acuoso.



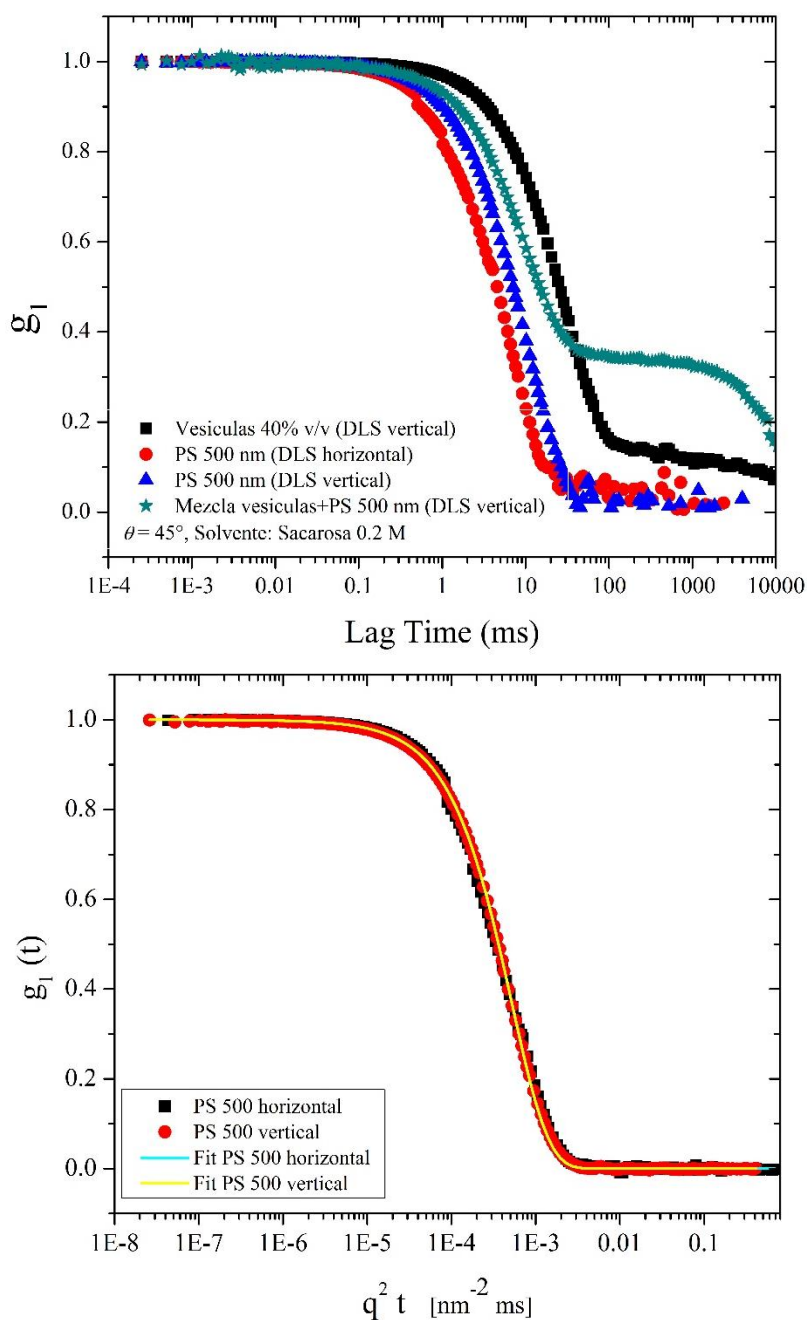
**Figura 4.9.** Visualización de la muestra de vesículas con partículas coloidales de 500 nm. A): muestra visualizada a 10X. Pueden diferenciarse dos regiones: del lado izquierdo está la acumulación de vesículas y del lado derecho una zona pobre y casi nula de vesículas. B) Aumento óptico de la muestra a 50X.

En la figura 4.10 se muestran resultados de las funciones de correlación del campo eléctrico dispersado por los elementos de la muestra de manera separada (símbolos cuadrados, círculos y triángulos hacia arriba) y de la suspensión de vesículas con las partículas encapsuladas (símbolos estrellas).

Revisando las curvas relacionadas con las suspensiones coloidales de poliestireno (puntos rojos y triángulos azules) fueron medidas por dos diferentes equipos para dispersión de luz, con las mismas condiciones experimentales. Como se puede observar, la curva perteneciente al arreglo en vertical, está desplazada ligeramente a tiempos posteriores que la curva del arreglo en horizontal, indicando que la dinámica de las partículas coloidales en las celdas planas se ve disminuida en alguna proporción, con respecto a las otras partículas analizadas con el otro aparato de dispersión.

Luego se tiene a la curva de la función de correlación de las vesículas al 40% v/v (símbolos recuadros negros), la cual es evidente que su tiempo de decaimiento supera un orden de magnitud a las partículas, además de que en el tramo final de la curva no cae hasta cero sino que cambia su pendiente y lentamente llega a cero.

Para el caso de la curva que mide la correlación de las vesículas con las partículas (estrellas verdes), se observa el decaimiento de la curva entre los tiempos de decaimiento de las partículas con la de las vesículas; después la curva decae hasta un valor ligeramente después de la mitad de su amplitud, quedándose en un escalón para luego decaer completamente.



**Figura 4.10.** Funciones de correlación del campo eléctrico dispersado por las especies de partículas coloidales de poliestireno medidos en arreglos diferentes (horizontal y vertical), suspensión de vesículas al 40% v/v, y un sistema de vesículas preparadas con partículas de poliestireno también al 40% v/v. La gráfica de abajo muestra el empalme de las funciones al normalizarlas con  $q^2$ , dando la noción que las mediciones que se efectúan con el arreglo en vertical no son del todo desviadas, sino que son por factores de los parámetros experimentales.

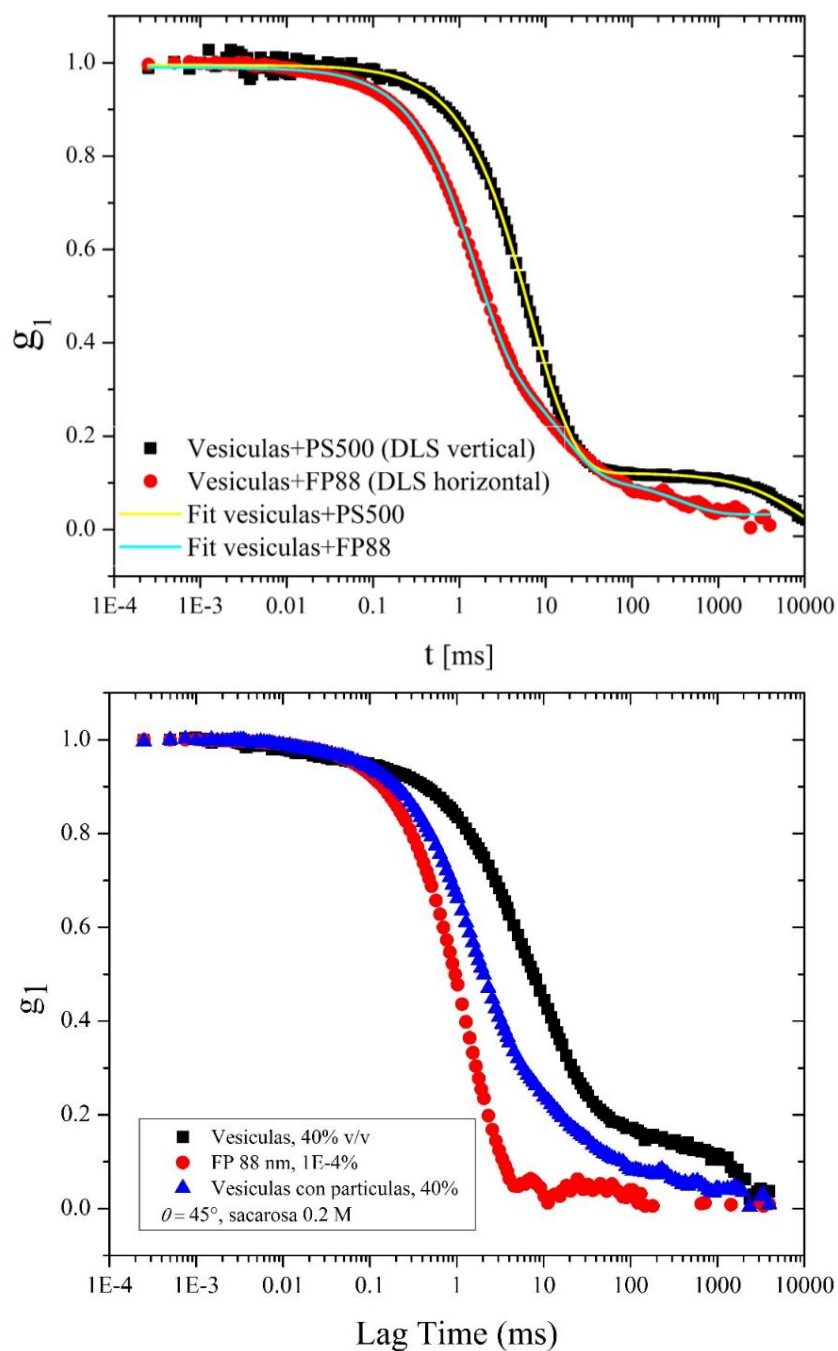
Para este comportamiento de la muestra compleja de vesículas con partículas, se plantea que es una superposición de tres contribuciones principales: para tiempos cortos está la contribución de la difusión de las partículas libres y confinadas en las vesículas; una segunda contribución en la parte intermedia de la caída por parte de las partículas adheridas en las membranas y; el último es propiamente el movimiento global de las vesículas (figura 4.11-arriba). Matemáticamente, la expresión para esta superposición contempla a cada contribución como una suma de funciones exponenciales, cada una con su tasa de decaimiento:

$$g_{1 \text{ vesículas+PS}} = A_1 e^{-\Gamma_1 t} + A_2 e^{-\Gamma_2 t} + A_3 e^{-\Gamma_3 t} + y_0 \quad (4.1)$$

Para complementar lo anterior, a continuación se exponen resultados de una suspensión de vesículas similar. Estos experimentos se realizaron en el arreglo óptico horizontal y las condiciones del experimento fueron con el mismo ángulo de dispersión de  $45^\circ$ , las partículas fluorescentes de tamaño de 88 nm y el medio acuoso de sacarosa 0.2 M (figura 4.11-abajo).

Una vez visto el mismo comportamiento de las funciones de correlación para las especies mixtas de vesículas con partículas coloidales, podría tenerse la misma interpretación sobre que su dispersión de luz sigue el comportamiento de cada uno de sus elementos y, que las funciones de correlación que la describen, son también una superposición de cada una de las contribuciones de cada especie que conforman al sistema mixto, como en el caso anterior. De ser así, se confirma la funcionalidad cualitativa del arreglo óptico vertical que fue construido.

Lo que falta de completar para ambos experimentos es que las mediciones de las funciones de correlación sean más consistentes para el caso de las suspensiones de partículas coloidales, puesto que al final de las curvas, se tiene un defecto en la línea base de la función de correlación computada, lo cual se requiere conocer su causa experimental para que una vez solucionándolo se puedan obtener mediciones confiables para un análisis cuantitativo. Mientras tanto, con estas dos primeras observaciones, las funciones de correlación presentadas son suficiente para dar una explicación cualitativa del fenómeno.



**Figura 4.11. Arriba:** funciones de correlación de los sistema compuestos de vesículas con partículas, donde se evidencia que el modelo de ajuste, basado en las contribuciones individuales de los componentes, si se adecua experimentalmente. **Abajo:** funciones de correlación del campo eléctrico dispersado por las especies de: partículas coloidales fluorescentes de 88 nm (puntos rojos), suspensión de vesículas de concentración 40% v/v en sacarosa (cuadros negros), y un sistema de vesículas hechas junto con partículas fluorescentes de 88 nm, también al 40% v/v (triángulos azules).

### 4.2.3 Discusión

Como se explicó al final del capítulo dos, las propiedades dieléctricas de la muestra, al igual que la concentración de los elementos dispersores, determinan el valor de la irradiancia; propiedad que es posible captar por los detectores fotomultiplicadores<sup>[30]</sup>. Estas propiedades son particulares para cada sistema dispersor, por lo tanto, llegan a diferir en la capacidad de dispersar la luz y esta señal puede llegar a ser de mayor o menor intensidad. Idealmente, en todas las mediciones de dispersión dinámica de luz, la línea base tiende al valor de la unidad; un valor muy diferente a éste, indica que no hay la suficiente estadística para aproximar los datos experimentales con la teoría de dispersión de luz. Sin embargo, cada sistema tiene su propia línea base que depende obviamente de las mediciones experimentales. Con esto, una línea base impuesta de manera *a priori*, determina en unos casos el cómputo erróneo de las funciones de correlación y las deforma. Este es el modo de operar de algunos correladores que computan la función  $g_{2-1}$ . Para las situaciones que se presentan en este trabajo, en donde se ha visto que cualquier desvío en el valor de un parámetro modifica drásticamente la forma de la función de correlación, se añade esta incertidumbre a los resultados presentados. En estudios similares <sup>[32]</sup>, se ha propuesto una aproximación adecuada para determinar los valores de  $B$  y  $\beta$  a partir de los datos experimentales, para aproximar la expansión de  $g_1$  de una manera más aceptable y llegar a interpretaciones más válidas.

Además de los pormenores electrónicos, sin duda están los detalles protocolarios y experimentales. La técnica utilizada para elaborar vesículas incluye la formación de otros cuerpos lipídicos de menor y de mayor tamaño, complejos o simples, además de partículas coloidales que no fueron encapsuladas, son un inconveniente importante ya que para los experimentos, la luz incidiría sobre todos los elementos que tengan las propiedades dieléctricas necesarias para dispersar luz, dándonos funciones de correlación un tanto complejas de interpretar ya que tendrían información tanto de las partículas confinadas como de los demás cuerpos dispersantes

Por otro lado, si nos fijamos a fondo de lo que ocurre cuando se prepara la muestra ocurre lo siguiente: de la electroformación se obtienen propiamente vesículas y otros cuerpos lipídicos (vesículas diminutas, micelas, partículas decoradas, agregados



y otros cuerpos amorfos.) que están dispersos en un medio de sacarosa. Luego se prepara la suspensión diluida al 40% en glucosa, lo que significa que hay una mezcla de soluciones y esto cambia el índice de refracción macroscópico y las diferencias en los parámetros físicos afectan las mediciones. Ahora bien, esto también significa que la viscosidad cambia y las vesículas, coloides y demás cuerpos lipídicos, se mueven Brownianamente en esta solución acuosa mixta con coeficientes de difusión diferentes a la de los coloides que quedaron encapsulados. Al momento de realizar las mediciones, se tuvo que considerar que las funciones de correlación tendrían en información mezclada de los elementos dispersantes que están en dos medio distintos. Se asumió que las partículas a seguir son las encapsuladas, lo cual se usaron los parámetros relacionados con la solución de sacarosa. Esta manera de englobar a todas las especies dispersantes bajo los mismos parámetros pudieron dar, en cierta medida, resultados un poco desviados de los que en realidad se pueden obtener. Por lo tanto, el ajuste protocolario para realizar los experimentos en el dispersor vertical debe completarse al abarcar las variantes desde la creación de las vesículas por otros métodos que sean efectivos, limpios y que puedan ofrecer más ventajas como la monodispersidad de las vesículas, lo que haría más simple la ejecución e interpretación de las funciones de correlación.

Si idealmente se supone que la dispersión solo ocurre en los sistemas de interés, se tendría que añadir que la polidispersidad de las vesículas tiene otro factor que modifica las características del efecto del confinamiento; porque este hecho es diferente cuando se tienen partículas dentro vesículas gigantes, donde podrían experimentar una difusión libre por mas tiempo, que cuando están dentro de una vesícula de menor tamaño, donde su difusión está mas restringida.

Esto también es trasladado a la cantidad de partículas presentes en la suspensión coloidal en confinamiento, es decir, que el confinamiento también sería influenciado por la concentración de partículas dentro de las vesículas, algo que no será igual en todas las vesículas. En pocas palabras, se observa la estrecha relación que tendría la fracción de volumen de las partículas dentro de las vesículas con el confinamiento, ya que está relacionado con el camino libre medio que tiene una partícula para desplazarse antes de colisionar con otra. Con esto, también podría observarse dos regímenes de confinamiento: uno con origen de la propia restricción de

la frontera vesicular cuando la concentración de las partículas es diluida; y otra con origen en el aumento de la fracción de volumen de las partículas dentro de la vesícula, donde se presentaría enjaulamiento por algo que sin duda sería interesante muestrear en otro trabajo. Estas exploraciones podrían ser ejecutadas al tener una metodología apropiada en la elaboración de vesículas, con la que permita manipular estos parámetros.

Otro aspecto de relevancia para la interpretación de las funciones de correlación de las suspensiones coloidales confinadas, es que la polidispersidad en el tamaño de las vesículas influye en no obtener un solo comportamiento de confinamiento y su propia difusión dentro de estas cavidades, porque sería lo mismo una difusión de partículas confinadas en una vesícula del doble o más de tamaño que otra. Además de que la concentración de partículas encapsuladas también es otra variante por la distancia libre media entre partículas; situación que es parte de una perspectiva en la que se plantea estudiar el fenómeno de confinamiento en función de la concentración. Por tales motivos, es importante el desarrollo protocolario de la fabricación de estas muestras por métodos que ofrecen más homogeneidad.

El efecto del confinamiento es un tema de interés, ya sea por motivos científicos o por la aplicación de este conocimiento <sup>[5, 25]</sup>. En otros trabajos se ha observado que el confinamiento afecta en la difusión de las partículas cuando el tamaño de su restricción espacial es comparable con su tamaño, ya que comienza a tener importancia la interacción de los bordes de las fronteras con las partículas <sup>[36, 37]</sup>. Particularmente, en sistemas de partículas coloidales confinadas en vesículas, A. D. Dinsmore *et al.* (1998) explicaron, bajo una interpretación de fuerzas entrópicas, que en una mezcla de partículas coloidales de diferente tamaño, las de mayor tamaño tienden a desplazarse hacia las membranas de las vesículas y preferencialmente cuando estas vesículas tienen mayor radio de curvatura <sup>[37]</sup>. Esto está en concordancia con las observaciones experimentales que se exhibieron en este trabajo, que de acuerdo con la figura 4.9, donde se observaba que las partículas coloidales permanecían en las proximidades de la superficie interna de las vesículas; aunque no fue alcanzable distinguir cuantitativamente si se tuvo un efecto en el coeficiente de difusión de estas partículas. La técnica experimental que emplearon en este trabajo fue por videomicroscopía, en donde median la posición de las partículas con respecto al eje meridional de las

vesículas para obtener una distribución y utilizar así la distribución de Boltzmann para hallar la energía libre.

Por otro lado, en cuanto a los estudios de confinamiento cerca de paredes, Carbajal-Tinoco *et al.* (1997) y P. Lancon *et al.* (2002) mostraron que existen modificaciones en el coeficiente de difusión cada vez que las partículas coloidales son restringidas a moverse en espacios cuasi-bidimensionales, y que la reducción en el espacio libre que tienen verticalmente influencia en el decremento de su difusión. Aquí se resalta experimentalmente de las técnicas en las que se apoyaron: videomicroscopia y dispersión de luz. La primera para dar seguimiento a las partículas y determinar su coeficiente de difusión vía desplazamiento cuadrático medio. La técnica de dispersión de luz fue también usada por P. Lancon para determinar el coeficiente de difusión perpendicular con respecto a las paredes. Las aproximaciones son similares a las empleadas en este trabajo, con la diferencia en que ambas técnicas se hicieron por separado y cambiando la celda de la muestra.

Estas investigaciones pueden ser similares a la que se presenta aquí, en cuanto al sistema de estudio y aproximación experimental. Sin embargo, se resalta la originalidad del arreglo óptico presentado, en la que su aplicabilidad es justificada por trabajos de la misma línea pero ventajosa al obtener mediciones separadas sobre la misma región particular del sistema, empleando dos técnicas que se complementan entre sí.

# 5 Conclusiones

Se presentó un arreglo óptico que conjunta las técnicas experimentales de dispersión dinámica de luz con microscopía óptica, de manera que fungieran como complemento la una de la otra. El reto a resolver de manera experimental, fue la adaptación de la técnica de dispersión para un sistema en donde se demanda la directa observación del objeto de estudio, y tener la certeza de que el experimento se realice sobre él mismo y sus alrededores. Con esto en mente, se tuvo que cambiar la geometría de las celdas cilíndricas, que se usan normalmente, por otras celdas de superficie plana “hechas en casa”, que cumplen con los requerimientos para observar la muestra con el microscopio y también para los experimentos de dispersión.

El segmento del arreglo óptico dedicado a la realización de experimentos de dispersión dinámica de luz, tiene la particularidad de estar en una configuración *en vertical*, es decir, que el plano de dispersión (el plano paralelo que barre el ángulo de dispersión) es perpendicular al plano de la mesa en la que se montó; en otras palabras, el haz de incidencia es perpendicular a la superficie de la mesa y a la cara plana de la celda de la muestra. Por otro lado, el sistema básico de microscopía permite tomar imágenes en regiones de la muestra, además de que en esa área de observación, se realiza el experimento de dispersión dinámica de luz. Con esto, el usuario selecciona la zona donde realizar los experimentos.

Una vez con el sistema experimental construido, se realizaron experimentos de dispersión dinámica de luz en muestras coloidales para dar inicio a la caracterización, manejo del equipo y mejoras. En los experimentos realizados en partículas coloidales,

el arreglo muestra un funcionamiento razonable, comparado con los arreglos ya bien establecidos, pues el rango de desviación de los tamaños obtenidos fueron de entre el 20 y 30%. Con la obtención de estos resultados, comparado con otros arreglos para dispersión de luz, se pone en énfasis el rol crítico que tienen las propiedades que conforman a todo el sistema que se analiza, además de otros sucesos que pudieran interferir: variaciones en los índices de refracción así como de las viscosidades de los medios acuosos, deformaciones en las celdas que hagan desviar la luz, formación de agregados coloidales y control estable en la temperatura, entre otros.

Por otro lado, el montaje experimental fue capaz de adquirir la luz dispersada por las vesículas, al igual que de la mezcla con partículas coloidales. A pesar de que al momento se tiene solo una interpretación cualitativa del comportamiento de las curvas, con los ajustes experimentales posteriores, se espera que las mediciones muestren un poco más de coherencia en el comportamiento de las funciones de correlación de las dos especies de interés. Asimismo, se hizo provecho de la celda para obtener imágenes de las vesículas (y de la mezcla con partículas). Para obtener visualizaciones con más nitidez y sin efectos de difracción por el haz del láser, se usó un microscopio convencional para observar el acomodo que llega a tener la muestra de vesículas con partículas y así llegar a la interpretación discutida anteriormente.

Al tener desarrollado y calibrado al arreglo óptico para ser aplicado al tema de la dinámica de suspensiones coloidales confinadas y en presencia de vesículas, se requiere de la refinación técnica de los protocolos de limpieza de vesículas o por su reemplazamiento; esto con la tarea de primero determinar la forma concreta (y reproducibles) de las funciones de correlación que se obtienen por las vesículas. Además, mediante el dispositivo de microscopia se podrían contar el número de partículas dentro de una vesícula o grupo de ellas, y registrar la dispersión de luz únicamente de los sistemas de interés. La unión de la información recabada por cada técnica puede complementarse para construir una descripción completa del fenómeno de confinamiento en términos de la fracción de volumen de los coloides. Al tener el proceso tecnificado, lo siguiente caería en modificar las propiedades viscoelásticas de la membrana para hacerlas más tensas y mantener la forma <sup>[34, 37]</sup>, mediante la adición de moléculas de colesterol, y observar los cambios en la dinámica coloidal. También una alternativa experimental o complemento de la misma fenomenología que se quiere

vislumbrar, es con el uso de partículas hechas con cristal líquido, lo que le ofrece una anisotropía óptica que puede aprovecharse (si al mismo tiempo se adecua el arreglo experimental para realizar DLS polarizada) para recolectar la luz dispersada que tiene origen en los movimientos rotacionales de las partículas.

Con base a todo lo anterior, este trabajo comenzó con una metodología experimental basada en la técnica de dispersión dinámica de luz para ser aplicada en sistemas compuestos por más de dos especies diferentes. Además de obtener las funciones de correlación, se puede vislumbrar más información al observar cómo cada especie se estructura entre sí y con respecto a la(s) otra(s) e inferir qué elementos o estructuras formadas son los que dispersan luz y como se vería reflejado en las funciones de correlación. Cosa que no es posible conocer al usar aparatos para dispersión de luz y sin haber manipulado mucho a la muestra. A pesar de los trabajos realizados acerca de esta temática de confinamiento usando vesículas <sup>[37]</sup>, así como del uso experimental de la dispersión dinámica de luz y microscopia <sup>[36, 37]</sup> para obtener información acerca de la fenomenología del confinamiento, aquí se hace notar la combinación de ambas técnicas para el estudio de este tema mediante el arreglo óptico que permite conjuntamente la realización de ellas. A su vez, la originalidad de este proyecto sigue estando en usar la dispersión dinámica de luz en multiángulo para analizar el confinamiento de suspensiones dentro de vesículas.

La finalidad de la implementación de esta técnica experimental tipo híbrida es prometedora y con bastante potencial para ser aplicada en muestras simples y complejas. Algunos sistemas compuestos ya existentes que son interesantes ya han sido estudiados mediante microscopia, usualmente confocal, pero analizarlos vía dispersión dinámica de luz con la herramienta mostrada en este trabajo podría complementar, en términos físicos, la información localizada de la muestra como interacciones entre polímeros con partículas, propiedades reológicas, y la misma dinámica.

Muchos otros sistemas de interés son aplicables para ser puestos es en arreglo óptico en vertical, en general, sistemas de materia blanda: redes poliméricas, emulsiones, microorganismos, células, organelos celulares, proteínas y sus mezclas en confinamiento o en flujos, solo por mencionar algunos. Todo lo anterior es interesante para la descripción difusiva de elementos celulares ya que desde el punto de vista físico, el medio citoplasmático es extremadamente complejo de tratar cuando se quiere dar

explicación de la difusión dentro de las células. Habiendo dicho esto, sin duda entran muchas situaciones de esta índole que resultarían interesantes de analizar empleando este sistema óptico. De esta manera se muestra la importancia del desarrollo preciso e implementación del arreglo experimental híbrido que se propuso en este trabajo.

# Bibliografía

- 1 E. Hetch, A. Zajac, “Optics”. *Addison-Wesley Publishing Company* (1974).
- 2 H. Löwen, “Colloidal soft matter under external control”. *J. Phys.: Condens. Matter* (2001), **13**, R415
- 3 E. Sarmiento-Gómez, J. A. Rivera-Morán and J. L. Arauz-Lara, “Single particle states of colloidal particles in 2D periodic potentials”. *Soft Matter*, (2018), **14**, 3684.
- 4 M. D. Carbajal-Tinoco, G. Cruz de León, J. L. Arauz-Lara, “Brownian motion in quasibidimensional colloidal suspensions”. *Phys. Rev. E.* (1997), **56**, 6962.
- 5 G. Cevc, “Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin”. *Advance Drug Delivery Reviews*, (2004), **56**, 5, 675-711.
- 6 E. R. Weeks, J. C. Crocker, D. A. Weitz, “Short- and long-range correlated motion observed in colloidal glasses and liquids”. *J. Phys.: Condens. Matter*, (2007), **19**.
- 7 J. C. Crocker, M. T. Valentine, E. R. Weeks, T. Gisler, P. D. Kaplan, A. G. Yodh, D. A. Weitz, “Two-Point Microrheology of Inhomogeneous Soft Materials”. *Phys. Rev. Lett.* (2000), **85**, 4.
- 8 I. Y. Wong, M. L. Gardel, D. R. Reichman, E. R. Weeks, M. T. Valentine, A. R. Bausch, D. A. Weitz. “Anomalous diffusion probes microstructure dynamics of entangled F-actin networks”. *Phys. Rev. Lett*, (2004), **92**, 178101.
- 9 K. Karamdad, R. V. Law, J. M. Seddon, N. J. Brooks, O. Ces. “Preparation and mechanical characterisation of giant unilamellar vesicles by a microfluidic method”. *Lab on a chip*, (2015), **15**, 557.
- 10 C. W. Coynem K. Patel, J. Heureau, J. Stachowiak, D. A. Fletcher, A. P. Liu. “Lipid bilayer vesicle generation using microfluidic jetting”. *J. Vis. Exp.* (2014), **84**, 51510.



- 11 S. Pautot, B. J. Frisken, D. A. Weitz. “Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion”. *Langmuir*, (2003), **19**, 2870-2879.
- 12 G. L. Hunter, K. V. Edmond, E. R. Weeks. “Boundary mobility controls glassiness in confined colloidal liquids”. *Phys. Rev. Lett.* (2014), **112**, 218302.
- 13 V. Prasad, S. A. Koehler, E. R. Weeks. “Two-particle microrheology of quasi-2D viscous systems”. *Phys. Rev. Lett.*, (2006), **97**, 176001.
- 14 L. A. Meure, N. R. Foster, F. Dehghani. “Conventional and dense techniques for the production of liposomes: a review”. *AAPS Pharm. Sci. Tech*, (2008), **9**, 3.
- 15 M. G. Sá Correia, M. L. Briuglia, F. Niosi, D. A. Lamprou. “Microfluidic manufacturing of phospholipid nanoparticles: stability, encapsulation efficacy, and drug release”. *International Journal of Pharmaceutics*, (2017), **516**, 91-99.
- 16 Renliang Xu. “Light scattering & Photon correlation spectroscopy”, y “Photon correlation Spectroscopy”, Particle characterization: light scattering methods. *Kluwer Academic Publishers*.
- 17 B. J. Berne & R. Pecora. “Light scattering and fluctuations”, “Basic light scattering theory”, “The light scattering experiment”. John Wiley & Sons Inc.
- 18 R. Finsky, P. de Goren, L. Deriemaeker, M. van Laethem. “Singular value analysis and reconstruction of single- and multi- angle photon correlation data”. *J. of Chem. Phys*, (1989), **91**, 7374.
- 19 P. A. Hassan, S. Rana, G. Verma, “Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering”. *Langmuir*, (2015), **31** (1), pp 3–12
- 20 G. D. J. Phillies, “Interpretation of light scattering spectra in terms of particle displacements”. *arXiv:cond-mat/0502185*.
- 21 B. U. Felderhof, “Effect of the Wall on the Velocity Autocorrelation Function and Long-Time Tail of Brownian Motion”. *J. Phys. Chem. B*, (2005), **45** y pp 21406–21412.
- 22 S. Carrington, “Dynamic Light Scattering (DLS) Microrheology: Taking Rheological Characterization to Extremes”. *American Laboratory*. Liga:

- <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/144247-Dynamic-Light-Scattering-DLS-Microrheology-Taking-Rheological-Characterization-to-Extremes/>
- 23 Sin autor, “Dynamic Light Scattering”, *LS Instruments*. Liga:  
<https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls/dls-data-analysis-cumulant-method>
  - 24 M. A. Vorontsova, P. G. Vekilov, D. Maes, “Characterization of the diffusive dynamic”. *Soft Matter*, (2016), **12**, 6926-6936
  - 25 H. Saito, Y. Kato, Maël Le Berre, A. Yamada, T. Inoue, K. Yosikawa, D. Baigl, “Time-Resolved Tracking of a Minimum Gene Expression System Reconstituted in Giant Liposomes”. *ChemBioChem* (2009), **10**, 1640 – 1643
  - 26 J. Pencer, F. R. Hallett, “Effects of Vesicle Size and Shape on Static and Dynamic Light Scattering Measurements”. *Langmuir*, (2003), **19** (18), pp 7488–7497.
  - 27 T. A. Enoki, V. B. Henriques, M. T. Lamy, “Light scattering on the structural characterization of DMPG vesicles along the bilayer anomalous phase transition”. *Chemistry and Physics of Lipids* (2012), **165**, 826–837.
  - 28 R. Michel, T. Plostica, L. Abezgauz, D. Danino M. Gradzielski, “Control of the stability and structure of liposomes by means of nanoparticles”. *Soft Matter*, (2013), **16**.
  - 29 X. Zhang, W. Hsu, J. P. Hsu, S. Tseng, “Diffusiophoresis of a Soft Spherical Particle in a Spherical Cavity”. *J. Phys. Chem. B*, (2009), **113**, 25, pp 8646–8656
  - 30 Y. Tamba, H. Terashima, M. Yamazaki, “A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles”. *Chemistry and Physics of Lipids*, (2011), **164**, 5.
  - 31 C. van der Wel, A. Vahid, A. Šarić, T. Idema, D. Heinrich, D. J. Kraft, “Lipid membrane-mediated attraction between curvature inducing objects” *Scientific Reports*, (2016), **6**, 32825.
  - 32 B. J. Frisken, “Revisiting the method of Cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data”. *Applied Optics*, (2011), **40**, 24.

- 33 N.F. Bunkin, A.V. Shkirin, N.V. Suyazov, L.L. Chaikov, S.N. Chirikov, M.N. Kirichenko, S.D. Nikiforov, S.I. Tymper, “Influence of low concentrations of scatterers and signal detection time on the results of their measurements using dynamic light scattering”. *Quantum Electronics*, (2017), **47**, 10, pp 949 – 955.
- 34 P. Edera, D. Bergamini, V. Trappe, F. Giavazzi, R. Cerbino, “Differential dynamic microscopy microrheology of soft materials: A tracking-free determination of the frequency-dependent loss and storage moduli”. *Phys. Rev. Materials*. (2017), **1**, 073804.
- 35 T. Okano, K. Inoue, K. Koseki, H. Suzuki, “Deformation Modes of Giant Unilamellar Vesicles Encapsulating Biopolymers”. *ACS Synth. Biol.* (2018) DOI: 10.1021/acssynbio.7b00460.
- 36 P. Lancon, G. Batrouni, L. Lobry, N. Ostrowsky, “Brownian walker in a confined geometry leading to a space-dependent diffusion coefficient”. *Physica A*, (2002), **304**, 65.
- 37 A. D. Dinsmore, D. T. Wong, P. Nelson, A. G. Yodh, “Hard spheres in vesicles: curvature-induced forces and particle-induced curvature”. *Phys. Rev. Lett.* (1998), **80**, 409.