

Encapsulación de Hidrolizados de Sangre Bovina Utilizando Liposomas: Evaluación de la
Formulación y Propiedades Físicoquímicas

David Santiago Díaz Márquez y Sebastian Carvajal Jaimes

Trabajo de Grado para Optar al Título de Ingeniero Químico

Director

Luis Javier López Giraldo

Ing. Químico, PhD. Química Bioquímica y ciencia de alimentos

Codirector

Yuli Sandrith Rojas Ardila

Ing. Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

Dedico principalmente este trabajo a Dios todopoderoso, quien me dio vida, salud y aliento para la culminación de este proyecto, todo honor y toda gloria sea al universal.

A mis padres, quienes me dieron todo su amor, apoyo y las herramientas para formarme como persona íntegra, ética, y profesional, a ellos les debo todos los logros de mi vida, gracias por ser tan excelentes padres, me siento orgulloso de ser su hijo.

A mis hermanas, quienes nunca dejaron de creer en mí y me ayudaron en todo lo que necesitaba y mucho más, gracias por todo lo que han hecho por mí.

A mi compañera de vida, quien siempre estuvo para escucharme, apoyarme y aconsejarme incondicionalmente, gracias por ayudarme a crecer como persona académica y personalmente, fuiste mi mayor pilar de apoyo en los momentos más difíciles de mi carrera, quien me motivaba a seguir adelante y con quien viví los momentos más bonitos de mi vida, hiciste de esta etapa de las más memorables de mi existencia, gracias por tanto.

A todos mis amigo(a)s, compañero(a)s y docentes que conocí a través de la carrera, gracias por todos los grandes momentos, todas las risas y aprendizajes, atesoro cada momento en mi corazón, gracias por acompañarme a través de mi formación.

David Santiago Diaz Marquez

Dedicatoria

Primeramente, a Dios, por darme la oportunidad de llegar hasta este momento, por concederme salud, fortaleza y las capacidades necesarias para culminar mi formación académica y el desarrollo de este proyecto.

A mis padres, por su amor incondicional, por su apoyo constante a lo largo de todo este proceso y por estar siempre presentes, dispuestos a escucharme y acompañarme en cada decisión.

A mi hermana, por ofrecerme siempre su ayuda, su compañía y una mano amiga cuando más lo necesité.

A mi pareja, por caminar conmigo en esta etapa, por compartir cada momento y por ser un apoyo fundamental en todo el camino.

A mis amigos, quienes me han acompañado durante este recorrido, por sus palabras de ánimo, por su compañía y por brindarme apoyo cuando más lo requerí. Gracias por ser parte de este logro.

Sebastian Carvajal Jaimes

Agradecimientos

Al profesor Luis Javier López Giraldo, por brindarnos la oportunidad de desarrollar este proyecto, por su constante apoyo y por el seguimiento permanente durante todo su proceso.

A Yuli Sandrith, por su acompañamiento continuo, por guiarnos en cada etapa del trabajo y por compartir generosamente sus conocimientos.

Al Grupo de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA), por su respaldo en la ejecución de las pruebas experimentales. A todos los profesionales del grupo por su amabilidad y disposición permanente para ayudarnos. Un agradecimiento especial al profesor Carlos Muvdi por permitirnos llevar a cabo pruebas necesarias para nuestro proyecto.

Al proyecto “Desarrollo de una harina vegetal fortificada con hierro obtenido del procesamiento enzimático controlado de la sangre de bovino, como futura estrategia para aumentar la disponibilidad de hierro hemínico en la dieta de las familias con niños menores de 5 años del departamento de Boyacá” por su aporte financiero que hizo posible el desarrollo de este trabajo.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Objetivos.....	16
1.1 Objetivo General.....	16
1.2 Objetivos Específicos.....	16
2. Estado del arte.....	17
3. Metodología	20
3.1 Materiales.....	20
3.2 Etapa 1. Formulación de los liposomas con hidrolizados de sangre bovina.....	21
3.2.1 Actividad 1. Preparación de los liposomas con hidrolizado de sangre bovina.....	21
3.2.2 Actividad 2. Prueba de estabilidad: método espectrofotométrico	23
3.2.3 Actividad 3. Eficiencia de encapsulación	24
3.2.4 Actividad 4. Selección de formulaciones.....	24
3.3 Etapa 2. Caracterizaciones fisicoquímicas de los liposomas.....	25
3.3.1 Actividad 1. Análisis de color.....	25
3.3.2 Actividad 2. Determinación del potencial Z y tamaño de partícula	27
3.4 Etapa 3. Bioaccesibilidad de los liposomas	27
3.4.1 Actividad 1. Digestión in vitro.....	28
3.4.2 Actividad 2. Porcentaje de hierro liberado	29
3.5 Análisis estadístico.....	29
4. Resultados y Discusión.....	30
4.1 Etapa 1: Evaluación de las formulaciones	30

4.1.1 Estabilidad estérica	30
4.1.2 Eficiencia de encapsulación.....	32
4.1.3 Selección de formulaciones	35
4.2 Etapa 2: Caracterización fisicoquímica de las formulaciones seleccionadas	36
4.2.1 Análisis de color	36
4.2.2 Tamaño de partícula.....	39
4.2.3 Potencial Z	41
4.3 Etapa 3: Bioaccesibilidad de liposomas con hidrolizado de sangre bovina.....	44
5. Conclusiones.....	47
Referencias Bibliográficas	49
Apéndices.....	54

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Diseño del Experimento para la Formulación de Liposomas</i>	22
Tabla 2. <i>Condiciones de digestión in vitro según el protocolo INFOGEST</i>	27
Tabla 3. <i>Resultado de la matriz de ponderación</i>	35
Tabla 4. <i>Color, componentes del espacio de color CIELab (L, a* y b*) y diferencia de color (ΔE) para las formulaciones con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante</i>	37

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Montaje experimental, análisis de color</i>	26
Figura 2. <i>Absorbancia de los liposomas formulados con Tween 80 y Brij L23 usando 3 relaciones molares de surfactante/lecitina de soya</i>	31
Figura 3. <i>Eficiencia de encapsulación de los liposomas formulados con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante</i>	33
Figura 4. <i>Tamaño de partícula de los liposomas formulados con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante usando el nivel 2 de la relación molar surfactante/lecitina de soya</i>	40
Figura 5. <i>Potencial Z de los liposomas formulados con Tween 80 (0,2 mol surfactante/mol lecitina), Brij L 23 (0,05 mol surfactante/mol lecitina) y sin surfactante</i>	42
Figura 6. <i>Porcentaje de bioaccesibilidad de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante</i>	45

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. <i>Resultados del análisis ANOVA para la absorbancia de liposomas formulados con Tween 80.</i>	54
Apéndice B. <i>Resultados del análisis ANOVA para la absorbancia de liposomas formulados con Brij L 23.</i>	54
Apéndice C. <i>Resultados del análisis ANOVA para la absorbancia de liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	54
Apéndice D. <i>Resultados del análisis ANOVA para la eficiencia de encapsulación de liposomas formulados con Tween 80.</i>	55
Apéndice E. <i>Resultados del análisis ANOVA para la eficiencia de encapsulación de liposomas formulados con Brij L 23.</i>	55
Apéndice F. <i>Resultados del análisis ANOVA para la eficiencia de encapsulación de liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	55
Apéndice G. <i>Resultados del análisis ANOVA para el Potencial Z de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	56
Apéndice H. <i>Resultados del análisis ANOVA para el Tamaño de Partícula de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	56
Apéndice I. <i>Resultados del análisis ANOVA para el componente de luminosidad (L) en el espacio de color CIELAB de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	56

Apéndice J. <i>Resultados del análisis ANOVA para el componente que representa de rojo a verde (a) en el espacio de color CIELAB de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	57
Apéndice K. <i>Resultados del análisis ANOVA para los valores en escala logarítmica del componente que representa de amarillo a azul (b) en el espacio de color CIELAB de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	57
Apéndice L. <i>Resultados del análisis ANOVA para la diferencia de color total de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	57
Apéndice M. <i>Resultados del análisis ANOVA para la fase bucal de las digestiones in vitro de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	58
Apéndice N. <i>Resultados del análisis ANOVA para la fase gástrica de las digestiones in vitro de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	58
Apéndice O. <i>Resultados del análisis ANOVA para la fase intestinal de las digestiones in vitro de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	58
Apéndice P. <i>Resultados del análisis ANOVA para la digestión in vitro (todas las fases) de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.</i>	59

Resumen

Título: Encapsulación de hidrolizados de sangre bovina utilizando liposomas: Evaluación de la formulación y propiedades fisicoquímicas.*

Autor: David Santiago Diaz Marquez, Sebastian Carvajal Jaimes**

Palabras Clave: Liposomas, Hidrolizado de sangre bovina, Bioaccesibilidad, Estabilidad estérica, Potencial Z, Tamaño de partícula

Descripción: La deficiencia de hierro es una de las problemáticas nutricionales más relevantes a nivel mundial, especialmente en países en vía de desarrollo. Frente a esta situación, los hidrolizados de sangre bovina representan una solución prometedora debido a su elevado contenido de hierro hemo. Con el fin de proteger este compuesto y favorecer su liberación controlada, los hidrolizados se encapsulan en liposomas. Estas formulaciones se pueden preparar mediante distintos métodos e incorporar surfactantes. Sin embargo, el tipo de tensioactivo y la cantidad usada pueden modificar de manera significativa las propiedades de los liposomas. Por ello, este estudio evalúa el efecto de la relación molar (tensioactivo/material de pared) y del tipo de surfactante sobre la formulación de liposomas que encapsulan hidrolizados de sangre bovina. Los liposomas se prepararon siguiendo el método de hidratación de la película delgada, empleando lecitina de soya y los surfactantes Tween 80 (T80) y Brij L 23 (BL23). Los resultados mostraron que los liposomas formulados con surfactante obtuvieron mayor estabilidad estérica que aquellas sin surfactante. La eficiencia de encapsulación fue de 95,88% para los liposomas sin surfactante, entre 93,35% y 67,14% para los formulados con T80 y, para los que incorporaron BL23, entre 89,47% y 68,74%. El tamaño de partícula osciló entre 716,17 nm (Sin surfactante) a 130,77 nm (con T80) y el potencial Z entre -47,7 mV (Sin surfactante) a -27,23 mV (con T80). Los liposomas formulados con BL23 obtuvieron el mayor porcentaje de bioaccesibilidad con un 98,53%, seguido del T80 con 90,55% y por último la formulación sin surfactante con 66,8%. En conclusión, el tipo y la concentración de surfactante influyen de manera significativa en las propiedades fisicoquímicas de los liposomas, evidenciándose que las formulaciones que incorporan surfactante presentan características superiores en comparación con aquellas que no lo incluyen.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Director: Luis Javier López Giraldo, Ing. Químico, PhD. Química Bioquímica y ciencia de alimentos. Codirector: Yuli Sandrith Rojas Ardila, Ing. Química.

Abstract

Title: Encapsulation of bovine blood hydrolysates using liposomes: Evaluation of formulation and physicochemical properties. *

Author(s): David Santiago Diaz Marquez, Sebastian Carvajal Jaimes**

Key Words: Liposomes, Bovine blood hydrolysate, Bioaccessibility, Steric stability, Z potential, Particle size

Description: Iron deficiency is one of the most significant nutritional problems worldwide, especially in developing countries. In light of this situation, bovine blood hydrolysates represent a promising solution due to their high heme iron content. In order to protect this compound and promote its controlled release, the hydrolysates are encapsulated in liposomes. These formulations can be prepared using different methods and incorporating surfactants. However, the type of surfactant and the amount used can significantly modify the properties of the liposomes. Therefore, this study evaluates the effect of the molar ratio (surfactant/wall material) and the type of surfactant on the formulation of liposomes that encapsulate bovine blood hydrolysates. The liposomes were prepared using the thin film hydration method, employing soy lecithin and the surfactants Tween 80 (T80) and Brij L 23 (BL23). The results showed that liposomes formulated with surfactant obtained greater steric stability than those without surfactant. The encapsulation efficiency was 95.88% for liposomes without surfactant, between 93.35% and 67.14% for those formulated with T80, and between 89.47% and 68.74% for those incorporating BL23. The particle size ranged from 716.17 nm (without surfactant) to 130.77 nm (with T80) and the Z potential from -47.7 mV (without surfactant) to -27.23 mV (with T80). The liposomes formulated with BL23 obtained the highest percentage of bioaccessibility with 98.53%, followed by T80 with 90.55% and finally the formulation without surfactant with 66.8%. In conclusion, the type and concentration of surfactant significantly influence the physicochemical properties of liposomes, showing that formulations incorporating surfactant have superior characteristics compared to those that do not include it.

* Degree Work

**Faculty of Physical-Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Center for Research in Food Science and Technology. Director: Luis Javier López Giraldo, Chemical Engineer, PhD. Biochemical Chemistry and Food Science. Codirector: Yuli Sandrith Ardila, Chemical Engineer.

Introducción

La deficiencia de hierro constituye uno de los problemas nutricionales de mayor prevalencia a nivel mundial, con impacto particular en grupos poblacionales vulnerables como niños y mujeres en edad reproductiva. Esta problemática se agudiza en los países en vías de desarrollo, donde los patrones dietarios suelen estar basados en cereales y legumbres, alimentos que aportan principalmente hierro no hemo, caracterizado por su baja biodisponibilidad (Ngui et al., 2012). El hierro hemo corresponde a una forma de hierro ligada a estructuras proteicas como la hemoglobina y la mioglobina, presentes en alimentos de origen animal (principalmente carne, pescado y vísceras), y se distingue por su mayor bioaccesibilidad, es decir, por presentar tasas de absorción intestinal significativamente superiores en comparación con el hierro no hemo (Kalman et al., 2025), el cual se encuentra principalmente en alimentos vegetales. La insuficiencia de este micronutriente no solo compromete el desarrollo físico y cognitivo, sino que también incrementa la susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas y reduce la productividad laboral, por lo que su estudio se considera una prioridad en salud pública (Ngui et al., 2012).

Ante este panorama, resulta fundamental identificar fuentes accesibles y sostenibles de hierro hemo que permitan atender la alta prevalencia de anemia. Una de las alternativas más prometedoras es la sangre bovina, un subproducto de la industria cárnica que destaca por su elevado contenido de hemoglobina y, por ende, de hierro hemo. Su aprovechamiento no solo responde a criterios de eficiencia nutricional, sino también a la necesidad de valorizar residuos agroindustriales. Además, el empleo de hidrolizados de sangre bovina permite mejorar la funcionalidad y estabilidad de los compuestos derivados de la hemoglobina, ya que la hidrólisis enzimática produce péptidos de bajo peso molecular con propiedades biológicas relevantes, entre ellas capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana (Outman et al., 2023).

La encapsulación de hidrolizados de sangre bovina es una estrategia tecnológica promisorias, ya que protege el hierro hemo frente a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y favorece su estabilidad y liberación controlada en el sitio de absorción. (Liu et al., 2022). Además, contribuye a reducir el sabor metálico característico del hierro, lo que mejora su aceptabilidad sensorial y aumenta las posibilidades de incorporación en formulaciones alimenticias. En este contexto, los liposomas representan un sistema eficiente para tal propósito, pues son vesículas esféricas de tamaño reducido formadas a partir del autoensamblaje de fosfolípidos capaces de encapsular compuestos bioactivos (Nsairat et al., 2022). Asimismo, la incorporación de surfactantes contribuye a mejorar la estabilidad fisicoquímica de los liposomas, ya que reduce la agregación de partículas, limita la fuga del material encapsulado y preserva la integridad estructural de la vesícula (Sopyan et al., 2020).

Sin embargo, características como la estabilidad estérica, la eficiencia de encapsulación, las propiedades fisicoquímicas y la bioaccesibilidad de los liposomas se encuentran fuertemente condicionadas por la formulación, especialmente por el tipo de surfactante empleado, su concentración y la relación molar establecida con el material de pared (Tasi et al., 2003a). En este sentido, surfactantes como Tween® 80 (Polisorbato-80) y Brij® L23 (Laureth-23) han demostrado modificar parámetros críticos como el tamaño de partícula, potencial Z, estabilidad coloidal y eficiencia de encapsulación, lo que evidencia su relevancia en el diseño de sistemas liposomales funcionales (Ding et al., 2009) (Valdés et al., 2023).

Considerando lo expuesto previamente, el presente trabajo plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo influyen el tipo de surfactante y la relación molar (tensioactivo/material de pared) en la formulación, sobre las propiedades fisicoquímicas y la bioaccesibilidad de liposomas que encapsulan hidrolizado de sangre bovina?

Este estudio busca desarrollar formulaciones liposomales con potencial de aplicación en las industrias alimentaria y farmacéutica, orientadas al diseño de alimentos funcionales y nutracéuticos. Al mismo tiempo, los resultados contribuirán a consolidar el conocimiento científico en el campo de la nanotecnología de alimentos y a fortalecer la línea de investigación en alimentos funcionales del grupo CICTA. De igual forma, el trabajo está alineado con los Objetivos de Desarrollo Sostenible relacionados con la salud y el bienestar (ODS 3), así como con la producción y consumo responsables mediante el aprovechamiento de residuos agroindustriales (ODS 12).

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la relación molar (tensioactivo/material de pared) y el tipo de surfactante sobre la formulación de liposomas que encapsulan hidrolizados de sangre bovina.

1.2 Objetivos Específicos

Determinar la estabilidad estérica y eficiencia de encapsulación de las formulaciones de liposomas con hidrolizado de sangre bovina en función de la relación molar (tensioactivo/material de pared) y el tipo de surfactante.

Caracterizar las formulaciones en términos de color, tamaño de partícula y potencial zeta.

Determinar el porcentaje de bioaccesibilidad del hierro encapsulado en liposomas bajo condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*.

2. Estado del arte

Los liposomas se han consolidado como una de las plataformas más versátiles dentro de la nanotecnología aplicada al campo de los alimentos y los sistemas de liberación controlada. Estas vesículas esféricas, formadas por una o varias bicapas fosfolipídicas que encierran un compartimento acuoso, poseen la capacidad de encapsular tanto compuestos hidrofílicos como lipofílicos debido a su naturaleza anfifílica, lo que las hace especialmente útiles para proteger y vehicular nutrientes sensibles (Dhillon et al., 2024). Existen cuatro tipos de liposomas según su morfología o laminaridad: vesículas unilaminares (ULV), vesículas oligolamelares (OLV), vesículas multilaminares (MLV) y liposomas multivesiculares (MVL). Los tres primeros se caracterizan por poseer un único núcleo acuoso, sin embargo, los ULV están formados únicamente por una bicapa lipídica, caso contrario a los OLV (2-5 bicapas) y MLV (>5 bicapas). Los MVL se distinguen de los demás ya que dentro de su estructura poseen múltiples núcleos acuosos delimitados por una sola bicapa lipídica (Liu et al., 2022).

En este marco, la estabilidad estérica constituye un factor determinante para la persistencia y homogeneidad de las formulaciones liposomales. Este tipo de estabilización se basa en la adsorción de macromoléculas o surfactantes no iónicos sobre la superficie de las vesículas, donde generan una capa hidratada protectora que evita la agregación por repulsión espacial y efectos entrópicos (Victor M. Starov, 2010). En sistemas que incorporan surfactantes como Tween 80 o Brij L23, las cadenas hidrofílicas del surfactante se orientan hacia el medio acuoso, formando una barrera flexible que preserva la integridad de la vesícula y mejora su estabilidad coloidal (Hara et al., 1997; Kronberg et al., 1990). Comprender este fenómeno es esencial para interpretar la influencia de los tensioactivos sobre las propiedades estructurales y funcionales de las formulaciones liposomales.

Por su parte, la bioaccesibilidad se define como la fracción de un compuesto que es liberada de su matriz durante la digestión gastrointestinal y se vuelve potencialmente disponible para su absorción intestinal (Fernández-García et al., 2009). Este parámetro constituye la primera etapa del proceso de biodisponibilidad y depende de fenómenos de liberación, solubilización y micelización que determinan la cantidad de nutriente efectivamente disponible para su absorción. Su evaluación mediante modelos de digestión *in vitro* permite estimar la eficiencia de las estrategias de encapsulación en la protección y liberación de compuestos bioactivos, lo cual resulta esencial en el diseño de sistemas nutracéuticos orientados a mejorar la disponibilidad biológica del hierro hemo (W. Liu et al., 2013; Valdés et al., 2023).

A partir de estas consideraciones, investigaciones recientes han explorado diferentes fuentes de hierro, condiciones de formulación y estrategias de caracterización de liposomas para evaluar su aplicabilidad como sistemas de liberación. Uno de los estudios más relevantes en esta área es el de Valdés et al. (2023), quienes investigaron la encapsulación de eritrocitos bovinos atomizados en liposomas como fuente de hierro hemo para su uso en suplementación oral. Su metodología incluyó la atomización de los eritrocitos, seguido de su encapsulación en liposomas utilizando el método de evaporación de la película seguido de ultrasonido. En este estudio se evaluó el efecto de variar la relación volumétrica entre lecitina de soya y el surfactante Tween 80. Los liposomas con hierro presentaron un tamaño que osciló entre 350 y 960 nm. Se observó que, al aumentar el tiempo del baño ultrasónico, el tamaño disminuía significativamente. Además, estos liposomas exhibieron un potencial Z superior a -56 mV, lo que garantiza su estabilidad, ya que se considera que valores mayores de -30 mV generan suficiente repulsión electrostática para evitar la agregación. La cantidad de hierro encapsulado varió entre 0,8 y 9,0 mg por 100 mL, con una eficiencia de encapsulación que osciló entre el 29 y el 48 por ciento. Respecto a la digestión *in*

vitro, los autores observaron que los liposomas permanecían ampliamente estables en el entorno gástrico, liberando menos del 20% del hierro encapsulado, mientras que la desestabilización inducida por sales biliares y enzimas pancreáticas en la fase intestinal favoreció una liberación superior al 80%, concentrando así la disponibilidad del hierro hemo en el tramo donde fisiológicamente ocurre su absorción (W. Liu et al., 2013; Valdés et al., 2023).

La incorporación de surfactantes no iónicos en la formulación de liposomas modifica la organización de la bicapa lipídica al insertarse entre los fosfolípidos, lo cual puede reducir la turbidez, disminuir el tamaño hidrodinámico de las vesículas y favorecer la dispersión coloidal (Saesoo et al., 2010) . Sin embargo, la bibliografía evidencia que estos efectos se producen únicamente dentro de un rango de concentraciones: a bajas proporciones, el surfactante contribuye a la estabilización estérica, mientras que un exceso conduce a la desorganización de la membrana y a la formación de micelas mixtas que comprometen la retención del nutriente. En este sentido, Xia et al. (2005) compararon diferentes métodos de preparación de liposomas, entre ellos la hidratación de la película delgada, la evaporación de fase reversa, la sonicación y el congelamiento-descongelamiento. El método de evaporación de fase reversa permitió alcanzar la mayor eficiencia de encapsulación, con un valor del 67%. Al evaluar el efecto del surfactante Tween 80 sobre la estabilidad física de los liposomas, midieron la turbidez a 500 nm como indicador indirecto del tamaño de partícula. Sus resultados mostraron que al incrementar la relación molar Tween 80/material de pared desde 0 hasta 0,2, la turbidez disminuyó significativamente, lo que evidencia una reducción en el tamaño de las vesículas liposomales atribuible al aumento de la repulsión estérica. Para relaciones intermedias entre 0,2 y 0,8, la turbidez se mantuvo prácticamente constante, sugiriendo un umbral de saturación en el cual la adición de surfactante ya no genera cambios sustanciales en el tamaño. Sin embargo, a

concentraciones superiores a 0,8, se observó una disminución abrupta de la turbidez, atribuida a la desestabilización estructural de las vesículas y su transformación en micelas mixtas, lo que compromete la integridad del sistema (Xia & Xu, 2005). Estos hallazgos refuerzan la importancia de determinar con precisión la cantidad de surfactante en relación con el lípido estructural para modular adecuadamente el tamaño y la estabilidad de los liposomas en las formulaciones.

Considerando los antecedentes presentados, este trabajo de investigación busca aportar al estudio de la formulación de liposomas de hierro hemo encapsulando hidrolizados de sangre bovina, variando la relación molar de lecitina de soya y dos tipos de surfactantes, con el fin de mejorar la estabilidad estérica, las propiedades fisicoquímicas y la bioaccesibilidad. De este modo, los resultados obtenidos podrán contribuir al desarrollo de alimentos funcionales o nutracéuticos dirigidos a combatir la problemática de la deficiencia de hierro.

3. Metodología

3.1 Materiales

Para la formulación de los liposomas se empleó lecitina de soya líquida (Brymar S.A.S., Bogotá, Colombia) como material de pared. Los surfactantes utilizados fueron Tween 80 (Polisorbato 80, Merck, Alemania) y Brij L23 (Laureth-23, Sigma-Aldrich, EE. UU.), ambos de grado analítico. El hidrolizado de sangre bovina, utilizado como fuente de hierro hemo, fue suministrado por el Laboratorio 405 adscrito al Grupo de Investigación CICTA. Como solvente orgánico para la disolución de la lecitina se empleó cloroformo ($\geq 99,8$ %, Merck, Alemania), mientras que la fase acuosa se preparó con solución amortiguadora PBS (pH 7.3).

Para los ensayos de digestión *in vitro*, las enzimas y reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (EE. UU.), todos de grado biológico: α -amilasa (de páncreas porcino), pepsina (de mucosa

gástrica porcina), pancreatina (de páncreas porcino) y sales biliares (porcinas). Las soluciones de HCl 5 M y NaOH 5 M fueron preparadas en el laboratorio a partir de reactivos concentrados de grado analítico. Los fluidos simulados salival (SSF), gástrico (SGF) e intestinal (SIF) se elaboraron siguiendo las especificaciones y composiciones establecidas en el protocolo INFOGEST (Brodkorb et al., 2019), utilizando los reactivos descritos en dicho método estandarizado.

Finalmente, para la manipulación y análisis de las muestras se emplearon tubos Falcon (50 mL, Corning, EE. UU.), tubos Eppendorf (1,5 mL, Eppendorf AG, Alemania) y filtros de jeringa PVDF (0,45 μm , Millipore, EE. UU.). Todos los materiales y reactivos se utilizaron sin purificación adicional y fueron almacenados bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

3.2 Etapa 1. Formulación de los liposomas con hidrolizados de sangre bovina

3.2.1 Actividad 1. Preparación de los liposomas con hidrolizado de sangre bovina

Para la preparación de las formulaciones liposomales se empleó un diseño experimental factorial completo 2×3 con réplicas, en el cual se evaluaron dos factores: el tipo de surfactante (Tween 80 y Brij L23) y la relación molar entre surfactante y material de pared (lecitina de soya). Cada factor se estudió en tres niveles de concentración, definidos como bajo, medio y alto (niveles 1, 2 y 3, respectivamente), adicionalmente se incluyó una formulación control (nivel 0), correspondiente a liposomas sin surfactante (ver Tabla 1). Es importante señalar que las concentraciones seleccionadas para Tween 80 y Brij L23 no fueron equivalentes entre sí, ya que se establecieron con base en reportes de la literatura científica (Arciniegas et al., 2019; Fazel et al., 2018; Xia & Xu, 2005). Cada tratamiento experimental fue realizado por duplicado, incluyendo el control, lo que dio un total de 14 corridas.

Tabla 1*Diseño del Experimento para la Formulación de Liposomas*

Surfactante	Experimento	Nivel	Surfactante/lecitina de soya [mol/mol]
Control	C1 C1-R	0	0
Tween 80	T1 T1-R	1	0,1
Tween 80	T2 T2-R	2	0,2
Tween 80	T3 T3-R	3	0,3
Brij L23	B1 B1-R	1	0,03
Brij L23	B2 B2-R	2	0,05
Brij L23	B3 B3-R	3	0,08

Se preparó la fase orgánica disolviendo lecitina de soya en cloroformo siguiendo la relación 23 mg lecitina/mL solvente (Skalko-Basnet et al., 2000), la mezcla se homogeneizó en una plancha de agitación magnética (Stirrer 728, Metrohm) a 3.000 rpm durante 5 min, y posteriormente se sometió a cizallamiento elevado en ULTRA-TURRAX a 20.000 rpm por 2 min (Toro-Urbe et al., 2018), para formación de película delgada se evaporó la solución orgánica mediante rotaevaporación, operando a 40 °C (baño térmico), 6 °C (serpentín de condensación), 300 mbar, y 70 rpm durante 1 hora;

En paralelo, se formuló la solución hidratante con PBS (pH 7,3) (45 mg lecitina/mL PBS) (Olson et al., 1979) e hidrolizados de sangre bovina (2 mg lecitina/mg hidrolizado) (Arifin & Palmer, 2003). A esta fase acuosa se incorporó el surfactante correspondiente (Tween 80 o Brij

L23) según el tipo y la relación molar definida en el diseño experimental (ver Tabla 1), manteniendo agitación magnética a 3.000 rpm durante 30 min. La hidratación de la película delgada se efectuó primeramente en el rotaevaporador, operando a 200 rpm con baño a 37 °C durante 25 minutos (Olson et al., 1979), posteriormente se aplicó agitación magnética a 3.000 rpm por 30 min (Valdés et al., 2023).

Finalmente, el tamaño vesicular se redujo y homogeneizó mediante sonicación mediante sonda ultrasónica (Vibra-Cell, Sonics & Materials Inc., EE. UU.), manteniendo la muestra en baño a 8 °C se aplicaron pulsos de 10 segundos encendido / apagado durante 15 min, con una amplitud de 75 % (Toro-Uribe et al., 2018).

3.2.2 Actividad 2. Prueba de estabilidad: método espectrofotométrico

La estabilidad estérica de las formulaciones liposomales, tanto con surfactante como el control sin surfactante, se evaluó mediante turbidez mediante espectrofotometría UV-Vis. Para este análisis, se utilizó una longitud de onda de 640 nm, correspondiente a la absorbancia característica del hierro hemo (Oshima, 1997).

Se prepararon diluciones de cada formulación (ver Tabla 1) liposomas: Agua tipo 1 con un factor 1:4 (v/v). Una vez cargada, la microplaca se colocó en el espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC 96 and 384-well Plate Microplate Photometers), donde se registraron las lecturas de absorbancia a 640 nm para cada pocillo. Los valores obtenidos se recopilaron y, posteriormente, se calcularon los promedios de absorbancia por tratamiento, los cuales fueron empleados como medida indirecta del tamaño de partícula y estabilidad estérica de los liposomas. En este contexto, valores de absorbancia más bajos se interpretaron como indicativos de partículas de menor tamaño y mayor estabilidad coloidal (Xia & Xu, 2005b).

3.2.3 Actividad 3. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación de los hidrolizados de sangre bovina en los liposomas se determinó siguiendo la metodología propuesta por Toro-Uribe et al. (2018). Para el procedimiento, se pesaron 5 g de cada formulación de liposomas en tubos de microcentrífuga, los cuales fueron sometidos a ultracentrifugación (Sorvall WX Ultra Series, modelo WX80, Thermo Fisher Scientific, Japón) a 50.000 rpm, durante 2 horas a 4 °C, con el fin de separar las vesículas liposomales del medio externo (Toro-Uribe et al., 2018). Posteriormente, se recuperó cuidadosamente 1 mL del sobrenadante de cada muestra centrifugada, evitando la perturbación del sedimento liposomal.

El contenido de hierro se cuantificó mediante el método de espectroscopía de absorción atómica de llama asistida por digestión en microondas, siguiendo el protocolo estandarizado por el CICTA. Para ello, se determinaron dos fracciones: el hierro total (H_T) (mg de Fe/100 g de liposomas), correspondiente a las suspensiones liposomales sin centrifugar, y el hierro superficial (H_S) (mg de Fe/100 g de liposomas), presente en los sobrenadantes recuperados tras la centrifugación. A partir de estos valores, se calculó la eficiencia de encapsulación (EE%) como el porcentaje de hierro encapsulado dentro de los liposomas en relación con el contenido total de hierro en la formulación.

$$EE\% = \frac{H_T - H_S}{H_T} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

3.2.4 Actividad 4. Selección de formulaciones

Para identificar las formulaciones con mejor desempeño global, se aplicó una matriz de ponderación basada en dos criterios: estabilidad estérica (evaluada mediante absorbancia) y eficiencia de encapsulación (%EE). Ambos criterios se consideraron de igual importancia dentro del proceso de selección; por lo tanto, cada uno recibió un peso del 50 % en el cálculo final.

Antes de la ponderación, los valores de absorbancia y %EE fueron normalizados a una escala común de 0 a 1 para permitir su comparación directa. Dado que cada parámetro refleja el desempeño de forma diferente, la normalización se ajustó a su criterio de calidad específico: Para la eficiencia de encapsulación, donde valores más altos representan un mejor desempeño, se empleó una normalización directa, donde 1 representa el valor de %EE más alto y 0 el más bajo.

$$EE_{Normalizada} = \frac{\%EE_i - \%EE_{min}}{\%EE_{max} - \%EE_{min}} \quad (\text{Ec.2})$$

El análisis tuvo como propósito seleccionar las formulaciones con mayor estabilidad y potencial de aplicación: una con Tween 80 y otra con Brij L23. Para ello, se empleó una matriz de ponderación en la que la eficiencia de encapsulación y la estabilidad estérica recibieron el mismo peso, dado que ambas variables son críticas y complementarias para el funcionamiento del sistema liposomal. La eficiencia de encapsulación garantiza la adecuada incorporación del hidrolizado, mientras que la estabilidad coloidal asegura que la dispersión se mantenga homogénea en el tiempo, evitando agregación o sedimentación (Kronberg et al., 1990).

3.3 Etapa 2. Caracterizaciones fisicoquímicas de los liposomas

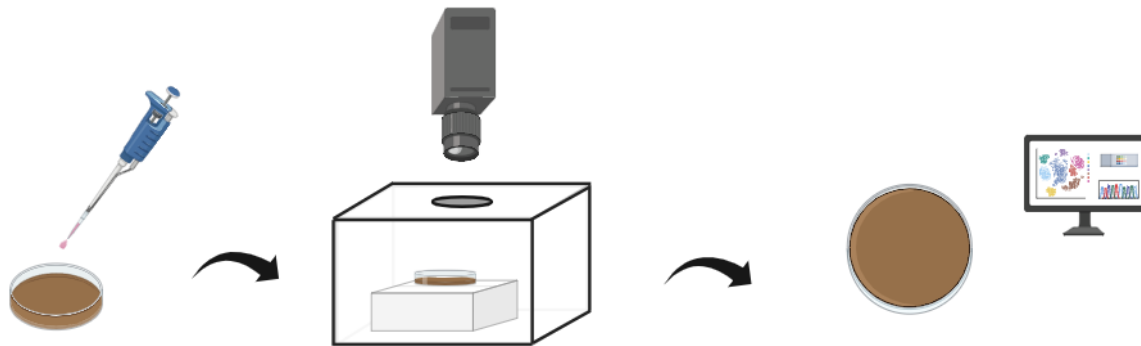
3.3.1 Actividad 1. Análisis de color

Para evaluar la diferencia de color entre los hidrolizados de sangre bovina y los liposomas formulados con Tween 80, Brij L23 y sin surfactante, se depositaron 10 mL de muestra en una placa Petri, empleando para ello una micropipeta de 5 mL (Toro-Uribe et al., 2018). Posteriormente, cada muestra se colocó en el interior de una caja de luz (estructura blanca con iluminación homogénea mediante tiras LED de luz blanca y un orificio circular superior destinado

a la cámara fotográfica), tal como se muestra en la Figura 1. En estas condiciones controladas, se procedió a la captura de la imagen digital.

Figura 1

Montaje experimental, análisis de color



Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU.) siguiendo un procedimiento estandarizado de análisis de color: Inicialmente, las fotografías se convirtieron al espacio de color CIELab, lo que permitió extraer los valores de luminosidad (L^*), componente rojo-verde (a^*) y componente amarillo-azul (b^*) de cada muestra. Estos parámetros se utilizaron para calcular la diferencia total de color (ΔE) entre el hidrolizado y las formulaciones liposomales, empleando la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde L_1^*, a_1^*, b_1^* corresponden a los valores del hidrolizado y L_2^*, a_2^*, b_2^* a los de cada formulación de liposomas (Valdés et al., 2023).

3.3.2 Actividad 2. Determinación del potencial Z y tamaño de partícula

El tamaño de partícula de los liposomas y su potencial Z se determinaron en un Zetasizer (Malvern Instruments, Reino Unido), el cual combina dispersión de luz dinámica (DLS) y electroforesis. Para garantizar que las muestras estuvieran dentro del rango de detección del equipo, se prepararon diluciones de liposomas: Agua tipo 1 con un factor 1:100 (v/v). Cada muestra se realizó por triplicado, y los resultados se expresaron en términos de diámetro hidrodinámico promedio (Z-average, nm) y potencial Z (mV).

3.4 Etapa 3. Bioaccesibilidad de los liposomas

La bioaccesibilidad de las formulaciones seleccionadas (control sin surfactante, Tween 80 y Brij L23) se evaluó mediante digestión *in vitro* por duplicado, usando el protocolo INFOGEST con algunas modificaciones (Brodkorb et al., 2019). Este enfoque reproduce las condiciones gastrointestinales humanas a través de tres fases secuenciales de digestión (oral, gástrica e intestinal) utilizando fluidos simulados estándar. En la Tabla 2 se resumen los parámetros específicos de cada etapa digestiva.

Tabla 2

Condiciones de digestión in vitro según el protocolo INFOGEST

Fase	Fluido simulado	Enzimas añadidas	pH	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación
Oral	SSF (fluido salival simulado)	α -amilasa	7	37 °C	2 min
Gástrica	SGF (fluido gástrico simulado)	Pepsina	3	37 °C	2 h
Intestinal	SIF (fluido intestinal simulado)	Pancreatina + sales biliares	7	37 °C	2 h

Nota. Se empleó una Incubadora Shaker (BSI-2, BOECO®, Germany) a 280 rpm

Durante las fases gástrica e intestinal, se realizó un control del pH con el fin de mantener las condiciones fisiológicas simuladas (ver Tabla 2). Para ello, se efectuaron mediciones cada 15

minutos, realizando los ajustes necesarios mediante la adición de soluciones de HCl 5 M o NaOH 5 M, según correspondiera. Este procedimiento se llevó a cabo empleando un titulador potenciométrico automático avanzado (HI 932, Hanna Instruments®, USA)

3.4.1 Actividad 1. Digestión *in vitro*

Para la preparación de las muestras destinadas a la digestión *in vitro*, se tomaron 4 g de cada formulación liposomal y se depositaron en tubos Falcon para su posterior incubación. Las muestras se dividieron en tres grupos experimentales de acuerdo con la fase de la digestión: oral, gástrica o intestinal. Aquellas destinadas al análisis en la fase oral fueron incubadas únicamente en esta etapa y, al finalizar, se transfirieron inmediatamente a un baño helado (4 °C, 15 min) para detener la actividad enzimática. Las muestras correspondientes a la fase gástrica atravesaron primero la fase oral e ingresaron a la fase gástrica; al concluir esta etapa, se sometieron al mismo procedimiento de enfriamiento. Finalmente, las muestras asignadas a la fase intestinal pasaron de manera secuencial por las fases oral y gástrica, continuando hasta completar la intestinal. Una vez finalizada esta última etapa, se procedió a detener la actividad enzimática mediante enfriamiento.

En todos los casos, después del enfriamiento, las digestas fueron centrifugadas en una microcentrífuga (Prism High Speed Centrifuge, modelo C2500, Labnet, México) a 20.000 rpm durante 20 min (Toro-Uribe et al., 2018), Luego se recuperó cuidadosamente el sobrenadante y se filtró usando filtros PVDF de 0,45 µm, con el fin de eliminar posibles liposomas o partículas insolubles. Finalmente, los sobrenadantes filtrados se almacenaron en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su análisis de hierro por espectroscopía de absorción atómica, de acuerdo con el protocolo estandarizado del CICTA.

3.4.2 Actividad 2. Porcentaje de hierro liberado

El porcentaje de hierro liberado se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hierro liberado} = \frac{C_{TH_{Digesta}}}{C_{TH_i}} * 100 \quad (\text{Ec.4})$$

Donde $C_{TH_{Digesta}}$ es la cantidad total de hierro de la muestra al final de cada una de las fases de la digestión *in vitro* (oral, gástrica e intestinal) y C_{TH_i} es la cantidad total de hierro presente en las formulaciones antes de la digestión (Toro-Urbe et al., 2018). Es importante resaltar que el porcentaje de hierro liberado durante la fase intestinal de la digestión *in vitro* se define como el porcentaje de bioaccesibilidad.

3.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de la metodología fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Para ello, se elaboraron matrices independientes para cada conjunto de datos evaluado: estabilidad estérica, eficiencia de encapsulación, color, tamaño de partícula, potencial Z y bioaccesibilidad. Además, se aplicó una prueba post hoc, específicamente la prueba de Tukey, con el fin de identificar qué grupos dentro de cada matriz presentaban diferencias estadísticamente significativas.

4. Resultados y Discusión

4.1 Etapa 1: Evaluación de las formulaciones

4.1.1 Estabilidad estérica

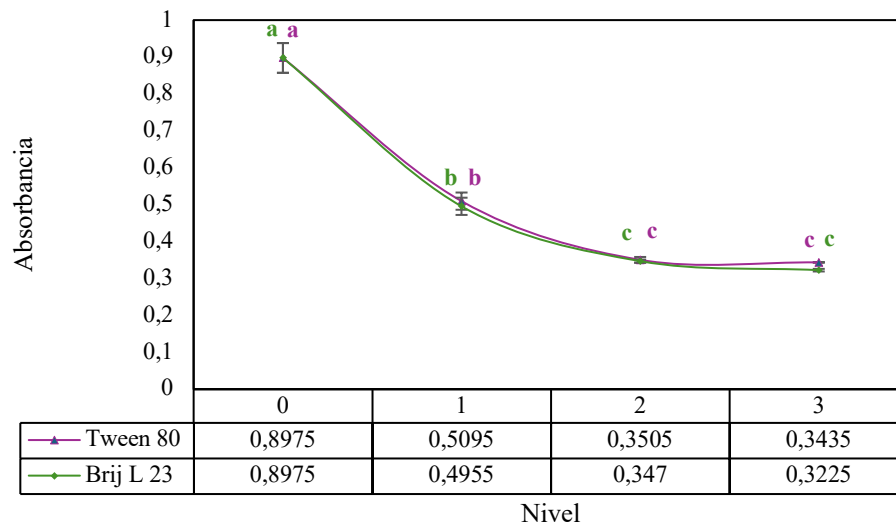
Los valores de turbidez de las formulaciones preparadas con Tween 80 y Brij L23 se presentan en la Figura 2.

En ambos casos se observa un comportamiento similar: la absorbancia más alta corresponde a la relación surfactante/lecitina de soya igual a cero (sin surfactante); posteriormente, a medida que aumenta la concentración de surfactante (mayor relación) la absorbancia disminuye y se mantiene estable en las últimas dos concentraciones evaluadas.

En los Apéndices A, B y C se pueden consultar el set de datos y los resultados ANOVA para las formulaciones con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante, de ello resulta evidente que estadísticamente no hubo diferencias significativas entre réplicas ($p > 0,05$). Este resultado demuestra que las diferencias observadas entre tratamientos pueden atribuirse principalmente a las variables evaluadas y no a errores asociados con la medición. Además, no se observan diferencias significativas entre los tipos de surfactante (Tween 80 y Brij L 23). No obstante, sí se evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$) para las primeras dos relaciones surfactante/lecitina de soya evaluadas, lo que indica que la cantidad de surfactante usada genera un efecto significativo sobre la absorbancia de las formulaciones.

Figura 2

Absorbancia de los liposomas formulados con Tween 80 y Brij L23 usando 3 relaciones molares de surfactante/lecitina de soya



Nota. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey. Las relaciones molares de surfactante/lecitina que se utilizaron para las formulaciones con Tween 80 y Brij L 23 fueron: nivel 1 (0,1 y 0,03), nivel 2 (0,2 y 0,05), nivel 3 (0,3 y 0,08), respectivamente.

El comportamiento observado en las formulaciones al aumentar la concentración de surfactante se puede explicar por medio de la repulsión estérica que experimentan los liposomas. Agregar surfactante en la fase acuosa e hidratar la película delgada, provoca que el tensioactivo se adsorba en la lámina externa de la bicapa lipídica (Xia & Xu, 2005b). De este modo, cuando los liposomas se aproximan entre ellos, se disminuye el potencial químico del agua a su alrededor lo que genera una succión osmótica del agua hacia el espacio entre las partículas, provocando así una repulsión entre los liposomas (Kronberg et al., 1990). Este efecto aporta estabilidad a las formulaciones evitando que las partículas se aglomeren, por ello, a menor absorbancia mejor es la estabilidad estérica de la formulación (menos partículas agregadas).

En los resultados presentados se observa que los valores de absorbancia obtenidos para el Tween 80 son similares a los datos recolectados para el Brij L 23. Este comportamiento puede atribuirse principalmente a que ambos surfactantes son no iónicos; por lo tanto, al adsorberse sobre la superficie de los liposomas experimentan un nivel similar de repulsión entre vesículas. Además, es importante resaltar que, según los resultados obtenidos, se pueden realizar formulaciones utilizando los niveles 1, 2 y 3 de la relación molar surfactante/lecitina de soya sin correr el riesgo de que se presenten aglomeraciones.

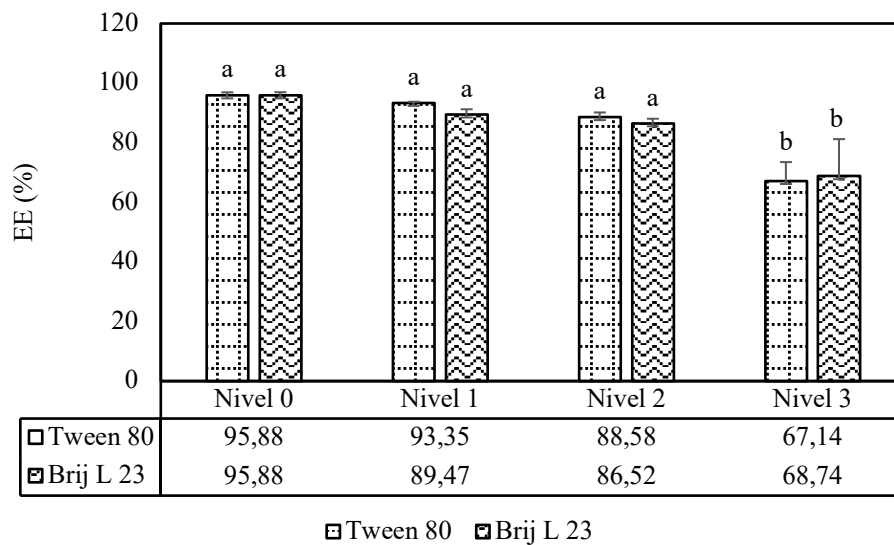
Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los reportados por Xia & Xu (2005), se observa una tendencia similar. En su investigación, la formulación sin surfactante presentó la absorbancia más alta (aproximadamente 0,5) y al incrementar la concentración de tensioactivo, entre una relación molar de 0,2 y 0,8 Tween 80/Lípido, la absorbancia no presenta cambios significativos (región estable).

4.1.2 Eficiencia de encapsulación

La Figura 3 muestra que la eficiencia de encapsulación (EE) fue elevada en todas las formulaciones, aunque con variaciones dependientes del tipo y la concentración de surfactante empleado. La formulación control alcanzó la mayor EE (95,9%), lo que indica que la matriz lipídica de lecitina de soya posee una capacidad intrínseca favorable para retener los hidrolizados de sangre bovina. La incorporación de surfactantes produjo una disminución progresiva de la EE a medida que aumentó la relación molar surfactante/lecitina: en las formulaciones con Tween 80, evaluadas en niveles 1, 2 y 3 (0,1; 0,2 y 0,3 mol/mol), los valores descendieron de 93,4% a 67,1%, mientras que con Brij L23, ensayado en niveles equivalentes (0,03; 0,05 y 0,08 mol/mol), la EE disminuyó de 89,4% a 68,7%.

Figura 3

Eficiencia de encapsulación de los liposomas formulados con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante



Nota. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey. Las relaciones molares de surfactante/lecitina que se utilizaron para las formulaciones con Tween 80 y Brij L 23 fueron: nivel 1 (0,1 y 0,03), nivel 2 (0,2 y 0,05), nivel 3 (0,3 y 0,08), respectivamente.

Si bien una explicación frecuente en la literatura atribuye este descenso a la desorganización de la bicapa y formación de micelas mixtas a altas concentraciones, un análisis más detallado sugiere un mecanismo complementario y más consistente con los datos obtenidos. Tal como reportó Valdés et al. (2023) en su estudio sobre liposomas con eritrocitos bovinos atomizados, la adición creciente de surfactantes no iónicos induce una reducción sustancial del tamaño hidrodinámico de las vesículas. Esta disminución, aunque favorece la estabilización coloidal, reduce también el volumen encapsulante disponible, lo que limita la cantidad de compuesto que puede ser alojado en el liposoma (Valdés et al., 2023). Así, la disminución de la EE observada en nuestra investigación puede explicarse no solo por efectos de disrupción estructural en niveles elevados de surfactante, sino también, por la reducción geométrica del espacio interno de las vesículas, lo que disminuye su capacidad de carga.

Este comportamiento contrasta parcialmente con lo informado por Ding et al., quienes observaron que liposomas de glicinato ferroso mejoraban su EE al incorporar surfactante hasta alcanzar una concentración óptima, tras la cual el exceso provocaba ruptura vesicular (Ding et al., 2009). En nuestro caso, la EE máxima se obtuvo en ausencia de surfactante, lo que indica que la formulación de base presentaba ya un entorno altamente eficiente de encapsulación y que la acción del tensioactivo operó principalmente como modulador del tamaño y no como promotor de encapsulación.

En consonancia con ello, estudios como el de Wang et al. muestran que el efecto del surfactante sobre la EE no es universal, sino dependiente del equilibrio entre compacidad de la bicapa, volumen interno de la vesícula y naturaleza del compuesto encapsulado (Wang et al., 2024). Con base en la evidencia presentada, puede afirmarse que el impacto del surfactante sobre la EE en este estudio se explica por un mecanismo doble: a bajas concentraciones contribuye a la estabilización estérica sin comprometer la retención del bioactivo, mientras que a concentraciones elevadas reduce la capacidad encapsulante al generar vesículas significativamente más pequeñas, además de favorecer la transición hacia estructuras micelares.

Sin embargo, aun cuando la formulación control presentó la mayor EE, esto no debe interpretarse de manera aislada. Diversos autores coinciden en que las formulaciones con surfactantes en niveles moderados proporcionan ventajas funcionales adicionales, como mayor estabilidad coloidal y mejor comportamiento durante la liberación (Ding et al., 2009; Wang et al., 2024), lo que convierte a las formulaciones de concentraciones intermedias de Tween 80 y Brij L23 en alternativas tecnológicamente más equilibradas dentro del sistema estudiado.

4.1.3 Selección de formulaciones

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos al aplicar la matriz de ponderación a todas las formulaciones de liposomas. En ella se incluyen los valores de absorbancia y eficiencia de encapsulación de cada una de las formulaciones, así como los datos normalizados y la ponderación final.

Con base en este análisis, se seleccionaron las formulaciones correspondientes al **nivel 2** de cada surfactante: Tween 80 con una relación molar surfactante/lecitina de soya de 0,2 mol/mol (muestras T2 y T2-R) y Brij L23 con una relación de 0,05 mol/mol (muestras B2 y B2-R). Esta elección se sustenta en los resultados obtenidos anteriormente, donde la eficiencia de encapsulación mostró los valores más altos entre los niveles 0, 1 y 2 para ambos surfactantes sin diferencias estadísticamente significativas (ver Figura 3). Sin embargo, la estabilidad estérica sí presentó diferencias claras entre niveles, en este caso, los niveles 2 y 3 fueron los que exhibieron la mayor estabilidad. Considerando ambos criterios de manera conjunta, el nivel 2 resultó ser el más adecuado, ya que ofrece una estabilidad estérica elevada y alta eficiencia de encapsulación.

Tabla 3

Resultado de la matriz de ponderación

Experimento	MUESTRA	Absorbancia (ABS)	ABS Normalizada	%EE	% EE Normalizada	Ponderación
Control	C1	0,8975	0,0000	95,876	1,0000	0,5000
	C1-R					
Tween 80	T1	0,5095	0,6748	93,346	0,9119	0,7934
	T1-R					
	T2	0,350	0,9516	88,583	0,7462	0,8489
	T2-R					
	T3	0,343	0,9641	67,144	0,0000	0,4820
	T3-R					
Brij L 23	B1	0,495	0,6994	89,469	0,7770	0,7382

Experimento	MUESTRA	Absorbancia (ABS)	ABS Normalizada	%EE	% EE Normalizada	Ponderación
	B1-R					
	B2	0,347	0,9571	86,516	0,6742	0,8157
	B2-R					
	B3	0,3225	1,0000	68,741	0,0556	0,5278
	B3-R					

4.2 Etapa 2: Caracterización fisicoquímica de las formulaciones seleccionadas

4.2.1 Análisis de color

El color característico de los liposomas formulados con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante junto con los valores de los componentes del espacio del color CIElab (L, a* y b*) se presentan en la Tabla 4. Se puede observar que la formulación con Tween 80 presenta el tono más oscuro, seguida por los liposomas con Brij L 23, mientras que la formulación sin surfactante presenta el color más claro. Adicionalmente, en los Apéndices I, J y K se pueden consultar el set de datos y los resultados ANOVA para los componentes L, a* y b* de las formulaciones con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante.

A partir de los componentes característicos del espacio de color CIElab, se calculó la diferencia de color de los liposomas respecto a los hidrolizos de sangre bovina. Los valores obtenidos junto con pruebas estadísticas se presentan en la Tabla 4, mientras que los resultados del análisis ANOVA se plasman en el Apéndice L. Tal como se evidencia, la formulación preparada con Tween 80 mostró la mayor diferencia de color respecto a los hidrolizados de sangre bovina, mientras que las formulaciones con Brij L 23 y sin surfactante presentaron menores ΔE (diferencia de color).



Del análisis estadístico realizado se observa que no existen diferencias significativas entre réplicas. Sin embargo, se puede evidenciar lo siguiente: para el componente L (luminosidad) del


espacio de color CIELab existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre surfactantes, más específicamente entre Tween 80 y las demás formulaciones; para el componente a^* (verde(-), rojo(+)) no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre surfactantes; en el caso del componente b (azul (-), amarillo (+)) si se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las formulaciones; finalmente, para la diferencia de color total se identificaron diferencias significativas entre el Tween 80 y las demás formulaciones.

Los resultados del análisis ANOVA muestran que el color final de las formulaciones se ve influenciado por el tipo de surfactante empleado en su preparación. Este efecto puede explicarse por la interacción entre el liposoma y el tensioactivo, ya que este último se adsorbe en la lámina externa de la bicapa lipídica (Xia & Xu, 2005b), modificando la forma en que la luz se refleja y se dispersa en la suspensión.

Tabla 4

Color, componentes del espacio de color CIELab (L , a^ y b^*) y diferencia de color (ΔE) para las formulaciones con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante*

Surfactante	CIELab			Diferencia de color (ΔE)	Color	Liposomas
	L	a^*	b^*			
Tween 80	10.58 $\pm 0.19^b$	4.57 $\pm 0.47^a$	2.12 $\pm 0.02^c$	18.01 $\pm 0.21^a$		
Brij L	18.1 $\pm 1.67^a$	4.83 $\pm 0.1^a$	5.26 $\pm 0.03^b$	13.2 $\pm 0.4^b$		

Surfactante	CIELab			Diferencia de color (ΔE)	Color	Liposomas
	L	a*	b*			
Sin surfactante	21.23 $\pm 0.46^a$	6.88 $\pm 0.75^a$	11.28 $\pm 1.29^a$	10.62 $\pm 1.04^b$		

Nota. Para cada variable (L, a*, b* y ΔE), las letras de Tukey se asignaron de manera independiente y no son comparables entre variables distintas. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey. Las formulaciones se prepararon con el nivel 2 de la relación molar surfactante/lecitina (0.2 y 0.05 para el Tween 80 y Brij L 23, respectivamente).

Diversas investigaciones se han encargado de encapsular compuestos derivados de la sangre bovina en liposomas. Tal es el caso de Valdés et al. (2023), quien en su estudio encapsuló eritrocitos bovinos atomizados y evaluó el color de sus formulaciones, obteniendo rangos de color para cada uno de los componentes del espacio de color CIELab: para L entre 10-14, para a* entre 10-15 y para b* entre 0.9-1.1. Comparando estos resultados con los obtenidos en este estudio, se observa que para el componente L la formulación con Tween 80 se encuentra dentro del rango reportado por el autor; sin embargo, las formulaciones con Brij L 23 y sin surfactante presentan valores superiores. Para el componente a* las tres formulaciones evaluadas están por debajo de los valores reportados por valdes. Finalmente, para el componente b* los resultados de las tres formulaciones están por encima del rango reportado por dicho autor.

4.2.2 *Tamaño de partícula*

El tamaño de partícula es un parámetro clave en la formulación de liposomas. Una reducción controlada (sin llegar a formar micelas mixtas) contribuye a disminuir la agregación y la sedimentación, favoreciendo la estabilidad del sistema. Además, en digestiones *in vitro*, un menor tamaño de partícula favorece la absorción y liberación del compuesto encapsulado. En la Figura 4 se muestran los valores obtenidos para el tamaño de partícula de las formulaciones seleccionadas junto con la desviación estándar y la comparación de medias (prueba de Tukey). Se observa que la formulación sin surfactante presenta el mayor tamaño de partícula (716,17 nm), seguida por la formulación con Brij L 23 (282,5 nm) y, finalmente, la elaborada con Tween 80, que presentó el menor tamaño de partícula (130,77 nm). Adicionalmente, en el Apéndice H se encuentran los resultados del ANOVA aplicado a los datos obtenidos para el tamaño de partícula.

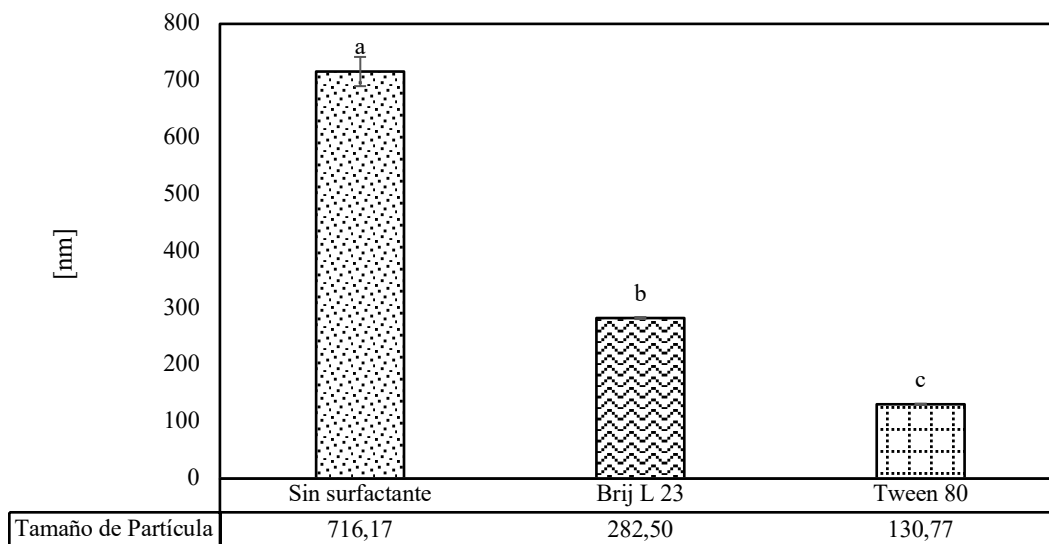
Los resultados del análisis estadístico muestran que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las réplicas para un mismo surfactante. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres tipos de formulación (Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante), lo que indica que tanto la presencia o ausencia de surfactante como el tipo empleado influyen de manera considerable en el tamaño de partícula promedio.

El tamaño de partícula de los liposomas formulados con un tensioactivo (Tween 80 y Brij L 23) se vio reducido de manera considerable. Este comportamiento puede atribuirse a la repulsión estérica generada por las moléculas de surfactante incorporadas en la bicapa lipídica. Dichas moléculas se adsorben tanto en la monocapa interna como en la externa de la bicapa: las ubicadas en la monocapa externa incrementan la curvatura de la partícula, mientras que las presentes en la monocapa interna ejercen el efecto contrario. Dado que existe una mayor proporción de surfactante

en la monocapa externa, el efecto neto conduce a una reducción en el tamaño de los liposomas (Tasi et al., 2003).

Figura 4

Tamaño de partícula de los liposomas formulados con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante usando el nivel 2 de la relación molar surfactante/lecitina de soya



Nota. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey. Las formulaciones se prepararon con el nivel 2 de la relación molar surfactante/lecitina (0.2 y 0.05 para el Tween 80 y Brij L 23, respectivamente).

Otras investigaciones han reportado resultados similares en cuanto al tamaño de partícula al encapsular compuestos comparables a los hidrolizados de sangre bovina. Tal es el caso de Yi et al. (2019), quien se encargó de encapsular sulfato ferroso en liposomas variando la relación Tween 80/lecitina de soya. Al evaluar las propiedades fisicoquímicas de sus formulaciones, obtuvo un tamaño de partícula de aproximadamente 200 nm para la formulación sin surfactante, mientras que para las relaciones 0,2:1 y 0,5:1 se reportaron tamaños de aproximadamente 140 nm y 170 nm, respectivamente.

Por otra parte, Valdés et al. (2023) preparó liposomas encapsulantes de eritrocitos bovinos atomizados (ABE) considerando 4 tiempos de exposición al baño ultrasónico y dos relaciones de lecitina de soya (SL)/Tween 80 (T80). Para una concentración de ABE del 5% (p/v) y una relación de 10:2 (SL:T80) el menor tamaño de partícula obtenido fue de aproximadamente 600 nm y el mayor de 1,000 nm, mientras que, bajo la misma concentración de ABE pero con una relación de 10:4 (SL:T80) los tamaños oscilaron entre 100 y 800 nm. Comparando los resultados obtenidos por Valdés con los reportados en este estudio, se observa que, para un tiempo de sonicación de 15 min y una relación 10:2 y 10:4, Valdés obtuvo tamaños de partícula de aproximadamente 900 nm y 600 nm respectivamente. En cambio, en este estudio se obtuvieron tamaños de 282 nm para las formulaciones con Brij L 23 y 130 nm para aquellas con Tween 80. Este autor registró tamaños de partícula considerablemente mayores a los reportados en este estudio, esto debido principalmente a la técnica utilizada para reducir el tamaño de los liposomas.

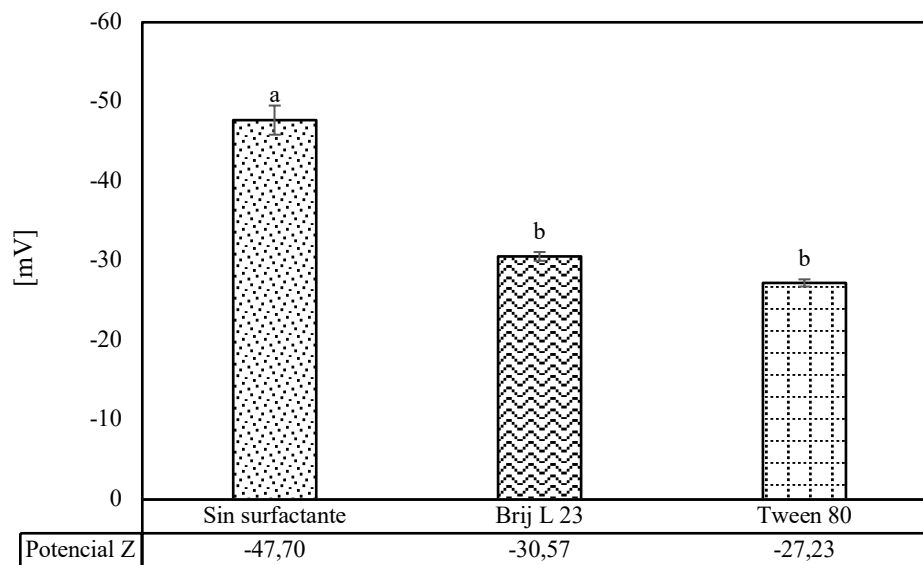
4.2.3 Potencial Z

Los resultados de potencial Z obtenidos para las formulaciones evaluadas mostraron diferencias claras según el surfactante utilizado (

Figura 5). La formulación control presentó la media más negativa siendo $-47,7$ mV, lo que evidencia una estabilización predominantemente electrostática en ausencia de surfactantes no iónicos. En contraste, las formulaciones con Brij L23 y Tween 80 exhibieron valores de Z promedio de $-30,6$ mV y $-27,2$ mV, respectivamente, con una reducción en la magnitud de la carga superficial aparente.

Figura 5

Potencial Z de los liposomas formulados con Tween 80 (0,2 mol surfactante/mol lecitina), Brij L 23 (0,05 mol surfactante/mol lecitina) y sin surfactante



Nota. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey. Las formulaciones se prepararon con el nivel 2 de la relación molar surfactante/lecitina (0.2 y 0.05 para el Tween 80 y Brij L 23, respectivamente).

Este comportamiento se explica por la acción de los surfactantes no iónicos, que al insertarse en la bicapa lipídica enmascaran parcialmente las cargas de los fosfolípidos y desplazan el plano de cizalla, reduciendo en valor absoluto el potencial Z. Sin embargo, este mismo fenómeno aporta una barrera estérica adicional, que previene la agregación y mantiene la estabilidad coloidal. Kronberg (1990) describió este mecanismo de manera detallada, señalando que a bajas concentraciones los tensioactivos se incorporan entre los fosfolípidos y favorecen la repulsión estérica, mientras que a concentraciones excesivas pueden desestabilizar la bicapa formando

micelas mixtas (Kronberg et al., 1990). En nuestro caso, los valores de potencial Z junto con los tamaños de partícula sugieren que las concentraciones empleadas se mantuvieron en la zona de estabilización, sin alcanzar la desestructuración.

El patrón de resultados es congruente con estudios recientes en los que se ha reportado que valores de potencial Z de -20 a -30 mV son suficientes para mantener la estabilidad cuando la bicapa está reforzada por surfactantes no iónicos, según Wang et al. (2024), quienes formularon liposomas de lecitina, colesterol y Tween 80, obteniendo un Z promedio de $-23,6$ mV junto con un tamaño promedio de 114 nm y eficiencias de encapsulación superiores al 70 %. Estos datos corroboran que magnitudes moderadas de potencial Z pueden coexistir con una alta estabilidad física y de almacenamiento, debido a la contribución estérica de las cadenas polietoxiladas del surfactante (Hara et al., 1997). De forma complementaria, Ding et al. (2009) observaron que la adición de Tween 80 en liposomas de hierro favorecía la estabilidad coloidal sin necesidad de mantener valores muy negativos de potencial Z, reforzando la idea de que la estabilización estérica puede sustituir parcialmente la función de la repulsión electrostática.

La relación con el criterio clásico de estabilidad electrostática es también relevante. Valdés et al. (2023) señalaron que formulaciones con $|Z \text{ promedio}| > 30$ mV se consideran estables por repulsión electrostática (Kalra & Bally, 2013)n.d.). Bajo este criterio, el control y Brij L23 se encuentran dentro del rango de estabilidad electrostática, mientras que Tween 80 queda ligeramente por debajo. Sin embargo, los antecedentes de Ding et al. (2009) y Wang et al. (2024) indican que valores cercanos a -25 mV, en presencia de surfactantes adecuados, son compatibles con sistemas estables y funcionales, debido a la estabilidad estérica que aporta la incorporación de surfactantes no iónicos (Ding et al., 2009; Wang et al., 2024).

4.3 Etapa 3: Bioaccesibilidad de liposomas con hidrolizado de sangre bovina

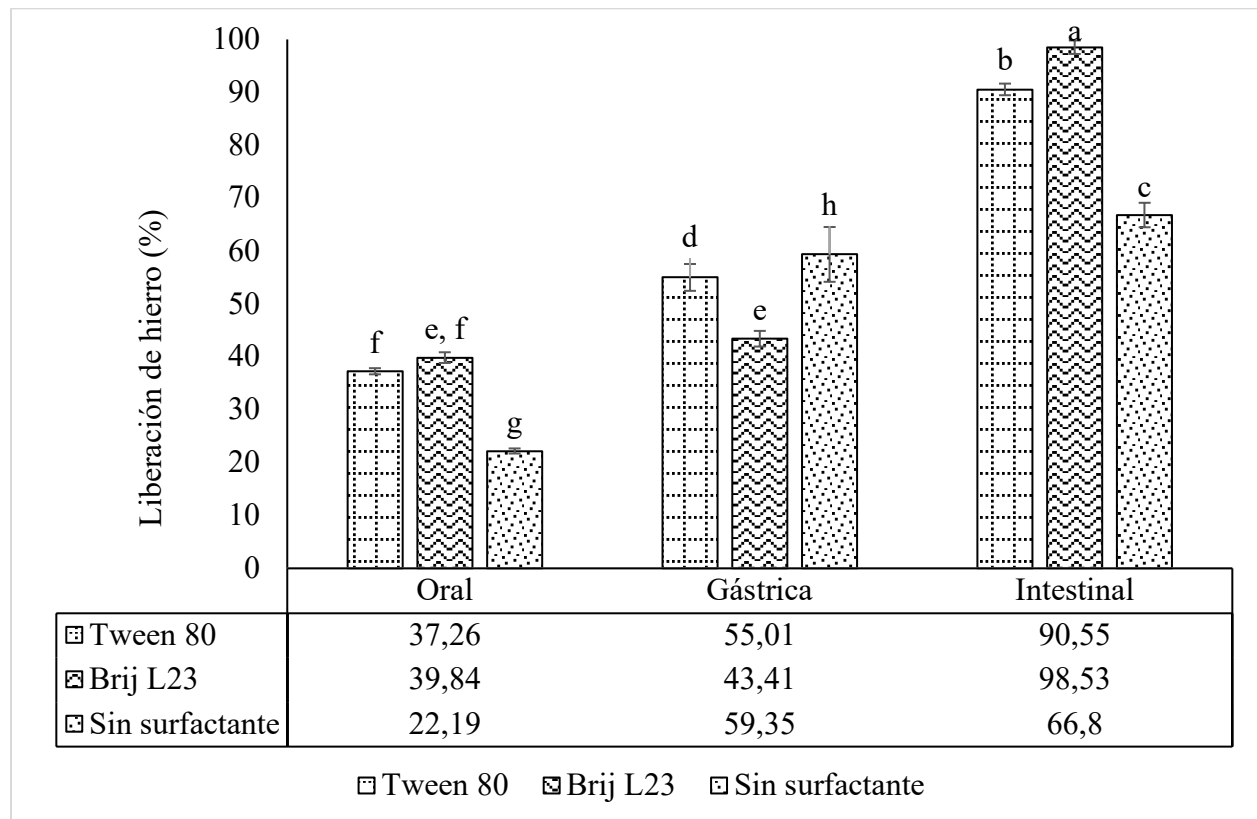
Los porcentajes de liberación de hierro que presentaron las formulaciones con Tween 80, Brij L23 y sin surfactante al ser sometidas a la digestión *in vitro* se presentan en la

Figura 6, los datos se encuentran divididos por fases (oral, gástrica e intestinal). En la fase oral, la formulación con Brij L 23 presentó el mayor porcentaje de liberación de hierro (39,84%), mientras que la formulación sin surfactante presentó el valor más bajo (22,19%). En la fase gástrica se observa un ligero incremento en la liberación de hierro, donde la formulación con mayor porcentaje fue la preparada sin surfactante (59,35%) y la que presentó menor liberación fue la formulada con Brij L 23 (43,41%). Finalmente, en la fase intestinal las tres formulaciones aumentaron considerablemente el porcentaje de hierro disponible (bioaccesibilidad) respecto a las fases anteriores, donde los liposomas preparados con Brij L 23 obtuvieron el mayor porcentaje (98,53%) seguido por la formulación con Tween 80 (90,55%) y por último la formulación sin surfactante (66,8%).

Las formulaciones con Tween 80, Brij L 23 y sin surfactante se prepararon por duplicado y se les cuantificó el porcentaje de liberación de hierro para cada una de las fases de la digestión *in vitro*. Estos valores obtenidos, junto con los estadísticos descriptivos y comparación de medias (prueba de Tukey) se presentan en la Figura 8. Asimismo, los resultados del ANOVA aplicado a los datos experimentales se encuentran en los Apéndices M, N, O y P. A partir del análisis estadístico se observa que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre réplicas; sin embargo, si se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) tanto en función del tipo de surfactante empleado como de la fase de digestión *in vitro*.

Figura 6

Porcentaje de bioaccesibilidad de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante



Nota. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey. Las formulaciones se prepararon con el nivel 2 de la relación molar surfactante/lecitina (0.2 y 0.05 para el Tween 80 y Brij L 23, respectivamente).

Las formulaciones preparadas con Tween 80 y Brij L 23 presentaron un porcentaje de bioaccesibilidad en la fase intestinal mayor al presentado por la formulación sin surfactante. Este comportamiento se le puede atribuir a la estabilidad estérica que aportan los surfactantes a las formulaciones. En ausencia de tensioactivo, los liposomas son más susceptibles a la desestabilización bajo condiciones ácidas, provocando así la liberación del hierro contenido en su

interior y su degradación en lugares donde no se da su absorción, provocando que al momento de llegar a la fase intestinal haya menor cantidad de hierro disponible para la absorción (Pasarin et al., 2023).

El comportamiento descrito por Pasarin et al. (2023) se puede observar en los resultados obtenidos en este estudio. La formulación sin surfactante presentó la menor bioaccesibilidad en la fase intestinal, pero fue la que liberó mayor cantidad de hierro durante la fase gástrica. Esto ocurre porque, al no contar con un surfactante que proteja al liposoma, el hierro contenido dentro de este se libera prematuramente en la fase gástrica donde parte de él se degrada, provocando que en la fase intestinal haya una menor cantidad de hierro disponible para la absorción.

Otro comportamiento observado en la digestión *in vitro* es que en la fase intestinal se presentaron porcentajes de bioaccesibilidad considerablemente superiores a las otras fases (para todas las formulaciones). Esto ocurre ya que en la fase intestinal simulada *in vitro* se encuentran las sales biliares y la pancreatina, estas se encargan de romper la bicapa lipídica de los liposomas produciendo así la liberación del hierro en su lugar de absorción. En las fases oral y gástrica, no están presentes los compuestos encargados de desestabilizar los liposomas, por ello no presentan valores de liberación de hierro muy altos (Valdés et al., 2023).

Comparando los resultados obtenidos con los reportados en otras investigaciones, por ejemplo, Valdés et al. (2023) encapsuló eritrocitos bovinos atomizados empleando Tween 80 como surfactante, y reportó un porcentaje de liberación de hierro cercano al 20% para la fase gástrica y de aproximadamente el 100% para la fase intestinal. Estos valores siguen el mismo comportamiento descrito en este estudio, donde se observa que en la fase intestinal hay mayor bioaccesibilidad del hierro encapsulado.

5. Conclusiones

El estudio realizado permitió demostrar que el tipo de surfactante y su proporción molar frente al material de pared ejercen un efecto determinante sobre la formulación y desempeño de liposomas cargados con hidrolizados de sangre bovina.

En relación con la estabilidad y la eficiencia de encapsulación, se evidenció que la lecitina de soya por sí sola constituye una matriz altamente eficiente, alcanzando una retención de hierro del 96.6 % en el control. La incorporación de surfactantes en niveles adecuados aportó mecanismos adicionales de protección al conferir estabilización estérica, aunque con una reducción parcial de la eficiencia. Con Tween 80 la EE osciló entre 93,6% y 67,1%, mientras que con Brij L23 varió de 89,4 % a 68,7 %, dependiendo de la proporción empleada. Estos resultados confirman que la eficiencia de encapsulación no puede ser interpretada de manera aislada, ya que los surfactantes, aun cuando disminuyen este valor, favorecen la funcionalidad global del sistema al mejorar la resistencia estructural y la estabilidad coloidal.

La caracterización fisicoquímica mostró que las modificaciones en la formulación repercuten directamente sobre parámetros clave como el tamaño de partícula, color y potencial Z, todos ellos determinantes para la aceptación y el desempeño de los liposomas. El control presentó un tamaño promedio de 716,2 nm, mientras que la inclusión de surfactantes redujo este valor de manera significativa hasta 130,8 nm en el caso de Tween 80 y 282,5 nm con Brij L23. El potencial Z del control fue de $-47,7$ mV, asociado a una estabilización principalmente electrostática, mientras que las formulaciones con surfactantes alcanzaron valores cercanos a -30 mV, reflejando una estabilización combinada de tipo electrostático-estérico. Estos hallazgos evidencian que la incorporación de surfactantes permite generar sistemas con propiedades ajustadas a requisitos tecnológicos y nutricionales más exigentes.

Por último, los ensayos de digestión *in vitro* revelaron que la bioaccesibilidad del hierro no se relaciona exclusivamente con la cantidad inicialmente encapsulada, sino con la capacidad del sistema para protegerlo y liberarlo en el sitio fisiológico adecuado. Mientras el control liberó un 66,8 % del hierro encapsulado en fase intestinal, las formulaciones con surfactantes superaron ampliamente este valor, alcanzando un 98,5 % en Brij L23 y un 90,6 % en Tween 80. Este resultado demuestra que la optimización de liposomas debe enfocarse en el balance entre encapsulación, estabilidad y bioaccesibilidad, más que en la maximización de un único parámetro.

Referencias Bibliográficas

- Arciniegas, S. M., Saavedra, S. A., Balderas, D., del Carmen Caballero, S., Bernad, M. J., Sánchez, J. C., Gracia, M. I., Rico, H. A., & Vargas, D. (2019). Comparison in the Glucose Response of Flexible Liposomes Loaded with Insulin with the Addition of Different Surfactants in an Experimental Diabetes Model. *Letters in Drug Design & Discovery*, *17*(6), 787–798. <https://doi.org/10.2174/1570180816666191024102231>
- Arifin, D. R., & Palmer, A. F. (2003). Determination of Size Distribution and Encapsulation Efficiency of Liposome-Encapsulated Hemoglobin Blood Substitutes Using Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Coupled with Multi-Angle Static Light Scattering. *Biotechnology Progress*, *19*(6), 1798–1811. <https://doi.org/10.1021/bp034120x>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019a). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019b). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Dhillon, A., Singh, R., & Senwar, K. R. (2024). An Extensive Review on Novel Liposomes: Classification, Methodology, Characterization, Current Formulations. In *International*

- Journal of Drug Delivery Technology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 1842–1852). Dr. Yashwant Research Labs Pvt. Ltd. <https://doi.org/10.25258/ijddt.14.3.83>
- Ding, B., Xia, S., Hayat, K., & Zhang, X. (2009). Preparation and pH stability of ferrous glycinate liposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2938–2944. <https://doi.org/10.1021/jf8031205>
- Fazel, M., Daeihamed, M., Osouli, M., Almasi, A., Haeri, A., & Dadashzadeh, S. (2018). Preparation, In-Vitro Characterization and Pharmacokinetic Evaluation of Brij Decorated Doxorubicin Liposomes as a Potential Nanocarrier for Cancer Therapy. In *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*.
- Hara, T., Liub, F., Liub, D., & Huang", L. (1997). Emulsion formulations as a vector for gene delivery in vitro and in vivo. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 24).
- Kalman, D., Hewlings, S., Madelyn-Adjei, A., & Ebersole, B. (2025). Dietary Heme Iron: A Review of Efficacy, Safety and Tolerability. In *Nutrients* (Vol. 17, Issue 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nu17132132>
- Kalra, J., & Bally, M. B. (2013). *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*.
- Kronberg, B., Dahlman, A., Carlfors, J., Karlsson, J., & Artursson, P. (1990). Preparation and Evaluation of Sterically Stabilized Liposomes: Colloidal Stability, Serum Stability, Macrophage Uptake, and Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(8), 667–671. <https://doi.org/10.1002/jps.2600790803>
- Liu, P., Chen, G., & Zhang, J. (2022). A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>

- Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., & Singh, H. (2013). Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared from milk fat globule membrane-derived phospholipids. *Journal of Dairy Science*, 96(4), 2061–2070. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6072>
- Ngui, R., Lim, Y. A. L., Kin, L. C., Chuen, C. S., & Jaffar, S. (2012). Association between anaemia, iron deficiency anaemia, neglected parasitic infections and socioeconomic factors in rural children of West Malaysia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001550>
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. In *Heliyon* (Vol. 8, Issue 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>
- Olson, F., Hunt, C., Szoka, F., Vail, W., & Papahadjopoulos, D. (1979). *Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes*. 557, 9–23.
- Oshima Harumi. (1997). *Spectrophotometric Method for Heme Iron Determination in Foods*.
- Outman, A., Deracinois, B., Flahaut, C., Diab, M. A., Dhaouefi, J., Gressier, B., Eto, B., & Nedjar, N. (2023). Comparison of the Bioactive Properties of Human and Bovine Hemoglobin Hydrolysates Obtained by Enzymatic Hydrolysis: Antimicrobial and Antioxidant Potential of the Active Peptide α 137-141. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17). <https://doi.org/10.3390/ijms241713055>
- Pasarin, D., Ghizdareanu, A.-I., Enascuta, C. E., Matei, C. B., Bilbie, C., Paraschiv-Palada, L., & Veres, P.-A. (2023). Coating Materials to Increase the Stability of Liposomes. *Polymers*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/polym15030782>

- Saesoo, S., Sramala, I., Soottitantawat, A., Charinpanitkul, T., & Ruktanonchai, U. R. (2010). Enhanced stability and in vitro bioactivity of surfactant-loaded liposomes containing Asiatic Pennywort extract. *Journal of Microencapsulation*, 27(5), 436–446. <https://doi.org/10.3109/02652040903447686>
- Skalko-Basnet, N., Pavelic, Z., & Becirevic-Lacan, M. (2000). Liposomes Containing Drug and Cyclodextrin Prepared by the One-Step Spray-Drying Method. *Http://Dx.Doi.Org/10.1081/DDC-100102309*, 26(12), 1279–1284. <https://doi.org/10.1081/DDC-100102309>
- Sopyan, I., Insan Sunan, K., & Gozali, D. (2020). A Review: A Novel of Efforts to Enhance Liposome Stability as Drug Delivery Approach. In *Systematic Reviews in Pharmacy* (Vol. 11, Issue 6, pp. 555–562). EManuscript Technologies. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.85>
- Tasi, L.-M., Liu, D.-Z., & Chen, W.-Y. (2003a). *Microcalorimetric investigation of the interaction of polysorbate surfactants with unilamellar phosphatidylcholines liposomes*. www.elsevier.com/locate/colsurfa
- Tasi, L.-M., Liu, D.-Z., & Chen, W.-Y. (2003b). Microcalorimetric investigation of the interaction of polysorbate surfactants with unilamellar phosphatidylcholines liposomes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(1), 7–14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00287-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00287-X)
- Toro-Uribe, S., Ibáñez, E., Decker, E. A., McClements, D. J., Zhang, R., López-Giraldo, L. J., & Herrero, M. (2018). Design, Fabrication, Characterization, and in Vitro Digestion of Alkaloid-, Catechin-, and Cocoa Extract-Loaded Liposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(45), 12051–12065. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04735>

- Valdés, F., Carrillo, R., Campos, F., Sáenz, L., & Valenzuela, C. (2023a). Encapsulation of atomized erythrocytes in liposomes as source of heme iron for oral supplementation strategies. *Journal of Food Process Engineering*, 46(11). <https://doi.org/10.1111/jfpe.14393>
- Valdés, F., Carrillo, R., Campos, F., Sáenz, L., & Valenzuela, C. (2023b). Encapsulation of atomized erythrocytes in liposomes as source of heme iron for oral supplementation strategies. *Journal of Food Process Engineering*, 46(11). <https://doi.org/10.1111/jfpe.14393>
- Victor M. Starov. (n.d.). *NANOSCIENCE Colloidal and Interfacial Aspects*.
- Wang, R., Ma, C., Yan, H., Zhao, H., Wang, P., Zhang, S., Ju, J., Yu, S., & Yin, Z. (2024). Lecithin/Cholesterol/Tween 80 Liposomes for Co-Encapsulation of Vitamin C and Xanthoxylin. *ACS Applied Nano Materials*, 7(6), 5982–5995. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c05884>
- Xia, S., & Xu, S. (2005a). Ferrous sulfate liposomes: Preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International*, 38(3), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.010>
- Xia, S., & Xu, S. (2005b). Ferrous sulfate liposomes: Preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International*, 38(3), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.010>
- Yi, X., Zheng, Q., Pan, M. hsiung, Chiou, Y. shiou, Li, Z., Li, L., Chen, Y., Hu, J., Duan, S., Wei, S., & Ding, B. (2019). Liposomal vesicles-protein interaction: Influences of iron liposomes on emulsifying properties of whey protein. *Food Hydrocolloids*, 89, 602–612. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.030>

Apéndices

Apéndice A. Resultados del análisis ANOVA para la absorbancia de liposomas formulados con Tween 80.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	P
Intercepto	2,20710	1,00000	2,20710	2993,35511	0,00001
Tween 80	0,40478	3,00000	0,13493	182,99164	0,00068
Réplica	0,00002	1,00000	0,00002	0,02441	0,88576
Error	0,00221	3,00000	0,00074		

Apéndice B. Resultados del análisis ANOVA para la absorbancia de liposomas formulados con Brij L 23.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	P
Intercepto	2,12695313	1	2,12695313	5480,07246	5,43258E-06
Brij L 23	0,42393038	3	0,14131013	364,084058	0,000243166
Réplica	0,00103513	1	0,00103513	2,66698873	0,200955911
Error	0,00116438	3	0,00038813		

Apéndice C. Resultados del análisis ANOVA para la absorbancia de liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	P
Intercepto	4,33368306	1	4,33368306	8054,23731	5,6172E-12
Surfactante	0,00037056	1	0,00037056	1	0,43399329
Nivel	0,82842919	3	0,27614306	513,217447	1,4495E-08
Surfactante*Nivel	0,00027869	3	9,2896E-05	0	0,91154327
Réplica	0,00066306	1	0,00066306	1,23231502	0,30362992

Error	0,00376644	7	0,00053806
--------------	------------	---	------------

Apéndice D. Resultados del análisis ANOVA para la eficiencia de encapsulación de liposomas formulados con Tween 80.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	59495,22	1,00	59495,22	8035,83	0,00
Tween 80	1027,05	3,00	342,35	46,24	0,01
Réplica	21,82	1,00	21,82	2,95	0,18
Error	22,21	3,00	7,40		

Apéndice E. Resultados del análisis ANOVA para la eficiencia de encapsulación de liposomas formulados con Brij L 23.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	58005,16	1	58005,16	2.740	1,54E-05
Brij L 23	809,6426	3	269,8809	13	0,032572
Réplica	15,15321	1	15,15321	0,715696	0,459699
Error	63,51806	3	21,17269		

Apéndice F. Resultados del análisis ANOVA para la eficiencia de encapsulación de liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	117495,6	1	117495,558	6.720	1,06E-11
Surfactante	4,723016	1	4,72301556	0,27011	0,619283
Nivel	1819,491	3	606,496902	35	0,000143
Surfactante*Nivel	17,13261	3	5,71086956	0,326606	0,806527

Réplica	0,303326	1	0,303325562	0,017347	0,89892
Error	122,3985	7	17,4855066		

Apéndice G. Resultados del análisis ANOVA para el Potencial Z de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	11130,25	1	11130,25	6.928	1,25E-07
surfactante	723,546667	2	361,7733	225	7,75E-05
Replica	1,30666667	2	0,653333	0,406639	0,690618
Error	6,42666667	4	1,606667		

Apéndice H. Resultados del análisis ANOVA para el Tamaño de Partícula de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	1275620	1	1275620	5.904	1,72E-07
Surfactante	553782,9	2	276891,5	1.281	2,43E-06
Replica	465,6089	2	232,8044	1	0,422357
Error	864,2844	4	216,0711		

Apéndice I. Resultados del análisis ANOVA para el componente de luminosidad (L) en el espacio de color CIELAB de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	1.660	1	1.660	1.853	0,000539
Surfactante	120	2	60	67	0,014734

Replica	1	1	1	1	0,358278
Error	2	2	0,896216		

Apéndice J. Resultados del análisis ANOVA para el componente que representa de rojo a verde (a) en el espacio de color CIELAB de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	177	1	177	472	0,00211
Surfactante	6	2	3	9	0,104231
Replica	0,04664	1	0,04664	0,124818	0,75763
Error	0,747329	2	0,373665		

Apéndice K. Resultados del análisis ANOVA para los valores en escala logarítmica del componente que representa de amarillo a azul (b) en el espacio de color CIELAB de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	3	1	3	3.644	0,000274
Surfactante	0,527634	2	0,263817	328	0,003041
Replica	0,000892	1	0,000892	1	0,402752
Error	0,001609	2	0,000805		

Apéndice L. Resultados del análisis ANOVA para la diferencia de color total de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	1.166	1	1.166	1.900	0,000526
Surfactante	56	2	28	46	0,02139
Replica	0,061436	1	0,061436	0,100046	0,781734
Error	1	2	0,614079		

Apéndice M. Resultados del análisis ANOVA para la fase bucal de las digestiones in vitro de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	6.578	1	6.578	9.603	0,00010412
Formulación	364	2	182	266	0,00375008
Réplica	0,25521014	1	0,25521014	0,37256678	0,6037285
Error	1	2	0,6850051		

Apéndice N. Resultados del análisis ANOVA para la fase gástrica de las digestiones in vitro de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	5.000	1	5.000	3.591	0,00027837
Formulación	1.615	2	808	580	0,00172104
Réplica	0,03977537	1	0,03977537	0,02856393	0,8813372
Error	3	2	1		

Apéndice O. Resultados del análisis ANOVA para la fase intestinal de las digestiones in vitro de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	43281,9038	1	43281,9038	14413,9387	6,937E-05
Formulación	1082,5583	2	541,27915	180,259273	0,00551696
Réplica	2,1161113	1	2,1161113	0,70471712	0,4895579
Error	6,00556234	2	3,00278117		

Apéndice P. Resultados del análisis ANOVA para la digestión in vitro (todas las fases) de los liposomas formulados con surfactante (Tween 80 y Brij L 23) y sin surfactante.

Efecto	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	46705,1615	1	46705,1615	22680,689	1,11E-16
Formulación	3386,12924	2	1693,06462	822,176201	6,4781E-11
Fase	10409,0295	2	5204,51475	2527,38621	4,2066E-13
Formulación*Fase	690,249217	4	172,562304	83,7987032	4,0686E-07
Error	18,5332312	9	2,05924791		