

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LIPOSOMAS  
PARA EL ENCAPSULAMIENTO DE PROTEÍNA HIDROLIZADA DE LECHE COMO  
MODELO DE COMPONENTE FUNCIONAL DE APLICACIÓN COSMÉTICA**

Jorge Humberto Pérez García

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
MAGISTER EN FORMULACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y DERIVADOS

Tutor

Cristhian J. Yarce. Qco. MSc

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
MAESTRÍA EN FORMULACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y DERIVADOS

Ciudad

2017

**FIRMAS AVAL AL CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO DE GRADO II.**

Firma del tutor.

---

**Cristhian J. Yarce. Qco. MSc**

Firma del estudiante.

---

**Jorge Humberto Pérez García**

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia quienes me apoyaron incondicionalmente durante este proceso.

A mi madre quien siempre me animo, acompaño y confió en mi como lo ha hecho a lo largo de mi vida.

A mi esposa Paula y mis hijas Sarita y Mariana quienes me regalaron su tiempo y comprensión para alcanzar esta meta.

A los profesores de la Maestría por su entusiasmo y compromiso con nuestro desarrollo, y al Profesor Cristhian Yarse por su tiempo y asesoría,

A la estudiante de pregrado Julieth Sanchez, por su disposición para aprender y apoyo en el laboratorio.

A mis compañeros de la vida y amigos que de una u otra forma me aportaron en este proceso.

A mis compañeros de trabajo quienes me contribuyeron con su tiempo.

A Dios que me dio la fuerza en los momentos en los que ya no tenía.

## CONTENIDO

<b>1</b>	<b>Resumen del proyecto.</b> .....	6
<b>2</b>	<b>Descripción del proyecto:</b> .....	7
<b>2.1</b>	<b>Planteamiento.</b> .....	7
<b>2.2</b>	<b>Estado del arte.</b> .....	9
<b>2.3</b>	<b>Marco teórico.</b> .....	10
2.3.1	Liposomas .....	10
2.3.2	Proteína de Leche Hidrolizada. ....	14
<b>3</b>	<b>Objetivos</b> .....	16
<b>3.1</b>	<b>Objetivo General</b> .....	16
3.1.1	<i>Objetivos específicos.</i> .....	16
<b>3.2</b>	<b>Resultados/Productos y potenciales beneficiarios:</b> .....	16
<b>4</b>	<b>Metodología Propuesta:</b> .....	18
<b>4.1</b>	<b>Materiales.</b> .....	18
<b>4.2</b>	<b>Equipos.</b> .....	18
<b>4.3</b>	<b>Ensayos Preliminares</b> .....	18
<b>4.4</b>	<b>Definición de espacio de diseño:</b> .....	19
4.4.1	<i>Preparación de liposomas mediante inyección de etanol</i> .....	19
4.4.2	<i>Preparación de liposomas mediante evaporación fase reversa:</i> .....	20
4.4.3	<i>Caracterización de liposomas.</i> .....	21
<b>4.5</b>	<b>Presentación y discusión de resultados de Ensayos preliminares.</b> .....	21
4.5.1	<i>Obtención y caracterización de liposomas de ensayos Preliminares.</i> .....	22
<b>4.6</b>	<b>Presentación y discusión de resultados para encapsulamiento de Proteína de Leche Hidrolizada.</b> .....	25
4.6.1	<i>Obtención de liposomas a través de Inyección de Etanol y método de Fase Reversa.</i> .....	25
<b>5</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones</b> .....	31
<b>5.1</b>	<b>Conclusiones</b> .....	31
<b>5.2</b>	<b>Recomendaciones.</b> .....	32
<b>6</b>	<b>ANEXOS</b> .....	33
<b>6.1</b>	<b>Anexos Análisis Factorial – Definición espacio de diseño</b> .....	33

6.1.1	<i>Corrida Minitab - Deseabilidad para la obtención de vesículas de diferentes tamaños por el método de inyección de etanol.....</i>	33
6.1.2	<i>Deseabilidad para la obtención de vesículas de diferentes tamaños por el método de Fase Reversa. 35</i>	
<b>6.2</b>	<b>Anexo Análisis de Anova Minitab Fase Reversa .....</b>	<b>38</b>
6.2.1	<i>One-way ANOVA: Tamaño versus Método .....</i>	38
6.2.2	<i>One-way ANOVA: z versus Metodo .....</i>	40
6.2.3	<i>One-way ANOVA: %EE versus Metodo .....</i>	42
<b>6.3</b>	<b>Análisis de Anova Minitab Inyección de Etanol.....</b>	<b>44</b>
6.3.1	<i>One-way ANOVA: Tamaño versus Metodo .....</i>	44
6.3.2	<i>One-way ANOVA: z versus Metodo .....</i>	46
6.3.3	<i>One-way ANOVA: %EE versus Metodo.....</i>	48
<b>6.4</b>	<b>Anexo Gráficos distribución de tamaño, ensayos encapsulación de proteína de leche hidrolizada a diferentes concentraciones bajo el método de Fase reversa.....</b>	<b>50</b>
<b>6.5</b>	<b>Anexo Gráficos distribución de tamaño, ensayos encapsulación de proteína de leche hidrolizada a diferentes concentraciones bajo el método de Inyección de etanol.....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>68</b>

## 1 Resumen del proyecto.

Existen diferentes métodos para la preparación de liposomas, dentro de estos nos enfocaremos en dos que han recibido gran atención en la literatura, método de inyección de etanol y el método de evaporación en fase reversa; En el método de inyección de etanol, los lípidos de partida se disuelven en etanol, y la disolución se inyecta lentamente en una disolución tampón con la que se quiere trabajar, dando lugar a la formación espontánea de vesículas con tamaños entre 30-110nm. Posteriormente se llevó a cabo una ultrafiltración para eliminar los posibles restos de etanol. Este método ha presentado ventajas frente a otros métodos de fabricación, ya que tiene un funcionamiento mucho más simple, es más fácil de implementar a gran escala, tiene alta reproducibilidad y adicionalmente, no genera ninguna degradación en los lípidos utilizados.

Para el método de evaporación en fase reversa, en primer lugar, la emulsión de agua en aceite se forma mediante sonicación breve de un sistema de dos fases que contiene fosfolípidos en disolvente orgánico tal como éter isopropílico o éter dietílico o una mezcla de éter isopropílico y cloroformo con tampón acuoso. Los disolventes orgánicos se separan a presión reducida, dando como resultado la creación de un gel viscoso. Los liposomas se conforman cuando se separa el disolvente residual durante la continua evaporación rotativa bajo presión reducida. Con este método, El principal inconveniente de la técnica es el contacto de los materiales a encapsular con disolventes orgánicos a breves períodos de sonicación, el principal beneficio del método es que los liposomas tenían un alto rendimiento de encapsulación (alrededor del 80%).

De acuerdo con lo anterior, la siguiente investigación se realiza con el fin de obtener información mediante ensayos en laboratorio sobre el comparativo de dos métodos para la producción de liposomas: Método de inyección de etanol y Método de evaporación en fase reversa, usando para la preparación de los sistemas liposomales derivados de fosfolípidos de soja para la vehiculización de Proteína de Leche hidrolizada, Cada uno de los sistemas obtenidos se caracterizaron en cuanto al diámetro promedio de vesícula, potencial zeta y eficiencia de encapsulación.

## 2 Descripción del proyecto:

### 2.1 Planteamiento.

En el mercado cosmético existen una gran variedad de excipientes de naturaleza proteica que son empleados en la formulación de productos para el cuidado de la piel, la leche se ha asociado con una piel hermosa a lo largo de la historia desde que Cleopatra se bañó en ella, por lo tanto existe un beneficio comprobado en el tiempo reconociendo la proteína de leche como un ingrediente cosmético durante siglos, con propiedades de retención de humedad comparables a las de las proteínas de colágeno de peso molecular promedio similar

Para mantener la humectación en la piel se han investigado ingredientes de naturaleza proteica y peptídica en la industria cosmética, que a menudo implican una modulación en la producción de colágeno, aumento en la regeneración celular, aumento del volumen de las células, procesos de angiogénesis y melanogénesis. Por otro lado, las aplicaciones clínicas de péptidos y proteínas han incrementado significativamente en el tratamiento de quemaduras, la reducción de la inflamación, retención de la humedad y la cicatrización de heridas [2,3].

Los liposomas han sido ampliamente estudiados para en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, como matrices de vehiculización de numerosas moléculas de aplicación funcional, ya que estos sistemas coloidales permiten la encapsulación de compuestos relativamente inestables en las formulaciones, como por ejemplo extractos, biocidas, antioxidantes, sabores, entre otros elementos bioactivos [7,8,9]. Adicional a la capacidad de encapsular tanto compuestos hidrofílicos, como compuestos hidrofóbicos, evitar la descomposición de las moléculas encapsuladas y permitir su liberación en un sitio o bajo condiciones específicas.

La proteína de leche consiste en una mezcla de proteínas, péptidos, polisacáridos y aminoácidos, es producida por hidrólisis enzimática controlada y a su vez diferentes ácidos hidrolizados de proteínas de la leche, forman soluciones claras en agua y permanecen claras a pH ácidos [4]. Las propiedades hidratantes ayudarán a minimizar las condiciones de sequedad de la piel. Dado que

todos los aminoácidos esenciales están presentes, se puede considerar completan los alimentos para la piel y pueden ayudar a nutrir la piel. [5].

La proteína de leche puede ayudar a combatir los efectos de secado de los surfactantes, se sabe que los tensoactivos son responsables de la eliminación del material lipídico de la piel, lo que a su vez provoca una mayor pérdida de humedad y daños en la barrera de permeabilidad de la piel, la deshidratación excesiva causa piel seca, escamosa o incluso agrietada, lo anterior puede evitarse mediante la acción protectora de la proteína de leche.

Sin embargo, al tener un alto contenido proteico, presenta una alta tendencia a la degradación y a tener bajas tasas de penetración percutánea [6], por lo tanto, se debe seleccionar adecuadamente el sistema de vehiculización de este ingrediente, para asegurar el efecto cosmético deseado.

Este estudio pretender brindar información a estudiantes universitarios e industria cosmética sobre dos de los métodos de producción de liposomas más comunes, mediante el encapsulamiento de proteína de leche hidrolizada, que permita evaluar las posibles combinaciones de componentes y su concentración en la producción de liposomas de acuerdo a los requerimientos de tamaño, cantidad, eficiencia y estabilidad mencionados en referencias internacionales y evaluar en laboratorio instrumental la estabilidad física de los liposomas por medio de las técnicas de tamaño de partícula y potencial zeta.

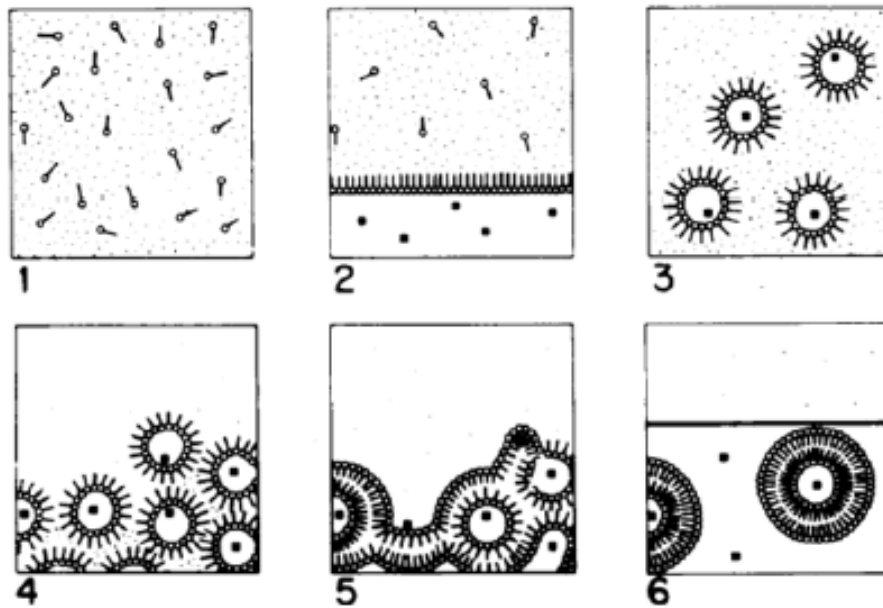
Como parte del desarrollo del conocimiento en la industria cosmética en Colombia, se presenta como alternativa el desarrollo de formulaciones que permitan la entrega de ingredientes activos cosméticos en su sitio de acción, lo anterior hace pertinente la propuesta de este estudio comparativo, con el fin de generar información a través de la experimentación con activos naturales que involucren técnicas para la producción de compuestos liposomados, es por ello que en esta propuesta busca utilizar dos de las técnicas de preparación de sistemas liposomales para la encapsulación de compuestos bioactivos, presentar un comparativo entre las metodologías, verificando ventajas y desventajas referenciadas en la información bibliográfica referenciada.



## 2.2 Estado del arte.

Al final de la década de los 70, Szoka y Papahadjopoulos (29) desarrollaron un procedimiento de preparación de liposomas al que denominaron de evaporación en fase reversa, mediante el cual se pueden obtener vesículas con un espacio central acuoso mucho más voluminoso. En este método se parte de una disolución de los fosfolípidos en éter etílico que se mezcla con una fase acuosa en una relación de volúmenes 1:3 (fase orgánica/fase acuosa). Esta mezcla se emulsifica por sonicación obteniéndose una suspensión de micelas invertidas. A continuación, se elimina el éter a presión reducida (300 mm Hg), produciéndose al mismo tiempo una agregación de dichas micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel, la cual finalmente acaba por romper cuando se sigue incrementando el grado de vacío aplicado (700 mm Hg) para lograr la completa eliminación del disolvente orgánico. En todo este proceso, las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan lo suficientemente cerca unas de otras, como para dar lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas. Las vesículas formadas de esta manera son de tipo uni- u oligolaminar, con un tamaño medio ~ 500 nm, aunque bastante heterogéneo. La fuerza iónica de la solución acuosa determina la capacidad de encapsulación que van a tener las vesículas, la cual puede oscilar entre en 20 y el 65% (a menor fuerza iónica mayor eficacia de encapsulación). Posteriormente, el mismo Szoka, propuso la extrusión secuencial de los liposomas obtenidos en fase reversa, como alternativa para reducir tanto el tamaño como la polidispersión, si bien la eficacia de encapsulación disminuye en relación a las vesículas sin extruir. Vesículas de tipo unilamelar pequeño se pueden obtener a partir de MLV por una técnica de microfluidificación, la cual consiste en producir colisiones entre los liposomas al hacerlos pasar rápidamente a presión, a través de filtros de membrana de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Este proceso se repite una serie de veces, de manera que se estima que después de 10 ciclos se pueden obtener SUV de tamaño inferior a 100 nm. (29). **Ver figura 1**

La liofilización de vesículas SUV seguida de una fase de rehidratación se ha propuesto como un procedimiento sencillo para obtener liposomas con elevada capacidad de encapsulación. Este método ha sido recientemente modificado de manera que es posible obtener liposomas de tamaño submicrométrico y con una dispersión muy estrecha, estériles y libres de pirógenos.



**Figura 1. - 1)** Fosfolípidos disueltos en un solvente orgánico puestos en contacto con una solución acuosa donde se encuentra disuelto el activo **2)** para que posteriormente sea formada la emulsión (w/o) que debe tener un tamaño de gotícula que le confiera estabilidad durante la evaporación del solvente **3)**. Próximo a finalizar el proceso de evaporación del solvente orgánico **4)**, es evidente la formación de un gel, que al colapsar permite inversión de fases **5)** y formar los sistemas liposomales **6)**, que normalmente son de tipo LUV, aunque muchas veces al incrementar la concentración de PC pueden obtenerse MLV's. (29)

## 2.3 Marco teórico.

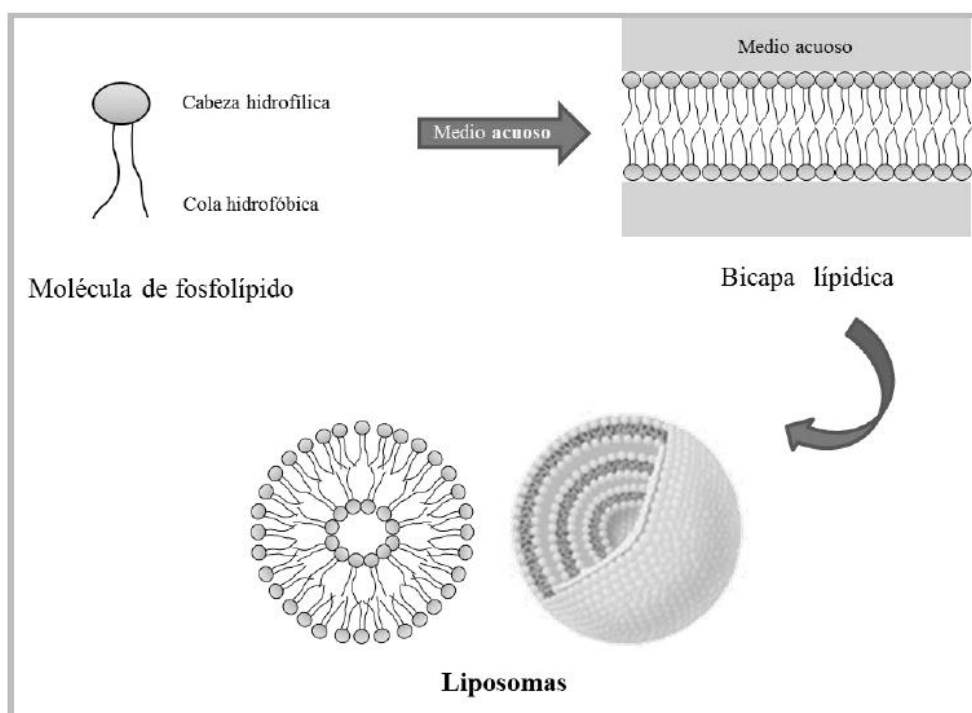
### 2.3.1 Liposomas

La versatilidad de los liposomas se refleja en primer lugar por su capacidad para incorporar moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también de carácter anfifílico a su estructura (17). Además, sus propiedades físicas como la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad/rigidez de la pared y su capacidad de carga pueden ser fácilmente modulables, además utilizando lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie de estas vesículas, que

se convierten en sistemas de transporte con capacidad para acceder, por ejemplo, específicamente a un determinado tejido/célula tumoral (site-specific targeting), de una forma bastante parecida a la que es de suponer había previsto Paul Ehrlich cuando introdujo el concepto de bala mágica (18).

Los liposomas son vesículas que envuelven un volumen acuoso. Están formados por una o multiplex bicapas de lípidos formadas por el autoensamblaje de moléculas anfifílicas. La **figura 2** muestra la estructura de las vesículas.

Estas vesículas pueden encapsular moléculas hidrófilas en el espacio acuoso interno, o bien moléculas lipófilas o anfifílicas que se incrustan en sus bicapas concéntricas (37).



**Figura 2.** Estructura de los liposomas (39)

Para referirse a los distintos tipos de liposomas se puede recurrir al criterio que tiene en cuenta su tamaño y el número de bicapas o lamelas que conforman la pared de la estructura vesicular. Otra alternativa podría ser referirse a ello haciendo alusión al procedimiento por el que han sido obtenidos. Las dos posibles clasificaciones y la nomenclatura utilizada en cada caso se recogen en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1.** Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del tamaño y la lamelaridad.

Abreviatura	Nombre completo/lamellaridad	Tamaño
MLV	Vesículas multilaminares	> 0,5 $\mu\text{m}$
OLV	Vesículas oligolamelares	0,1 - 1 $\mu\text{m}$
UV	Vesículas unilamelares	Todos los rangos de tamaños
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas	40 - 100 nm
LUV	Vesículas unilamelares grandes	> 400 nm
GUV	Vesículas unilamelares gigantes	> 1 $\mu\text{m}$
MVV	Vesículas multivesiculares	> 1 $\mu\text{m}$

**Tabla 2.** Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del método de preparación

Abreviatura	Nombre completo/método de preparación
REV	Vesículas uni u oligolamelares
MLV-REV	Vesículas multilamelares obtenidas por evaporación en fase reversa
SPLV	Vesículas estables plurilamelares
FATMLV	Vesículas multilamelares obtenidas por ciclos repetidos de congelación/descongelación
VET	Vesículas obtenidas por extrusión
LUVET	Vesículas unilamelares grandes obtenidas por extrusión
DRV	Vesículas obtenidas por deshidratación/rehidratación

Los liposomas se pueden obtener aplicando distintas metodologías, que conducen a la formación de vesículas con características diferentes en función del procedimiento aplicado (tamaño y distribución de tamaños, lamellaridad, eficacia de asociación), lo que sugiere que diversos mecanismos pueden estar implicados en este proceso de formación. El componente mayoritario de estas estructuras son lípidos (en particular fosfolípidos) que, cuando se encuentran en un medio acuoso a una temperatura próxima a su temperatura de transición de fase, tienen la capacidad de formar estas estructuras vesiculares cerradas, incluso de manera espontánea. Si la situación de partida es un film lipídico que se hidrata con una solución acuosa mediante agitación mecánica,

entonces lo que se obtienen son vesículas multilaminares de tamaño relativamente grande y heterogéneo, siendo éste además de los procedimientos de fabricación propuestos, el más sencillo y el más popular (15). Se dispone de procedimientos sofisticados que rinden vesículas con un tamaño más homogéneo (38) (**Ver figura 3**).

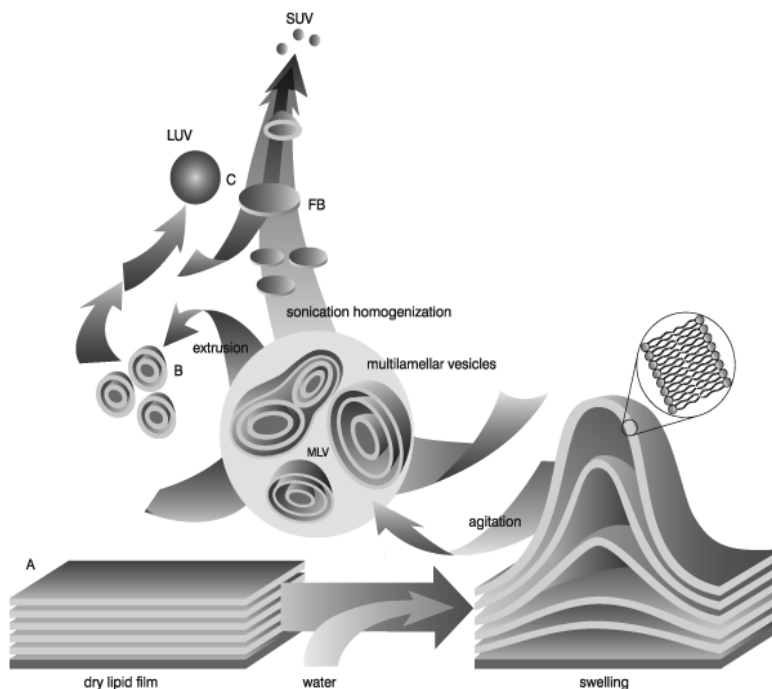


Image from Lasic, D.D., Recherche 20, 904, 1989

**Figura 3.** Procedimientos para la obtención de Liposomas (MLV, LUV y SUV). A: Método de dispersión simple para la obtención de MLV, mediante agitación de películas lipídicas hidratadas. B: Método de extrusión de MLV a través de membranas de policarbonato para la obtención de LUV. C: Métodos de sonicación-homogenización de MLV para la preparación de SUV. (38)

Partiendo de estas vesículas multilaminares y aplicando ultrasonidos, se pueden obtener liposomas unilamelares de tamaño pequeño, tal y como propusieron por primera vez en 1962 Saunders y col. (27).

Para controlar el diámetro de vesícula, la lamelaridad y también la homogeneidad del tamaño de los MLV obtenidos por hidratación de una película de fosfolípidos, es posible aplicar un procedimiento de extrusión a la suspensión heterogénea de vesículas MLV, que consiste en hacerlas pasar a través de filtros de membrana de policarbonato con un tamaño de poro

determinado. El número de veces que se repita esta operación, así como el diámetro de poro utilizado para llevarla a cabo, determina la lamellaridad y la dispersión de tamaños de la suspensión final de liposomas (22). La formación de la película de lípidos que representa la primera etapa de la preparación liposomas MLV en todos los casos anteriormente citados, requiere el uso de importantes cantidades de disolventes orgánicos que plantean importantes problemas de toxicidad ya que pueden comprometer la seguridad del producto final obtenido, además de suponer un inconveniente serio para la obtención de liposomas a nivel industrial, dado el impacto medioambiental que supone el empleo de disolventes. Como consecuencia, se han propuesto procedimientos alternativos que requieren el uso de disolventes menos tóxicos, como el etanol, en los que la formación de los liposomas se produce por la inyección de una solución etanólica de lípidos en un medio acuoso de volumen considerablemente mayor. De esta manera los liposomas se forman espontáneamente, y se logra un control mínimo de sus características (tamaño, lamellaridad, etc.) a través de la relación de volúmenes de etanol/agua, la velocidad de inyección o la concentración inicial de lípidos utilizada (14). El etanol utilizado se puede eliminar fácilmente, por ejemplo, por diálisis. Si bien lo que limita en la práctica la utilización de este procedimiento es la posible inactivación de muchas biomoléculas en presencia del etanol.

### 2.3.2 Proteína de Leche Hidrolizada.

El nombre proteína proviene del griego proteios, que significa primero. No se puede imaginar un nombre más adecuado para esta clase de biopolímeros esenciales y omnipresentes, ya que están presentes en todas las células vivas y participan en todos los procesos celulares. Las proteínas son las macromoléculas más versátiles en los sistemas vivos y cumplen funciones cruciales en prácticamente todos los procesos biológicos. Son los elementos activos de las células, los caballos de batalla de la naturaleza.

Originarios de una variedad de fuentes naturales, los biopolímeros de proteínas, aminoácidos y proteínas funcionalizadas han demostrado beneficios para humectar, alisar y tensar la piel y para impartir acondicionamiento, cuerpo, protección y resistencia al cabello.

Para nuestro caso la Proteína de Leche Hidrolizada, sus beneficios clave y las aplicaciones recomendadas se resumen en la **tabla 3**. (32)

**Tabla 3.** Beneficio de la proteína de leche hidrolizada, G= Bueno, E= Excelente, R= Recomendado, HR= Altamente recomendado. (32)

Nombre del producto	Fuente	Beneficio principal
Hydrolactin 2500	Leche	Hidratante

Características y ventajas adicionales					
Uso en cabello y piel	Penetra al interior del cabello	Formación de película	Acondicionador de cabello y piel	Hidratante	Brinda sensación de piel suave
G	G	G	G	E	G

Aplicaciones				
Enjuagues para el cuidado de la piel	Cremas para el cuidado de la piel	Champús	Acondicionadores	Permanentes y ondulaciones
R	HR	R	R	R

Peso molecular promedio	Forma física	Actividad (%)	Nivel de uso sugerido (%)	Nombre INCI
1800	Polvo	90	0.5-5	Hydrolyzed Milk Protein

Debido a la retención de humedad y sustentabilidad del Hydrolactin 2500, éste es un valioso aditivo acondicionador para formulaciones de champús, enjuagues, fijadores, ondulados, cremas y lociones hidratantes, cremas nocturnas y lociones

Hydrolactin 2500, es producido por hidrólisis enzimática controlada y a su vez diferentes ácidos hidrolizados de proteínas de la leche, forman soluciones claras en agua y permanecen claras a pH ácidos.

Distribución Típica de Aminoácidos % p/p: Alanina 2.9, Arginina 3.6, Ácido aspártico 6.5. Cistina 0.4. Ácido glutámico 20.5, Glicina 1.8, Histidina 2.7, Isoleucina 5.8, Leucina 8.8, Lisina 7.0, Metionina 2.7, Fenilalanina 4.7, Prolina 10.4, Serina 5.9, Treonina 3.8, Triptofan 1.2, Tirosina 5.1, Valina 0.5. (31)

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo General

Comparar a escala de laboratorio dos métodos de preparación de liposomas, inyección de etanol y evaporación en fase reversa, para vehiculización de un componente funcional modelo de aplicación cosmética.

##### 3.1.1 *Objetivos específicos.*

- Generar un protocolo de preparación de liposomas a partir de los métodos de inyección de etanol y evaporación en fase reversa.
- Determinar el tamaño y el potencial Z de los liposomas formados en cada uno de los métodos de preparación, por medio del uso de una técnica de dispersión de luz dinámica.
- Comparar la eficiencia de encapsulación encontrada en cada método de preparación de liposomas.

#### 3.2 Resultados/Productos y potenciales beneficiarios:

Se encontró información sobre el comparativo entre dos sistemas para la obtención de liposomas y metodología estándar que puede ser referencia a estudiantes de pregrado y la industria Cosmética Colombiana, para la realización de experimentos en laboratorio a pequeña escala para la obtención de liposomas.

El alcance del proyecto va limitado a los siguientes aspectos:

- Creación de matriz de diseño experimental (diseño de mezcla, de 12 sistemas como aproximación), que considero diferentes variables, concentración de extracto de proteína de leche, Fuerza Iónica y Tiempo de espera, necesarias para la formación de los liposomas.
- Caracterización de cada unidad experimental mediante el uso de Z-sizer donde se mide el tamaño de partícula.



- Evaluación de la eficiencia de encapsulación del extracto en las matrices liposomales.
- Matriz de diseño experimental que relacione las variables de proceso en la formación de liposomas mediante la técnica de inyección de etanol y evaporación en fase reversa, con la respuesta respecto al tamaño y potencial zeta de los mismos ("Ventana experimental").
- Metodología específica para la encapsulación de Proteína de leche hidrolizada mediante las técnicas de inyección de etanol y evaporación en fase reversa para la obtención de sistemas liposomales con una distribución de tamaños definida.

En el proyecto no consideró evaluación de desempeño, ni funcionalidad de los liposomas.

El proyecto se concluyó en su totalidad en un periodo de tiempo de 6 meses.

## **4 Metodología Propuesta:**

Se prepararon liposomas: bajo un diseño de mezcla, de máximo 12 sistemas de composiciones diferentes, mediante las dos metodologías propuestas para la preparación de los liposomas.

### **4.1 Materiales**

Epikuron 200 (lecitina de soya) Cargill L09616 HHFEA, Epikuron 145V (Lecitina de soya) Cargill Lote. 025116HHFEB, Fosfolípido diferencial (DOPE), Colesterol, Proteína de leche hidrolizada en concentraciones del 0,5%, 1% y 2% (Hydrolactin 2500) Croda Lote. 0001222608 o componente funcional, Buffer Fosfato pH 6.8 de 10mM y 20mM

### **4.2 Equipos**

Centrifuga. Mikro 185

Agitador de vórtice IKA® VORTEX

Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instrument-UK)

Celdas para medición de tamaño DTS0012

Celdas para medición de potencial zeta DTS1061

Balanzas semi-microanalíticas

Ultrasonido E 120H Elmasonic

Rapid vap – Labconco.

Espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu.

### **4.3 Ensayos Preliminares**

Los ensayos preliminares se orientaron a fijar las condiciones que se mantendrían constantes en durante los ensayos para los dos métodos Inyección de Etanol y Evaporación en Fase Reversa, para la encapsulación de proteína de leche hidrolizada. En la etapa de formación de las vesículas se fijó la proporción volumétrica de fase acuosa y fase orgánica para cada método y se varió el tiempo de espera para la formación de vesículas y la fuerza iónica en 12 ensayos realizados por duplicado para cada método.

#### 4.4 Definición de espacio de diseño:

Teniendo en cuenta las condiciones previamente definidas, para obtener sistemas liposomales vacíos, se propuso un diseño factorial, donde se analizaron dos factores fuerza iónica y tiempo de espera para la formación de vesículas (aging time), con una variable independiente que es la concentración de proteína de leche, se sugiere como variables de respuesta diámetro hidrodinámico ( $D_H$ -nm), Polidispersidad (PDI) y potencial Z (ZP). **Ver tabla 4.**

**Table 4.** Combinaciones de tratamientos para el diseño

OrdenEst	Orden Corrida	TipoPt	Bloques	Fuerza iónica (mM)	Aging (min)
1	1	1	1	0	5
2	2	1	1	0	10
3	3	1	1	10	5
4	4	1	1	10	10
5	5	1	1	20	5
6	6	1	1	20	10
7	7	1	1	0	5
8	8	1	1	0	10
9	9	1	1	10	5
10	10	1	1	10	10
11	11	1	1	20	5
12	12	1	1	20	10

##### 4.4.1 Preparación de liposomas mediante inyección de etanol

Se presentaron los componentes de la fase orgánica (en etanol) y la fase acuosa (principios activos y buffer pH 6.8), de tal manera que indique los porcentajes en volumen, que a partir de soluciones madre preparadas según corresponda de Colesterol, Epikuron 200 y Epikuron 145V, se deben utilizar.

En un tubo eppendorf de 250uL, se adicionaron las cantidades de cada componente de la fase acuosa, se completaron a volumen según sea indicado a 100 uL con el medio respectivo (buffer pH 6,8). Al mismo tiempo, preparado en otro tubo de 2 mL la fase orgánica, con cada uno de los componentes disueltos en etanol absoluto.

Después de la preparación de ambas fases por separado, se inyectó la fase orgánica en la acuosa utilizando una jeringa de 5mL, de manera que la concentración de etanol en el medio sea reducida al 50%, es decir, una mezcla 1:1, entre ambas fases. Al final de este procedimiento, se tiene un volumen total de mezcla de 200 uL. Cuando se realizó la mezcla, se observó la formación de una turbidez incipiente en el medio. Posteriormente, se llevó a volumen total de 1000 uL.

En un tubo de ultrafiltración por centrifuga, se adicionaron 500 uL de cada una de las mezclas preparadas anteriormente (un tubo por cada mezcla); luego en la centrifuga se realizó el proceso de ultrafiltración utilizando unas condiciones de trabajo de 10,000 rpm, durante 6 minutos. Se repitió este procedimiento otra vez, con los 500 uL restantes de mezcla preparada. En cada caso se registraron los volúmenes retenidos y cuáles no.

Después del proceso de ultrafiltración, homogenice la fracción filtrada con ayuda de la micropipeta y calcule el volumen aproximado obtenido y de acuerdo con esta cantidad, lleve todas las muestras a un volumen final adecuado realizando lavados de la membrana, utilizando el buffer de pH 6,8. Finalmente complete a 1 mL. La fracción filtrada, debe ser almacenada para realizar el análisis de la eficiencia de la encapsulación (13).

#### 4.4.2 Preparación de liposomas mediante evaporación fase reversa:

Se parte de una disolución de los fosfolípidos en éter etílico que se mezcla con una fase acuosa en una relación de volúmenes 1:3 (fase orgánica/fase acuosa). Esta mezcla se emulsifica por ultrasonido obteniéndose una suspensión de micelas invertidas. A continuación, fue sometida a un proceso de evaporación empleando Rapid vap Labconcon (29) con vacío a 55°C, produciéndose al mismo tiempo una agregación de dichas micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel, la cual finalmente acaba por romper con la completa eliminación del solvente orgánico. Posteriormente se adiciona éter etílico y solución Api de buffer en partes iguales, el sistema se somete al proceso de evaporación nuevamente empleando Rapid vap con vacío a 30°C hasta eliminación del éter, luego este producto se adiciona buffer hasta completar volumen de 2,5ml, fue agitado mecánicamente usando un agitador vortex (IKA® VORTEX), Los productos fueron envasados en recipientes de vidrio y almacenados en ausencia de luz a 4°C. (29)

#### 4.4.3 Caracterización de liposomas.

El diámetro promedio y el índice de polidispersidad (PDI) fueron medidos en el Zeta Sizer® Nano ZS (Malvern Instruments). Para el diámetro promedio se utilizó la celda DTS1070 en donde se colocaron cerca de 1mL de la muestra diluida con Buffer Fosfato pH 6,8. El tipo de medida fue automática, con 3 mediciones del equipo por lectura y las lecturas por replica fueron 3, por lo que se obtuvieron para cada muestra 9 mediciones. El potencial Zeta fue medido en el mismo equipo utilizando la celda DTS1070 con la muestra diluida con Buffer Fosfato pH 6,8, con duración automática. Se realizaron 3 mediciones por lectura y 3 lecturas por replica.

#### 4.5 Presentación y discusión de resultados de Ensayos preliminares.

En los ensayos preliminares se fijaron las condiciones del proceso de fabricación en dos etapas fundamentales como son la formación de la emulsión y la evaporación del solvente ya que antes del desarrollo del diseño experimental es importante determinar las condiciones que estarán fijas durante el ensayo.

Para el método de ensayo de fase reversa, se buscó ajustar el método de acuerdo con los equipos disponibles en el laboratorio y la disminución de tiempo en cada ensayo durante la evaporación del solvente orgánico, se propuso una variación usando el Rapid vap Labconco, que permitió hacer en simultanea la evaporación del solvente de hasta 12 muestras de hasta 1 ml vs el rotavaporador que solo permite hacer una a la vez y de un volumen mayor.

En el proceso de optimización de emulsión w/o se eligió la proporción del solvente acuoso en relación con el solvente orgánico (éter). Esta proporción fue determinada de la revisión en artículos de investigación y principalmente en el artículo donde reportan la invención del método de fabricación elegido (29), en donde el volumen de éter en la formación de la emulsión debe ser 3 veces mayor al volumen de la fase acuosa.

La elección de condiciones de otra etapa del método de fabricación como la evaporación del solvente, se fundamentó en que la cantidad de éter residual en el sistema liposomal fuera la menor, que la evaporación del agua del sistema fuera mínima, Tras varias pruebas fue posible determinar las condiciones apropiadas para llevar a cabo este proceso. Los resultados de las condiciones determinadas para cada una de las etapas del método de fabricación se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Condiciones método de evaporación

Etapa	Variable	Condiciones	Equipo
Formación emulsión	Temperatura / Tiempo / Vacío	55°C – 30 min – 140 mbar	Rapid Vap
Evaporación de solvente	Temperatura / Tiempo / Vacío	30°C – 15 min – 140 mbar	Rapid Vap

#### 4.5.1 Obtención y caracterización de liposomas de ensayos Preliminares.

Los sistemas liposomales fueron obtenidos como dispersiones homogéneas. Los volúmenes correspondieron a las cantidades de fase acuosa adicionada en el inicio del proceso.

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas del éter y las condiciones de agitación, tiempo, temperatura y vacío, en las cuales se llevó a cabo el proceso de evaporación, se consideró que este solvente orgánico fue evaporado en su totalidad. Lo ideal hubiese sido realizar un análisis por cromatografía de gases para la determinación de solvente residual, pero se consideró que para esta aproximación era suficiente mantener las condiciones de la etapa de evaporación. De cualquier manera, en caso de que se desee realizar un proceso de producción industrial, la determinación del solvente residual sería un análisis necesario en control de calidad del producto final.

Los resultados de la caracterización de los sistemas liposomales obtenidos son mostrados en las **Tablas 6 y 7**. El diámetro promedio de los sistemas liposomales vacíos, se encuentran en el rango de nanómetros. Pensado en su administración tópica y con una adecuada permeación transdérmica, es deseable que las vesículas tengan el tamaño más pequeño posible (33) con un PDI cercano a cero (34). Basados en estos dos parámetros nos enfocaremos en la preparación de liposomas tipo SUV, para lo cual se seleccionaron las condiciones de tiempo de reposo 10 minutos y fuerza iónica de 10 mM, aplicando a ambos métodos propuestos. **Ver tabla 8.**

**Tabla 6.** Resultados método de Inyección de Etanol

OrdenEst	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	Fuerza ionica (mM)	Aging (min)	DH(nm)	ZP	PDI
1	1	1	1	0	5	229,07	-12,90	0,15
2	2	1	1	0	10	275,47	-15,30	0,23
3	3	1	1	10	5	158,43	-17,77	0,11
4	4	1	1	10	10	178,53	-22,50	0,13
5	5	1	1	20	5	142,63	-11,06	0,17
6	6	1	1	20	10	287,07	-32,70	0,24
7	7	1	1	0	5	341,13	-25,03	0,10
8	8	1	1	0	10	339,00	-15,87	0,03
9	9	1	1	10	5	271,43	-27,20	0,21
10	10	1	1	10	10	185,03	-19,93	0,17
11	11	1	1	20	5	340,33	-27,67	0,32
12	12	1	1	20	10	323,40	-19,70	0,36

**Tabla 7.** Resultados método de Fase Reversa

OrdenEst	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	Fuerza ionica (mM)	Aging (min)	DH(nm)	ZP	PDI
1	1	1	1	0	5	110,17	-30,13	0,19
2	2	1	1	0	10	262,67	-33,60	0,24
3	3	1	1	10	5	121,53	-26,97	0,21
4	4	1	1	10	10	162,03	-19,90	0,21
5	5	1	1	20	5	174,97	27,77	0,26
6	6	1	1	20	10	196,70	-24,87	0,26
7	7	1	1	0	5	207,70	-38,27	0,27
8	8	1	1	0	10	217,37	-36,13	0,26
9	9	1	1	10	5	154,77	-25,93	0,18
10	10	1	1	10	10	168,30	21,57	0,20
11	11	1	1	20	5	762,47	-12,39	0,15
12	12	1	1	20	10	1024,07	-10,59	0,17

El potencial zeta describe la carga superficial de la vesícula y su interacción en un medio acuoso. Este parámetro se considera que es un factor influyente en la estabilidad física del sistema debido a que ciertos valores pueden evitar fenómenos como aglomeración y coalescencia de las vesículas (35). Según los resultados, se encontró que los liposomas elaborados presentan un potencial zeta

negativo y los valores medios muestran que se presenten sistemas que posiblemente estén dispersos o con tendencia a aglomerarse, situación que puede llegar a no favorecer su estabilidad física (36)

Los factores de respuesta Diámetro Hidrodinámico (DH-nm), Polidispersidad (PDI) y potencial Z (ZP), fueron analizados en el software minitab, mediante la función de optimizador de respuesta para la obtención del porcentaje de deseabilidad para diferentes tamaños de vesículas, según los factores analizados (Fuerza Iónica y Aging) como sigue a continuación para cada metodología.

**Tabla 8.** Resumen de resultados de porcentaje de deseabilidad IE (inyeccion de etanol) y FR (Fase Reversa):

Método	lamelaridad	Tamaño vesícula	Deseabilidad	Fuerza iónica	Aging
IE	SUV	40nm	0,5665	10mM	10min
IE	SUV	80nm	0,5941	10mM	10min
IE	SUV	100nm	0,6100	10mM	10min
IE	LUV	400nm	0,7052	0mM	10min
IE	LUV	500nm	0,6321	0mM	10min
IE	LUV	600nm	0,5822	0mM	10min
IE	LUV	700nm	0,5451	0mM	10min
IE	LUV	800nm	0,5159	0mM	10min
IE	LUV	900nm	0,4921	0mM	10min
IE	GUV	1000nm	0,4722	0mM	10min
IE	GUV	1100nm	0,4551	0mM	10min

Método	lamelaridad	Tamaño vesícula	Deseabilidad	Fuerza iónica	Aging
FR	SUV	40nm	0,6646	10mM	10min
FR	SUV	80nm	0,6739	10mM	10min
FR	SUV	100nm	0,6787	10mM	10min
FR	LUV	200nm	0,6445	20mM	5min
FR	LUV	300nm	0,6729	20mM	5min
FR	LUV	400nm	0,7071	20mM	5min
FR	LUV	500nm	0,7149	20mM	5min
FR	LUV	600nm	0,6625	20mM	5min
FR	LUV	700nm	0,6227	20mM	5min
FR	LUV	800nm	0,5911	20mM	5min
FR	LUV	900nm	0,5650	20mM	5min
FR	GUV	1000nm	0,5430	20mM	5min
FR	GUV	1100nm	0,5240	20mM	5min



#### 4.6 Presentación y discusión de resultados para encapsulamiento de Proteína de Leche Hidrolizada.

##### 4.6.1 Obtención de liposomas a través de Inyección de Etanol y método de Fase Reversa.

De manera similar al desarrollo de los sistemas liposomales vacíos se siguió el procedimiento del numeral 4.4.1 y 4.4.2. Para la obtención de liposomas de ambos métodos, esta vez incorporando en la fase acuosa el API (proteína de leche hidrolizada en las concentraciones descritas en la **tabla 9 y tabla 10**)

**Tabla 9.** Formulaciones de liposomas - Fase reversa

Formulación	Epikuron 200 (mg)	Epikuron 145 (mg)	Colesterol (mg)	Api (mg)	Éter etílico (ml)	Buffer (ml)
1	0,13	0,127	0,064	0,5	0,250	2,250
2	0,13	0,127	0,064	1,0	0,250	2,250
3	0,13	0,127	0,064	2,0	0,250	2,250

**Tabla 10** Formulaciones de liposomas - Inyección de etanol

Formulación	Epikuron 200 (mg)	Epikuron 145 (mg)	Colesterol (mg)	Api (mg)	Etanol (ml)	Buffer (ml)
1	0,13	0,127	0,064	0,5	0,1	0,9
2	0,13	0,127	0,064	1,0	0,1	0,9
3	0,13	0,127	0,064	2,0	0,1	0,9

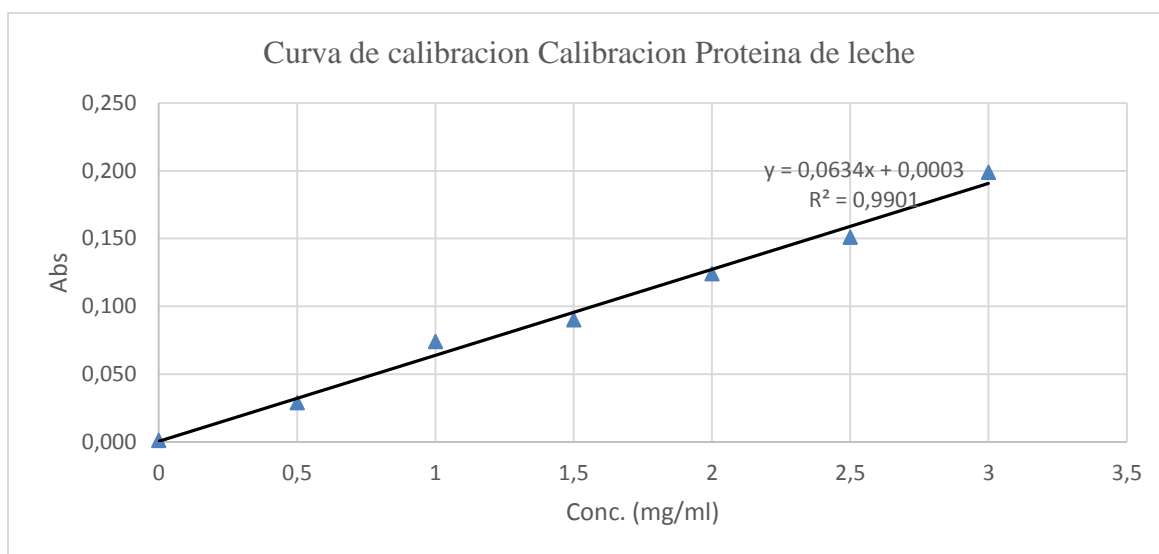
##### 4.6.1.1 Determinación de eficiencias de encapsulación.

A continuación, se verificó el volumen de las fracciones filtradas con ayuda de la micropipeta y se calculó el volumen aproximado obtenido. La fracción filtrada, se usó para realizar el análisis de la eficiencia de la encapsulación.

La fracción retenida se usó para la caracterización de liposomas.

Se calculó de la eficiencia de encapsulación: Con la fracción colectada en el filtrado (fondo del tubo de filtración), realizando la toma de absorbancia a una longitud de onda de 275 nm en Espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu.

Nota: Previamente se realizó la lectura de absorbancia a 275nm, de la solución preparada del componente funcional en diferentes concentraciones para general la curva de calibración ver **Gráfico 4**.



**Gráfico 4.** La curva de calibración Proteína de leche en Espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu,

La eficiencia de encapsulación porcentual puede calcularse como:

$$\%EE = \frac{\text{Absorbancia muestra} \times FD}{\text{Absorbancia de solución de carga} \times FD}$$

FD: Factor de dilución, según sea el caso

#### 4.6.1.2 Caracterización de liposomas

De manera similar al desarrollo de los sistemas liposomales vacíos, el diámetro promedio de vesícula, el PDI y el potencial zeta fueron medidos utilizando el Zeta Sizer® Nano ZS (Malvern Instruments). Las condiciones de dilución, las celdas utilizadas y las condiciones de medida fueron las mismas. Ver **tabla 11 y 12**.

**Tabla 11,** Resumen resultados Método Fase reversa, Tamaño (DH-nm), potencial Z (ZP) y eficiencia de encapsulación (%EE).

Muestra	Concentración proteína de leche	Tamaño (nm)	Z	%EE
1	0,5 mg / ml	111,8	-31,5	0
2	0,5 mg / ml	113	-26,4	27,04
3	0,5 mg / ml	97,83	-36,4	0
4	1 mg / ml	101,5	-36,2	1,92
5	1 mg / ml	125,7	-30,9	0
6	1 mg / ml	234,3	-33,4	0
7	2 mg / ml	122,5	-28,8	1,6
8	2 mg / ml	92,25	-18,4	0
9	2 mg / ml	88,89	-30,6	12,24

**Tabla 12,** Resumen resultados Método Inyección de etanol - Tamaño (DH-nm), potencial Z (ZP) y eficiencia de encapsulación (%EE).

Muestra	Concentración proteína de leche	Tamaño (nm)	Z	%EE
1	0,5 mg / ml	151,9	-42,8	10,6
2	0,5 mg / ml	178,9	-17,9	28,6
3	0,5 mg / ml	149,1	-37,1	61,4
4	1 mg / ml	133,7	-11,9	0
5	1 mg / ml	154,6	-28,4	11,6
6	1 mg / ml	158,9	-16,3	12,3
7	2 mg / ml	145,9	-23,8	11,2
8	2 mg / ml	125,9	-29,4	0
9	2 mg / ml	139,7	-26,0	0

Como se puede observar en las gráficas factoriales en la definición del espacio de diseño ver anexos **6.1.1** y **6.1.2**, las combinaciones que arrojan los tamaños de liposomas tipo SUV, son tiempo de reposo 10 minutos y fuerza iónica de 10 mM, aplicando a ambos métodos propuestos. Ver **tabla 8**,

con una deseabilidad entre el 60% y 70%, Bajo estas condiciones se realizaron los ensayos para encapsular la proteína de leche hidrolizada.

Los resultados de la caracterización de los sistemas liposomales obtenidos mostrados la **tabla 11 y 12** para cada método nos muestran un diámetro promedio dentro del rango de nanómetros, con un diámetro de vesícula deseado SUV.

No se obtienen reproducibilidad en los resultados para la eficiencia de encapsulación se tiene como hipótesis errores en el método analítico, y posible mente durante la fabricación de las muestras para el estudio, para el método de inyección etanol los inconvenientes en los resultados pueden estar relacionados a la velocidad con la que se llevó a cabo el proceso de encapsulación al inyectar los fosfolípidos en la fase acuosa y posteriormente durante el proceso de ultrafiltración inconvenientes con la recuperación total del total de los filtrados y material retenido. Con respecto al método de Fase reversa, los inconvenientes pueden estar en gran medida relacionados a la variación en el método en la utilización del Rapid Vap Lanconco en reemplazo del Rotavaporador recomendado en la referencia (29), que se determinó usar como propuesta de optimización del método a escala de laboratorio, adicional a la cantidad de volumen definido para alcanzar la dilución correcta de 2,5ml para las mediciones definidas, lo cual para el proceso de ultrafiltración determino el uso de hasta dos tubos de filtración por muestra con un reusó de hasta 3 veces para filtrar el volumen total de muestra definido. (Durante los ensayos se pudo evidenciar que la reutilización de los tubos con membrana de filtración presento inconvenientes luego de utilizarlo por más de 2 veces)

#### 4.6.1.3 Resultados Análisis de One-way Anova

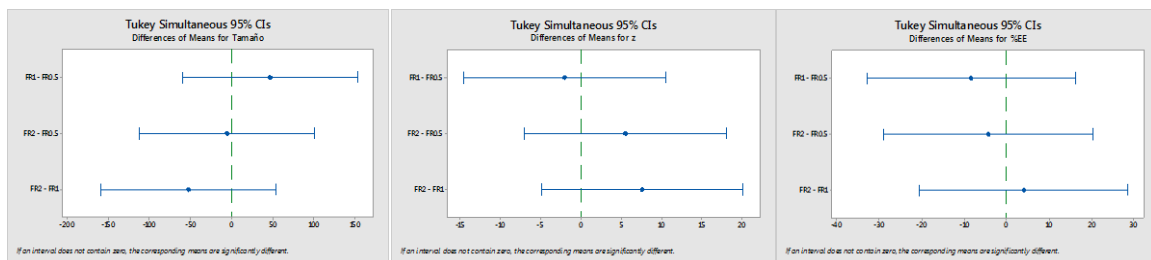
Se pudo observar en el análisis unidireccional Anova, que no se encontró diferencia significativa para las tres concentraciones de proteína de leche propuestas 0,5%, 1,0% y 2,0%, graficada individualmente para cada uno de los métodos, así como para cada uno de los factores evaluados en ambos métodos potencial Z, tamaño y eficiencia de encapsulación (**Anexo Anova 6.2 y 6.3**).

Se pudo observar en los resultados de valor p, para el método de fase reversa para la encapsulación de proteína de leche hidrolizada en las diferentes concentraciones de 0,5%, 1,0% y 2,0%, para cada

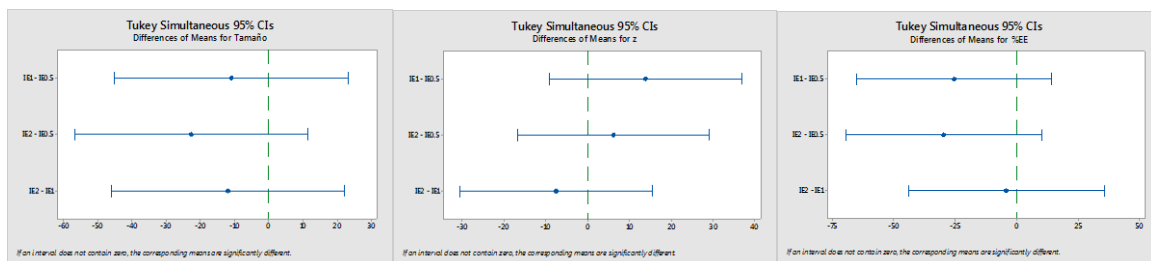
uno de los factores de respuesta establecidos que no hay diferencia entre los resultados puesto que el valor p es mayor que el nivel de significancia de 0.05.

También se pudo observar para los resultados de Media de agrupación bajo la prueba de Tukey

- Los intervalos de confianza de las diferentes concentraciones incluyen el cero, lo que indica que las diferencias no son estadísticamente significativas. **Grafico 5 y 6**



**Grafico 5** Prueba de Tukey Método de fase reversa



**Grafico 6** Prueba de Tukey Método de inyección de etanol

- El bajo valor R<sup>2</sup> (0.00%) indica que el modelo no genera predicciones para las nuevas observaciones. La imprecisión puede ser debido al pequeño tamaño de los grupos y los posibles errores en las metodologías analíticas. No es posible usar el modelo para hacer generalizaciones más allá de los datos de la muestra.
- El alto valor de S para el factor tamaño (nm) al bajo valor del R<sup>2</sup>, podría entenderse que el modelo no cumple con los supuestos, esto puede ser debido a errores en las metodologías analíticas durante la fabricación de la muestras., el valor S para los factores Z y %EE, aunque es mucho menor sigue sin ajustarse al modelo debido a los valores de R<sup>2</sup>.

El potencial zeta describe la carga superficial de la vesícula y su interacción en un medio acuoso. Según los resultados, se encontró que los liposomas elaborados presentan un potencial zeta negativo y los valores medios muestran una correspondencia a la tendencia que mostraron los sistemas a aglomerarse, situación que no favorecer su estabilidad física (36).

En general el análisis de los datos nos muestra una similitud en los dos métodos evaluados, en cuanto al tamaño de vesículas y el potencia Z, he incluso en la variación y poca reproducibilidad de los resultados de los porcentajes de encapsulación.

## 5 Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir:

1. Se realizó un diseño experimental que permitió la preparación de liposomas de acuerdo con los requerimientos de tamaño mencionados en referencias para las técnicas de inyección de etanol y evaporación en fase reversa, se determinaron todos los factores a evaluar Fuerza Iónica y Tiempo de espera para la formación de vesículas (Aging) y las variables de respuesta Diámetro Hidrodinámico (DH-nm), Polidispersidad (PDI) y potencial Z (ZP).
2. Para ambas metodologías no se evidencio diferencia significativa en la encapsulación de proteína de leche hidrolizada en las variables respuesta propuestas en el estudio, Los sistemas liposomales obtenido por ambas metodologías tienden a formar aglomerados rápidamente.
3. las metodologías de inyección de etanol y fase reversa necesitan ser revisadas y ajustadas para el proceso de encapsulación de proteína de leche, debido al bajo porcentaje de encapsulación y la no reproducibilidad de los resultados, los sistemas liposomales mostraron un bajo porcentaje de eficiencia de encapsulación, lo que sugiere plantear un estudio incorporando más factores al estudio, así como la validación de los métodos y variantes propuestas durante el estudio.
4. La obtención de liposomas usando la metodología de fase reversa y variando el sistema de evaporación agiliza los procesos de investigación a escala de laboratorio, permitiendo trabajar simultáneamente con más de 24 muestras para evaporación de solventes; Se obtuvo formación en conceptos básicos y detallados para la obtención de sistemas liposomales mediante el método de inyección de etanol y método de fase reversa. Lo que puede representar una ventaja competitiva especialmente en los sectores farmacéutico y cosmético.

## 5.2 Recomendaciones

1. En posteriores trabajos se sugiere evaluar diferentes condiciones de evaporación del solvente en la metodología de fase reversa modificada utilizando el equipo Rapid vap Labconco, e incluir tiempos intermedios en la formación de los liposomas que permitan seleccionar mejores especificaciones para la optación de liposomas más estables.
2. Durante el la ejecución de los análisis en laboratorio, se debió prescindir del uso del componente DOPE debido a la necesidad de este para otros estudios de la Universidad, se recomienda incluir en posteriores estudios, ya que en los estudios preliminares se pudo comprobar una diferencia en la estabilidad de las vesículas formadas.
3. De tener éxito en el ajuste del método analítico se sugiere incluir ensayo de permeabilidad transdérmica en celdas de Franz para la proteína de leche hidrolizada, como un factor más a evaluar.
4. Se sugiere realizar un estudio que permita la evaluación física y químicamente los sistemas liposomales desarrollados, tanto vacíos como con proteína de leche encapsulada y la evaluación de la integridad de la proteína luego del proceso de encapsulación

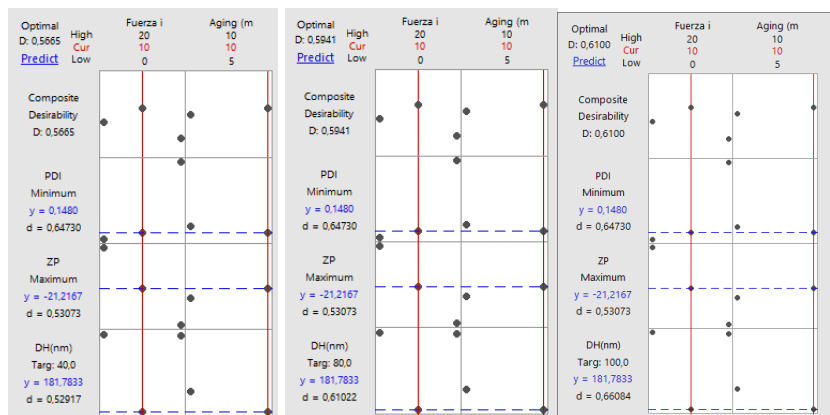


## 6 ANEXOS

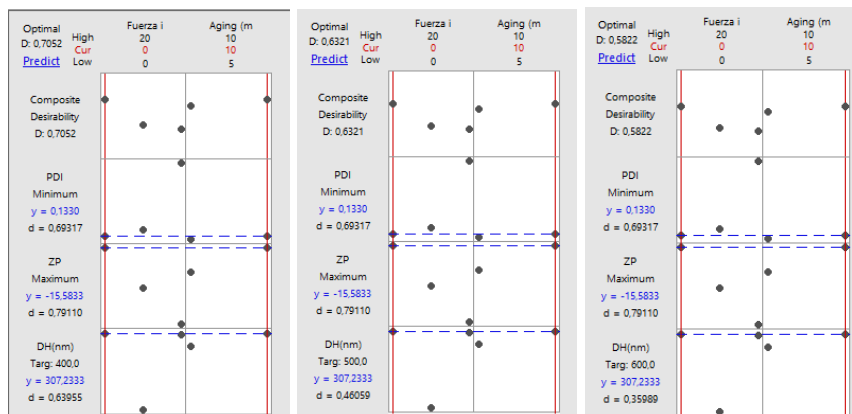
### 6.1 Anexos Análisis Factorial – Definición espacio de diseño

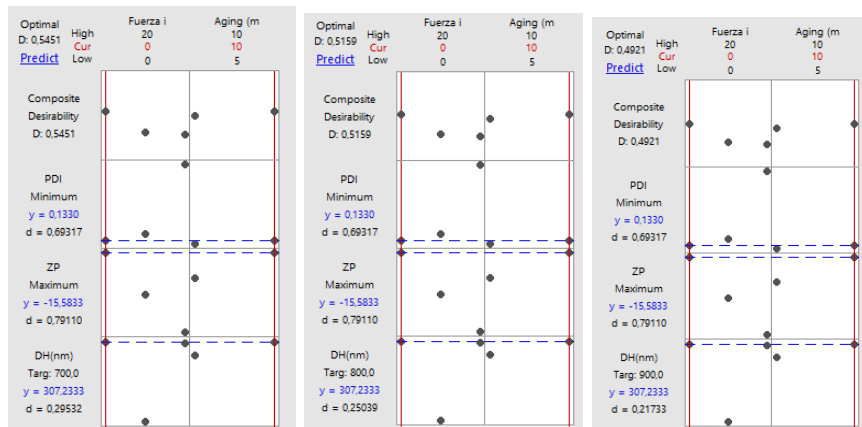
#### 6.1.1 Corrida Minitab - Deseabilidad para la obtención de vesículas de diferentes tamaños por el método de inyección de etanol.

Vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

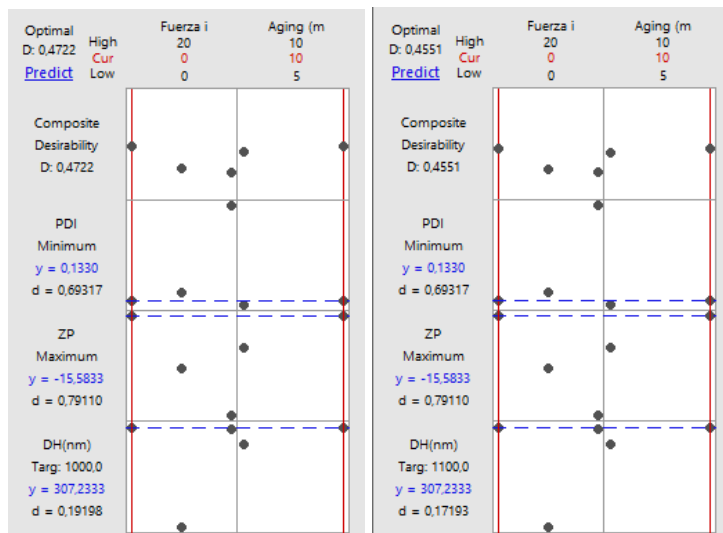


Vesículas unilamelares grandes (LUV).



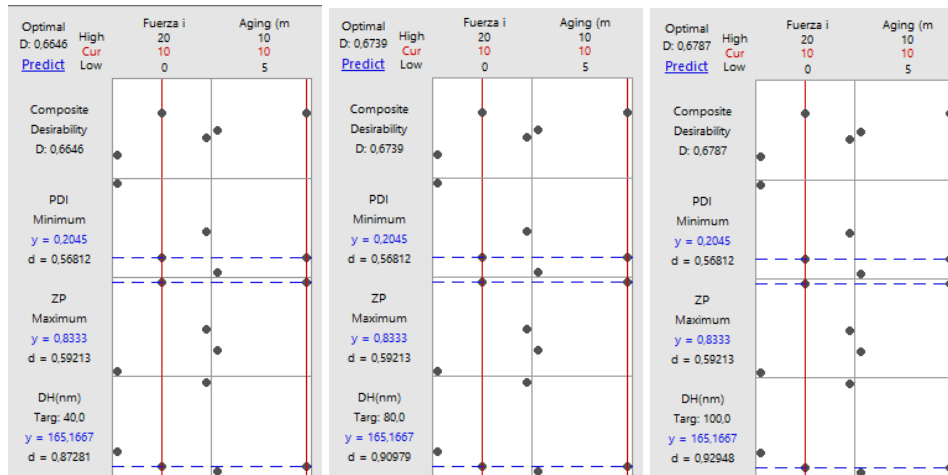


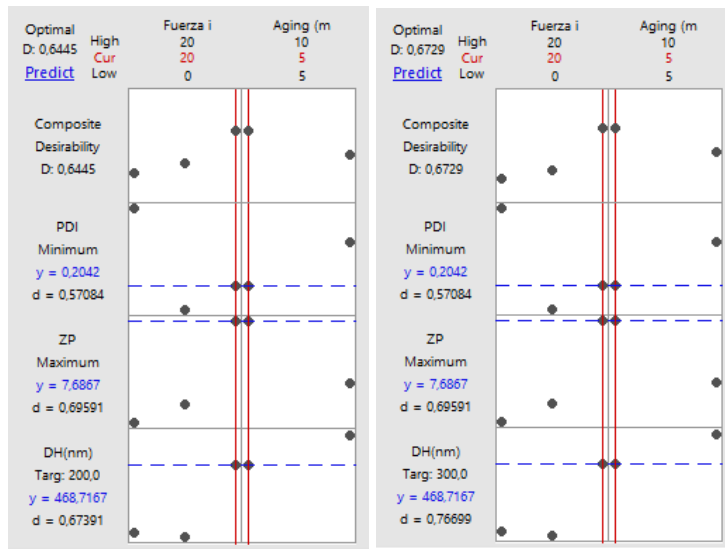
### Vesículas unilamelares gigantes (GUV).



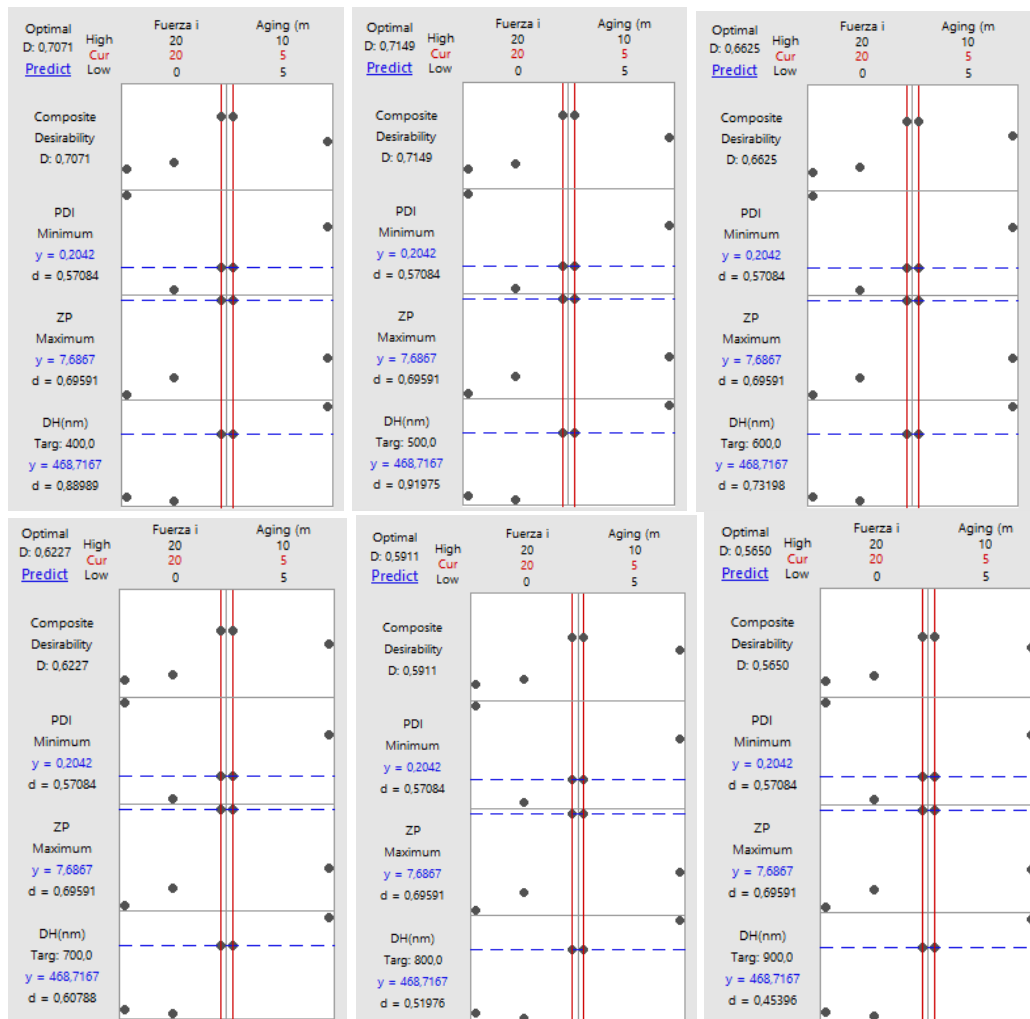
### 6.1.2 Deseabilidad para la obtención de vesículas de diferentes tamaños por el método de Fase Reversa.

#### Vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

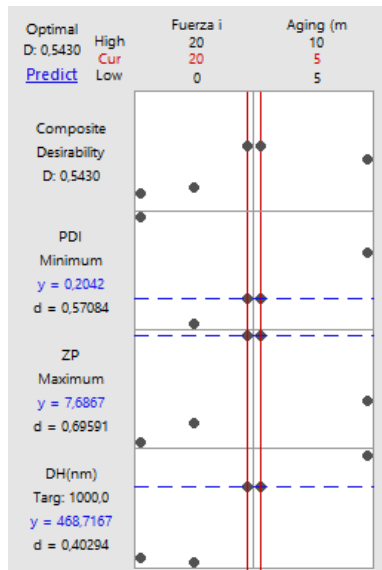




Vesículas unilamelares grandes (LUV).



Vesículas unilamelares gigantes (GUV).



## 6.2 Anexo Análisis de Anova Minitab Fase Reversa

### 6.2.1 One-way ANOVA: Tamaño versus Método

#### Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

#### Factor Information

Factor	Levels	Values
Metodo	3	FR0.5; FR1; FR2

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Metodo	2	4952	2476	1,37	0,323
Error	6	10833	1805		
Total	8	15784			

#### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
42,4906	31,37%	8,49%	0,00%

#### Means

Metodo	N	Mean	StDev	95% CI
FR0.5	3	107,54	8,43	(47,52; 167,57)
FR1	3	153,8	70,7	(93,8; 213,9)
FR2	3	101,2	18,5	(41,2; 161,2)

Pooled StDev = 42,4906

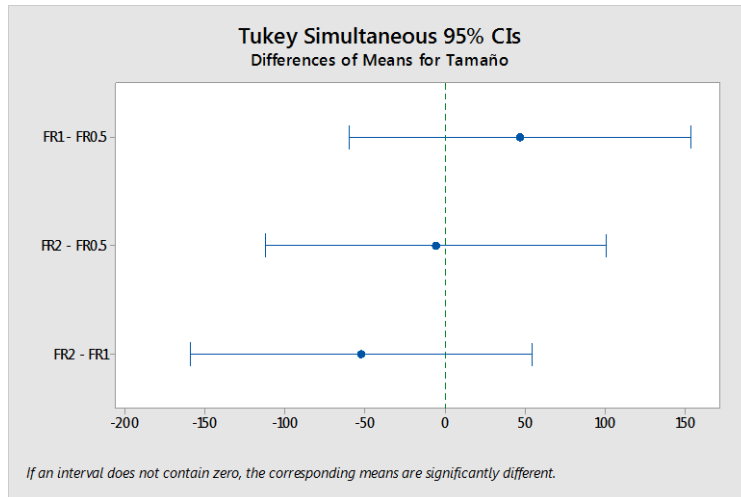
## Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

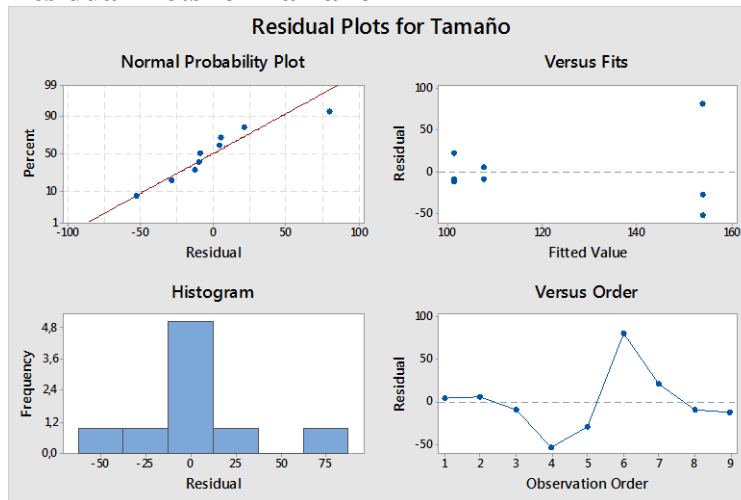
Metodo	N	Mean	Grouping
FR1	3	153,8	A
FR0.5	3	107,54	A
FR2	3	101,2	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### Interval Plot of Tamaño vs Metodo



### Residual Plots for Tamaño



### 6.2.2 One-way ANOVA: $z$ versus Metodo

#### Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

#### Factor Information

Factor	Levels	Values
Metodo	3	FR0.5; FR1; FR2

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Metodo	2	91,78	45,89	1,83	0,240
Error	6	150,81	25,14		
Total	8	242,59			

#### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
5,01354	37,83%	17,11%	0,00%

#### Means

Metodo	N	Mean	StDev	95% CI
FR0.5	3	-31,43	5,00	(-38,52; -24,35)
FR1	3	-33,50	2,65	(-40,58; -26,42)
FR2	3	-25,93	6,59	(-33,02; -18,85)

Pooled StDev = 5,01354

## Tukey Pairwise Comparisons

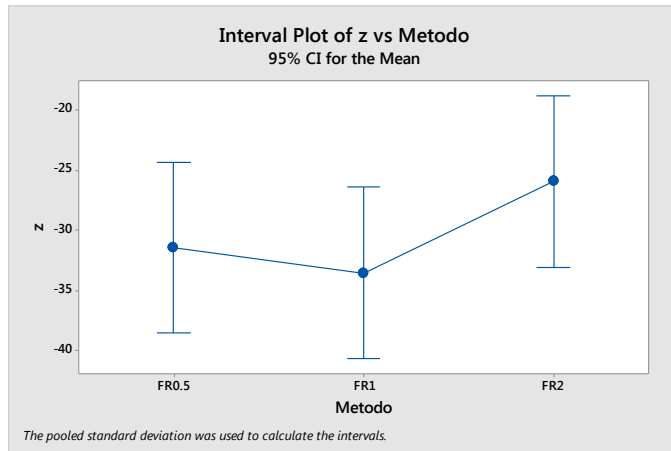
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Metodo	N	Mean	Grouping
FR2	3	-25,93	A
FR0.5	3	-31,43	A
FR1	3	-33,50	A

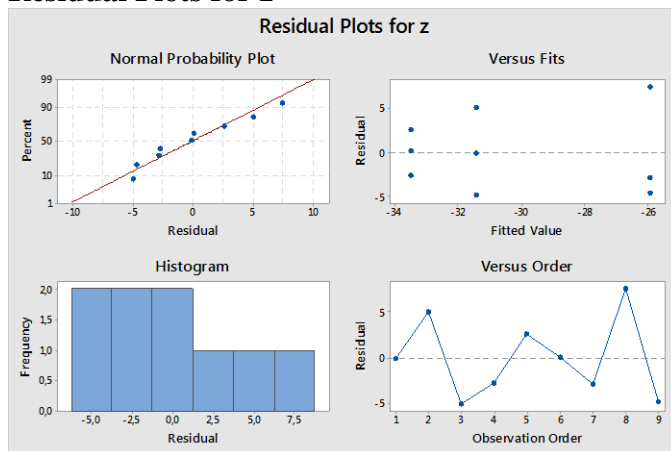
Means that do not share a letter are significantly different.



### Interval Plot of z vs Metodo



### Residual Plots for z



### 6.2.3 One-way ANOVA: %EE versus Metodo

#### Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

#### Factor Information

Factor	Levels	Values
Metodo	3	FR0.5; FR1; FR2

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Metodo	2	105,3	52,63	0,55	0,606
Error	6	578,4	96,40		
Total	8	683,7			

#### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
9,81859	15,40%	0,00%	0,00%

#### Means

Metodo	N	Mean	StDev	95% CI
FR0.5	3	9,01	15,61	( -4,86; 22,88)
FR1	3	0,640	1,109	(-13,231; 14,511)
FR2	3	4,61	6,65	( -9,26; 18,48)

Pooled StDev = 9,81859

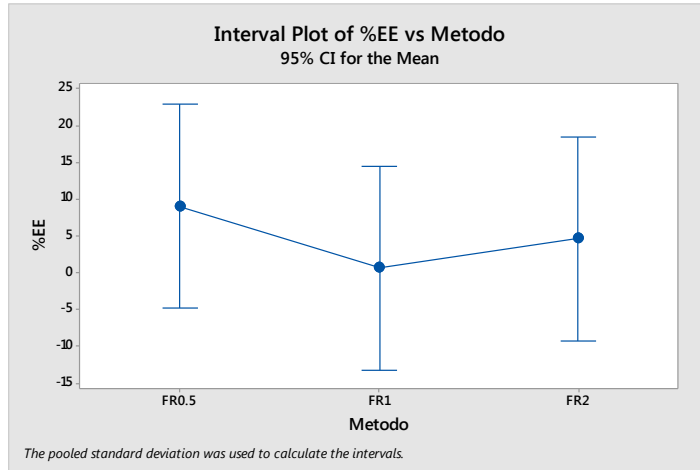
## Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

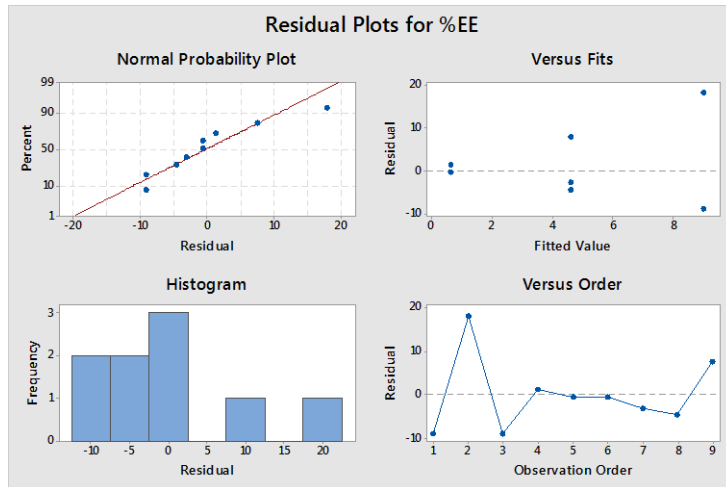
Metodo	N	Mean	Grouping
FR0.5	3	9,01	A
FR2	3	4,61	A
FR1	3	0,640	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### Interval Plot of %EE vs Metodo



### Residual Plots for %EE



### 6.3 Análisis de Anova Minitab Inyección de Etanol

#### 6.3.1 One-way ANOVA: Tamaño versus Metodo

##### Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

##### Factor Information

Factor	Levels	Values
Metodo	3	IE0.5; IE1; IE2

##### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Metodo	2	780,3	390,1	2,10	0,204
Error	6	1114,7	185,8		
Total	8	1895,0			

##### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
13,6302	41,18%	21,57%	0,00%

##### Means

Metodo	N	Mean	StDev	95% CI
IE0.5	3	159,97	16,46	(140,71; 179,22)
IE1	3	149,07	13,48	(129,81; 168,32)
IE2	3	137,17	10,24	(117,91; 156,42)

Pooled StDev = 13,6302

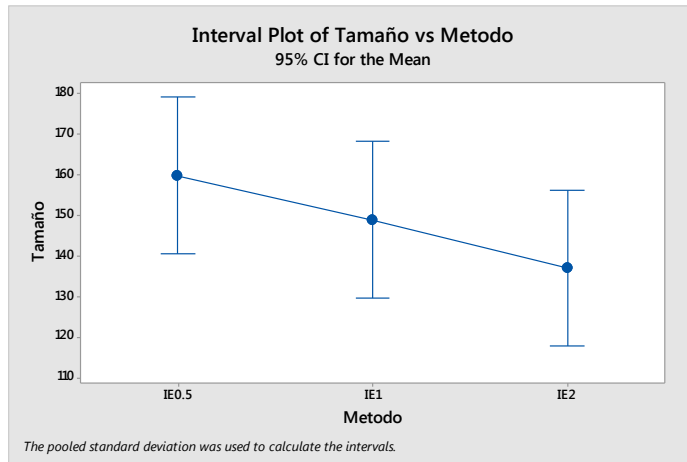
### Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

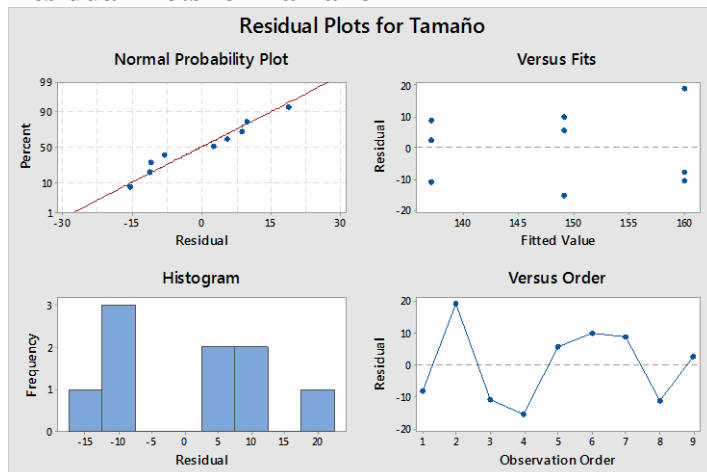
Metodo	N	Mean	Grouping
IE0.5	3	159,97	A
IE1	3	149,07	A
IE2	3	137,17	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### Interval Plot of Tamaño vs Metodo



### Residual Plots for Tamaño



### 6.3.2 One-way ANOVA: $z$ versus Metodo

#### Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

#### Factor Information

Factor	Levels	Values
Metodo	3	IE0.5; IE1; IE2

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Metodo	2	283,8	141,90	1,69	0,261
Error	6	502,3	83,72		
Total	8	786,1			

#### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
9,14974	36,10%	14,80%	0,00%

#### Means

Metodo	N	Mean	StDev	95% CI
IE0.5	3	-32,60	13,05	(-45,53; -19,67)
IE1	3	-18,87	8,54	(-31,79; -5,94)
IE2	3	-26,40	2,82	(-39,33; -13,47)

Pooled StDev = 9,14974

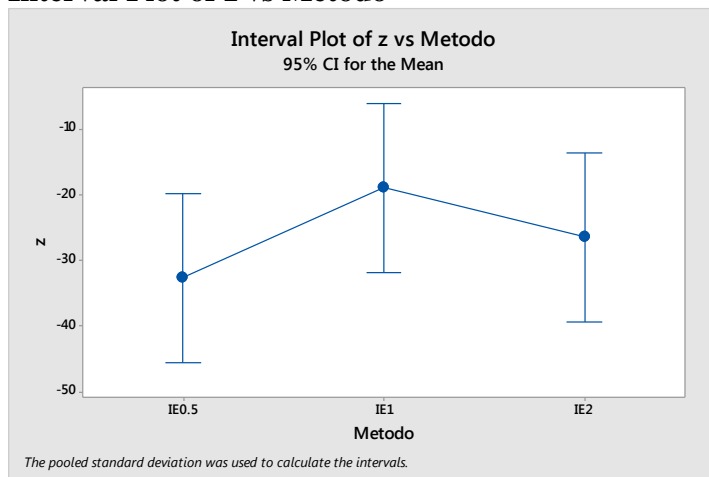
## Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

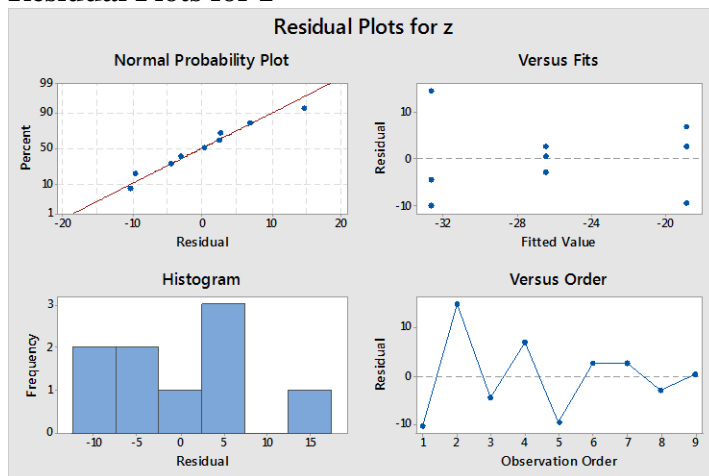
Metodo	N	Mean	Grouping
IE1	3	-18,87	A
IE2	3	-26,40	A
IE0.5	3	-32,60	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### Interval Plot of z vs Metodo



### Residual Plots for z



### 6.3.3 One-way ANOVA: %EE versus Metodo

#### Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

#### Factor Information

Factor	Levels	Values
Metodo	3	IE0.5; IE1; IE2

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Metodo	2	1560	779,8	3,11	0,119
Error	6	1506	251,0		
Total	8	3066			

#### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
15,8425	50,88%	34,50%	0,00%

#### Means

Metodo	N	Mean	StDev	95% CI
IE0.5	3	33,5	25,8	( 11,2; 55,9)
IE1	3	7,97	6,91	(-14,41; 30,35)
IE2	3	3,73	6,47	(-18,65; 26,11)

Pooled StDev = 15,8425

## Tukey Pairwise Comparisons

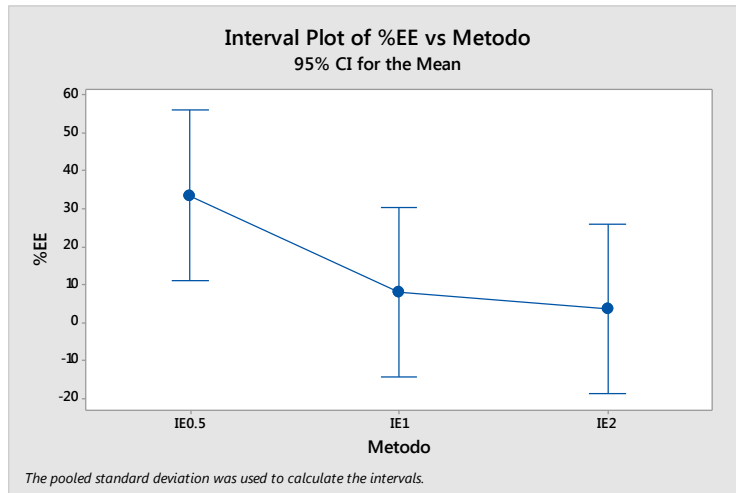
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Metodo	N	Mean	Grouping
IE0.5	3	33,5	A
IE1	3	7,97	A
IE2	3	3,73	A

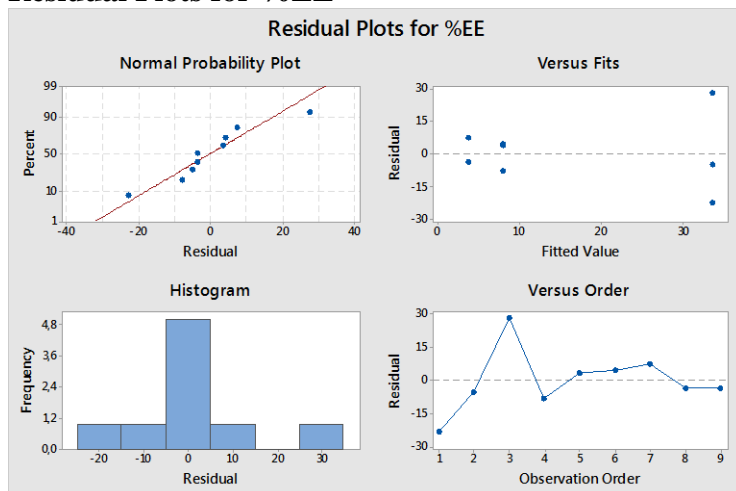
Means that do not share a letter are significantly different.



### Interval Plot of %EE vs Metodo



### Residual Plots for %EE



## 6.4 Anexo Gráficos distribución de tamaño, ensayos encapsulación de proteína de leche hidrolizada a diferentes concentraciones bajo el método de Fase reversa.

### Sample Details

Sample Name: Liposomas FR sample 1 mil protein 0.5% 1

SOP Name: Liposomas FR\_ Size.sop

General Notes:

File Name: Liposomas FR 0311201...	Dispersant Name: Water
Record Number: 1	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,52	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,000	Measurement Date and Time: viernes, 3 de noviembre de ...

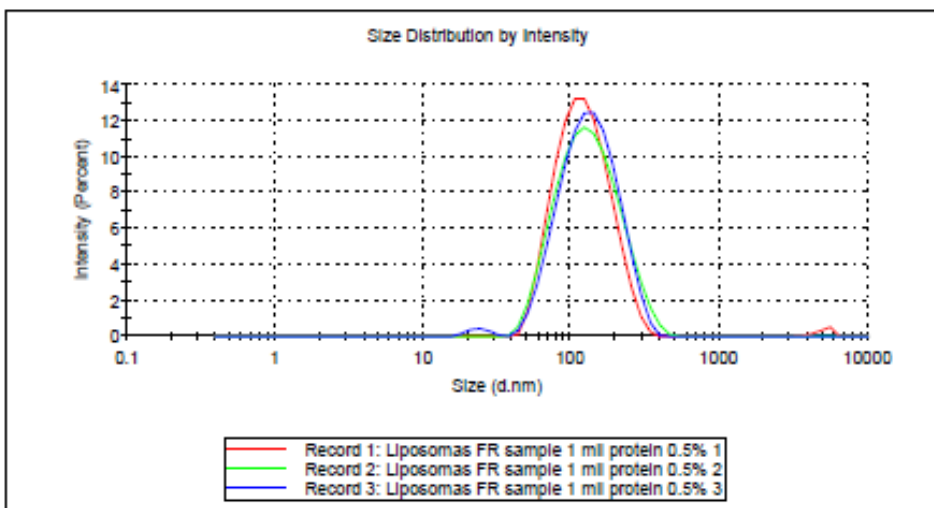
### System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 439,8	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 11

### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm): 111,8</b>	Peak 1: 127,5	99,0	52,37
<b>Pdl: 0,184</b>	Peak 2: 5076	1,0	564,7
<b>Intercept: 0,934</b>	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality **Good**



### Sample Details

**Sample Name:** Liposomas FR sample 1 mil protein 0.5% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas FR 0311201...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 4	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> viernes, 3 de noviembre de ...

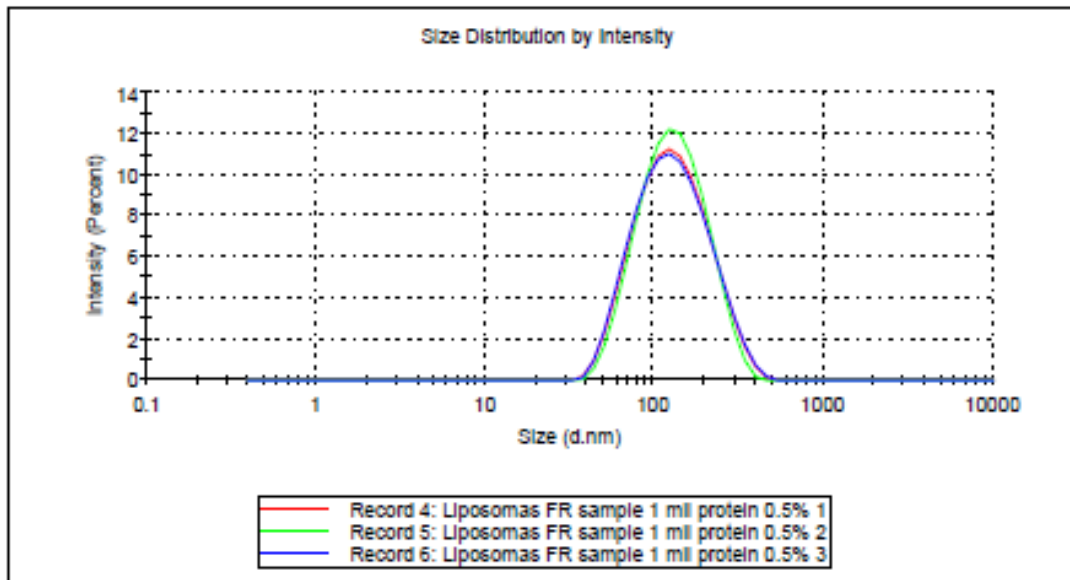
### System

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 60
<b>Count Rate (kcps):</b> 427,4	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 11

### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 113,0	<b>Peak 1:</b> 141,3	100,0	70,12
<b>Pdl:</b> 0,183	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,939	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



### Sample Details

**Sample Name:** Liposomas FR sample 3 milk protein 0.5% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas FR 0311201...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 8	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> viernes, 3 de noviembre de ...

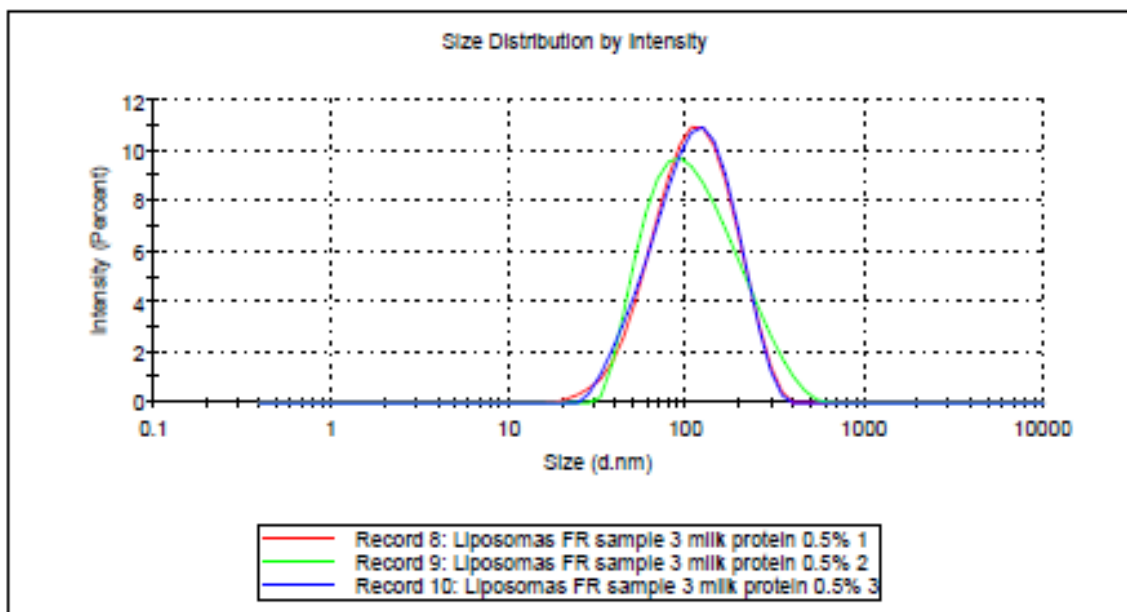
### System

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 70
<b>Count Rate (kcps):</b> 179,3	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 10

### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 94,95	<b>Peak 1:</b> 120,5	100,0	59,52
<b>Pdl:</b> 0,198	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,964	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



**Sample Details**

**Sample Name:** Liposomas FR sample 4 milk protein 1.0% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas FR 0311201...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 11	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> viernes, 3 de noviembre d..

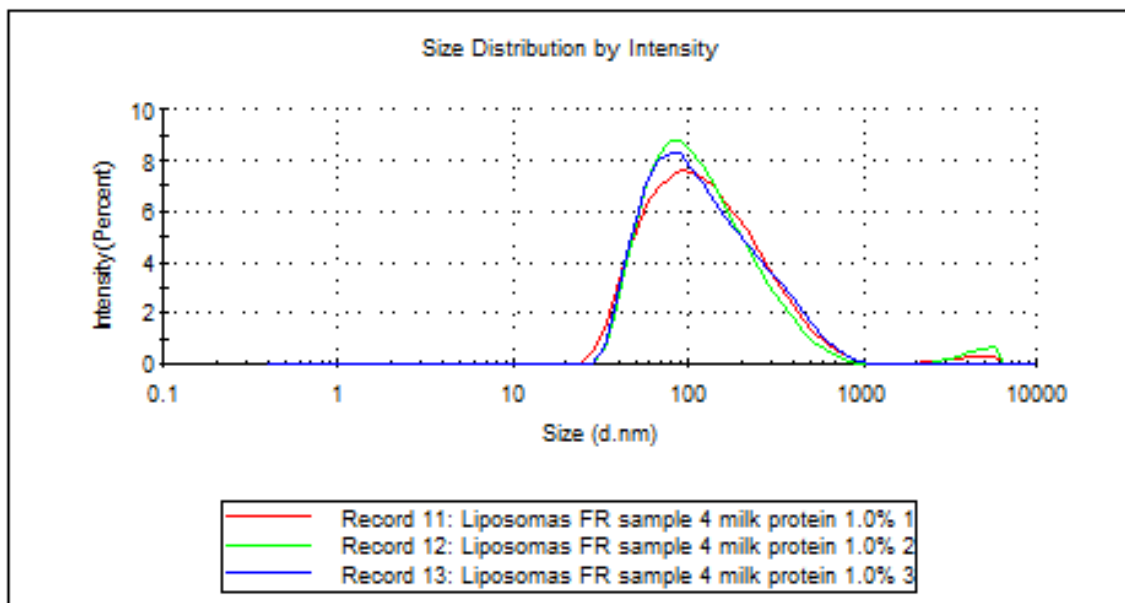
**System**

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 60
<b>Count Rate (kcps):</b> 299,3	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 10

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 101,7	<b>Peak 1:</b> 156,1	98,9	126,7
<b>Pdl:</b> 0,276	<b>Peak 2:</b> 4070	1,1	1059
<b>Intercept:</b> 0,954	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality:** Good



**Sample Details**
**Sample Name:** Liposomas FR sample 5 milk protein 1.0% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas FR 0311201...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 42	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> sábado, 4 de noviembre d..

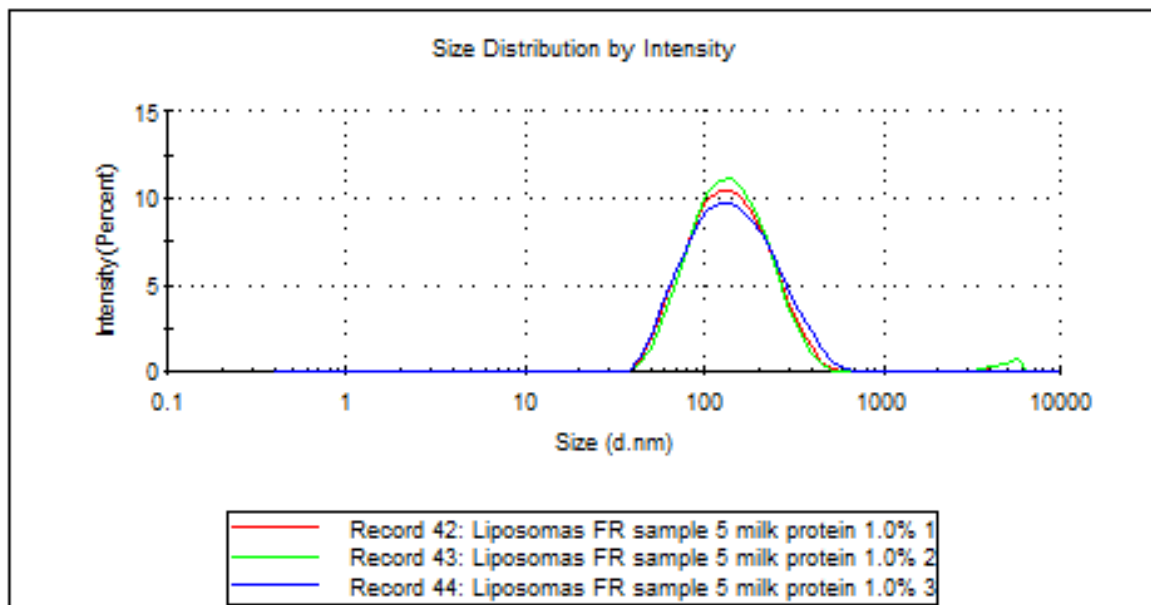
**System**

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 70
<b>Count Rate (kcps):</b> 191,8	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 10

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 127,4	<b>Peak 1:</b> 154,2	98,5	79,01
<b>PdI:</b> 0,233	<b>Peak 2:</b> 5046	1,5	583,4
<b>Intercept:</b> 0,966	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality :** Good



**Sample Details**

Sample Name: Liposomas FR sample 6 milk protein 1.0% 1

SOP Name: Liposomas FR\_ Size.sop

General Notes:

File Name: Liposomas FR 0311201...	Dispersant Name: Water
Record Number: 20	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,52	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,000	Measurement Date and Time: viernes, 3 de noviembre d...

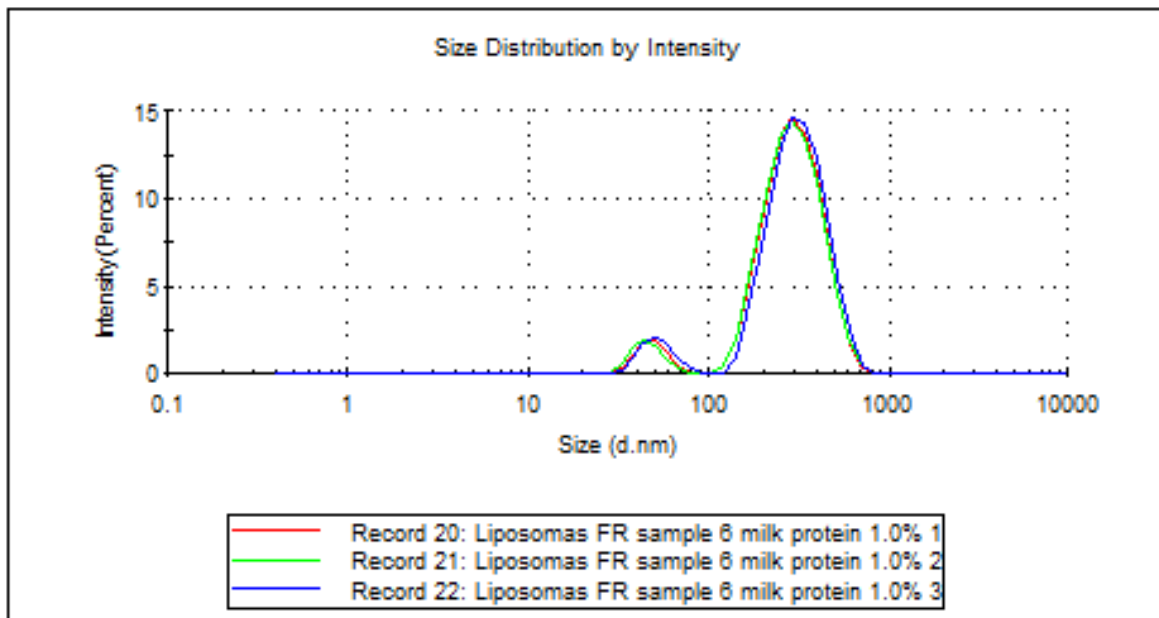
**System**

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 197,0	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 11

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 229,2	Peak 1: 313,0	93,6	108,2
Pdl: 0,266	Peak 2: 48,94	6,4	9,069
Intercept: 0,921	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**



**Sample Details**

Sample Name: Liposomas FR sample 7 milk protein 2.0% 1

SOP Name: Liposomas FR\_ Size.sop

General Notes:

File Name: Liposomas FR 0311201...    Dispersant Name: Water  
 Record Number: 23    Dispersant RI: 1,330  
 Material RI: 1,52    Viscosity (cP): 0,8872  
 Material Absorbtion: 0,000    Measurement Date and Time: viernes, 3 de noviembre d..

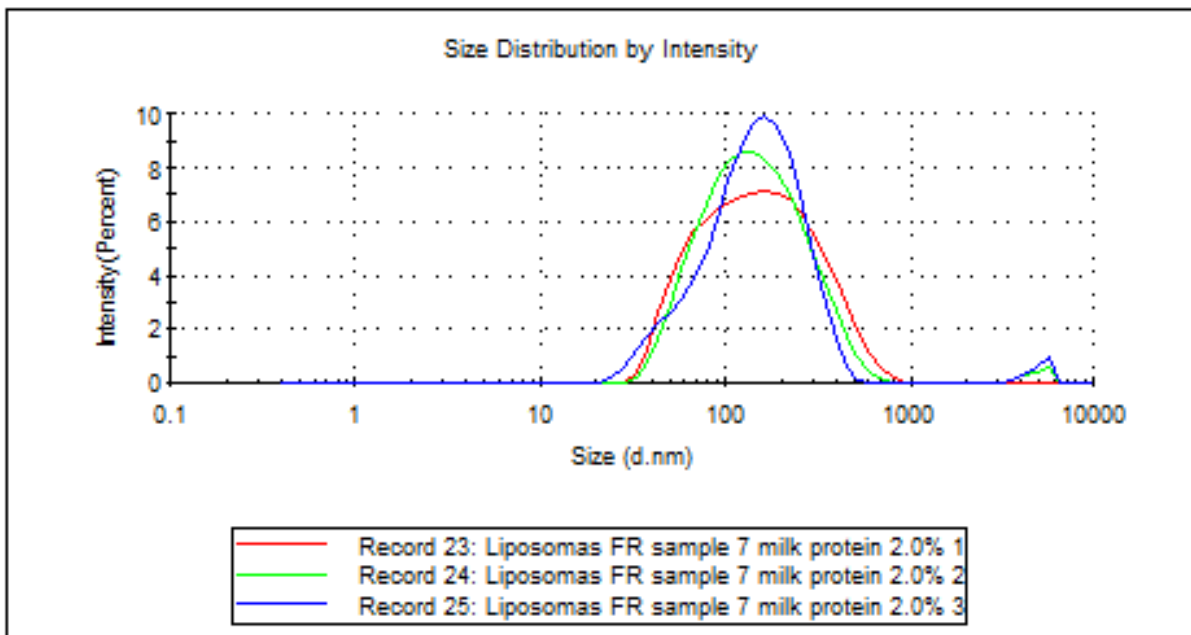
**System**

Temperature (°C): 25,0    Duration Used (s): 60  
 Count Rate (kcps): 446,0    Measurement Position (mm): 4,65  
 Cell Description: Disposable sizing cuvette    Attenuator: 11

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 119,6	Peak 1: 185,9	100,0	132,2
Pdl: 0,345	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,931	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**





**Sample Details**

Sample Name: Liposomas FR sample 8 milk protein 2.0% 1

SOP Name: Liposomas FR\_ Size.sop

General Notes:

File Name: Liposomas FR 0311201...    Dispersant Name: Water  
 Record Number: 27    Dispersant RI: 1,330  
 Material RI: 1,52    Viscosity (cP): 0,8872  
 Material Absorbtion: 0,000    Measurement Date and Time: viernes, 3 de noviembre d...

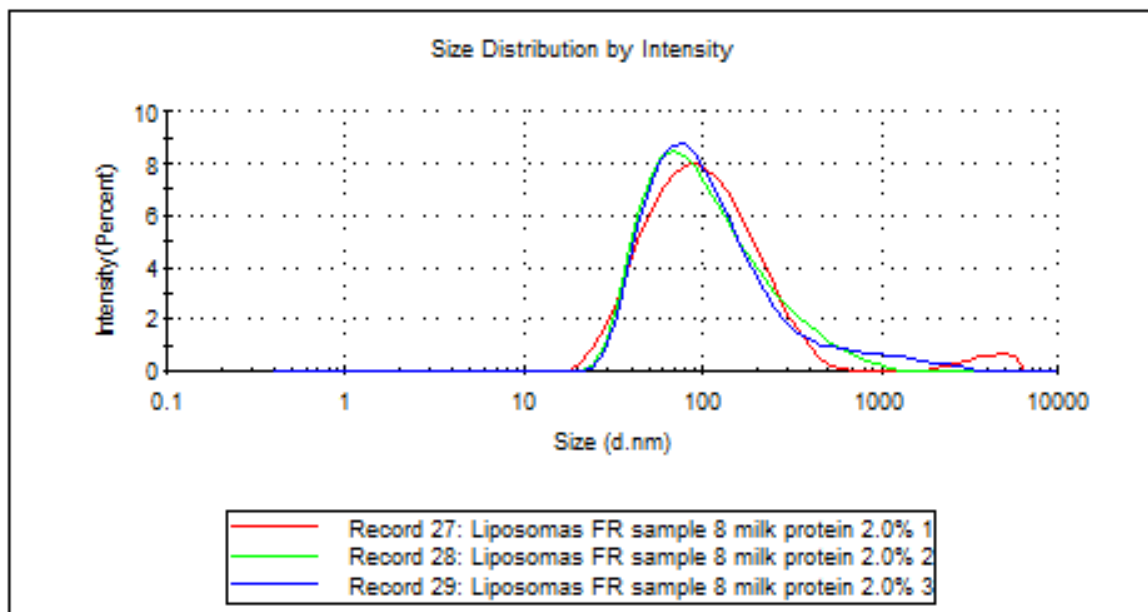
**System**

Temperature (°C): 25,0    Duration Used (s): 60  
 Count Rate (kcps): 463,0    Measurement Position (mm): 4,65  
 Cell Description: Disposable sizing cuvette    Attenuator: 11

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 85,47	Peak 1: 118,3	96,7	81,99
<b>Pdl:</b> 0,290	Peak 2: 4039	3,3	1069
<b>Intercept:</b> 0,931	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**



**Sample Details**
**Sample Name:** Liposomas FR sample 9 milk protein 2.0% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas FR 0311201...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 54	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> sábado, 4 de noviembre d..

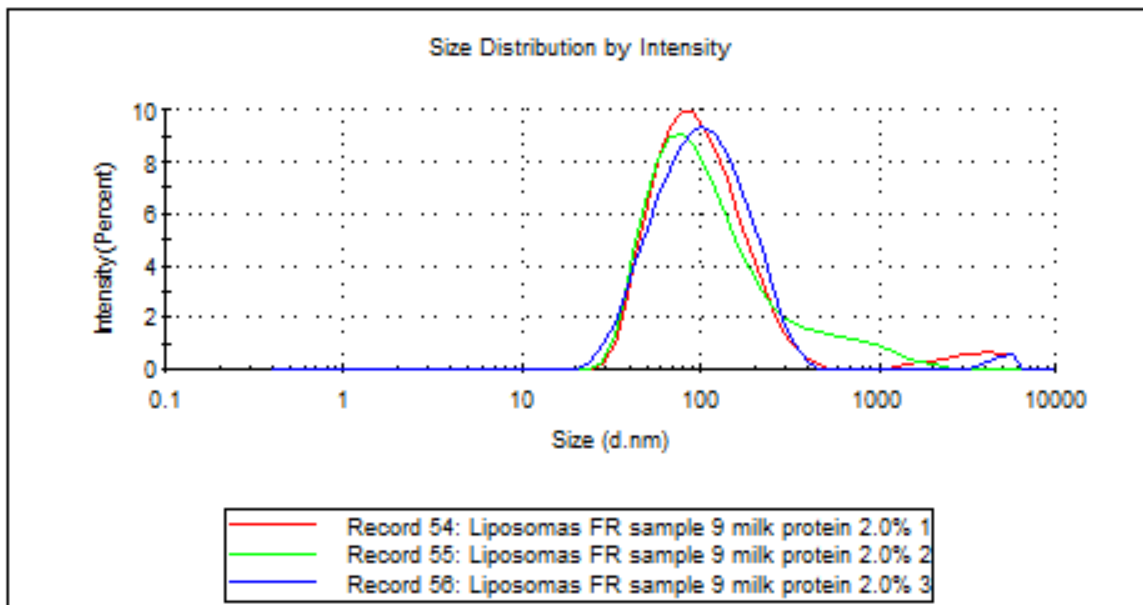
**System**

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 70
<b>Count Rate (kcps):</b> 238,1	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 10

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 89,73	<b>Peak 1:</b> 110,9	95,4	64,52
<b>Pdl:</b> 0,259	<b>Peak 2:</b> 3524	4,6	1246
<b>Intercept:</b> 0,983	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality :** **Good**



## 6.5 Anexo Gráficos distribución de tamaño, ensayos encapsulación de proteína de leche hidrolizada a diferentes concentraciones bajo el método de Inyección de etanol.

### Sample Details

Sample Name: Liposomas IE sample 1 Milk Protein .05% 1

SOP Name: Liposomas FR\_ Size.sop

General Notes:

File Name: Liposomas IE 01112017 ...	Dispersant Name: Water
Record Number: 2	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,52	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,000	Measurement Date and Time: miércoles, 1 de noviembre ...

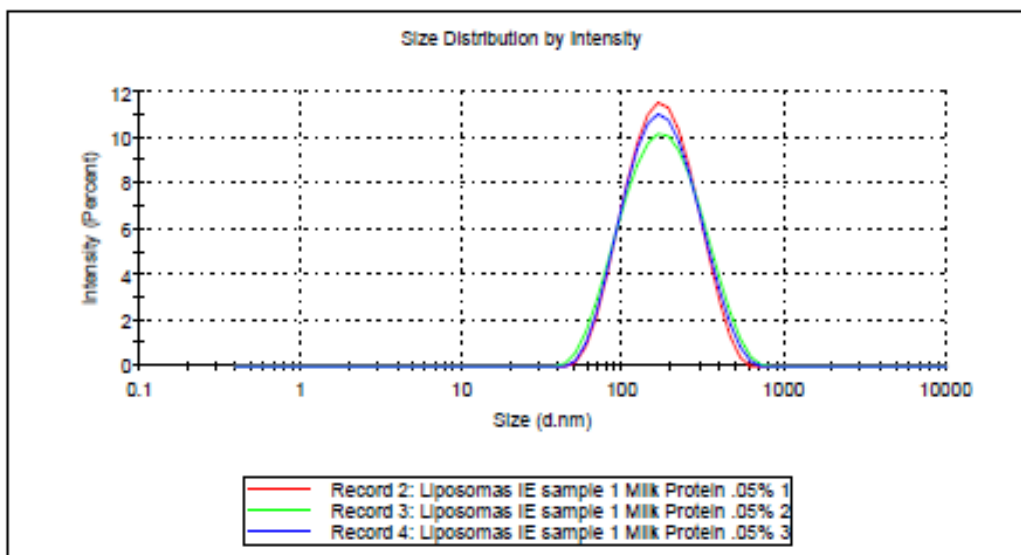
### System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 523,1	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 11

### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 151,9	Peak 1: 187,8	100,0	88,45
<b>Pdl:</b> 0,177	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,924	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality **Good**



**Sample Details**
**Sample Name:** Liposomas IE sample 2 Milk Protein .05% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

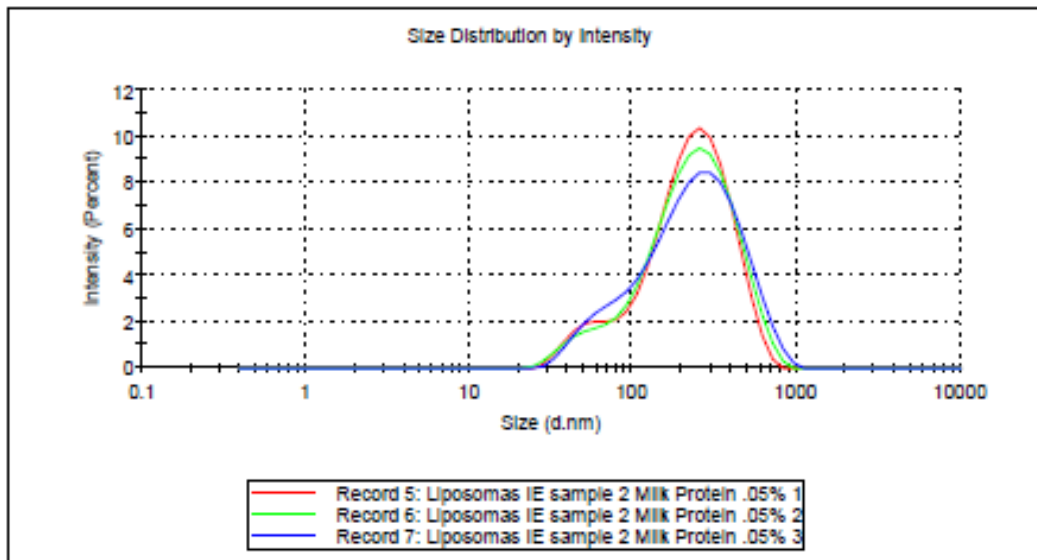
<b>File Name:</b> Liposomas IE 01112017 ...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 5	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> miércoles, 1 de noviembre ...

**System**

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 60
<b>Count Rate (kcps):</b> 417,5	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 11

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 178,9	<b>Peak 1:</b> 242,0	100,0	133,1
<b>Pdl:</b> 0,303	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,931	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good


### Sample Details

Sample Name: Liposomas IE sample 3 Milk Protein .05% 1

SOP Name: Liposomas FR\_ Size.sop

General Notes:

File Name: Liposomas IE 01112017 ...	Dispersant Name: Water
Record Number: 11	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,52	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,000	Measurement Date and Time: miércoles, 1 de noviembre ...

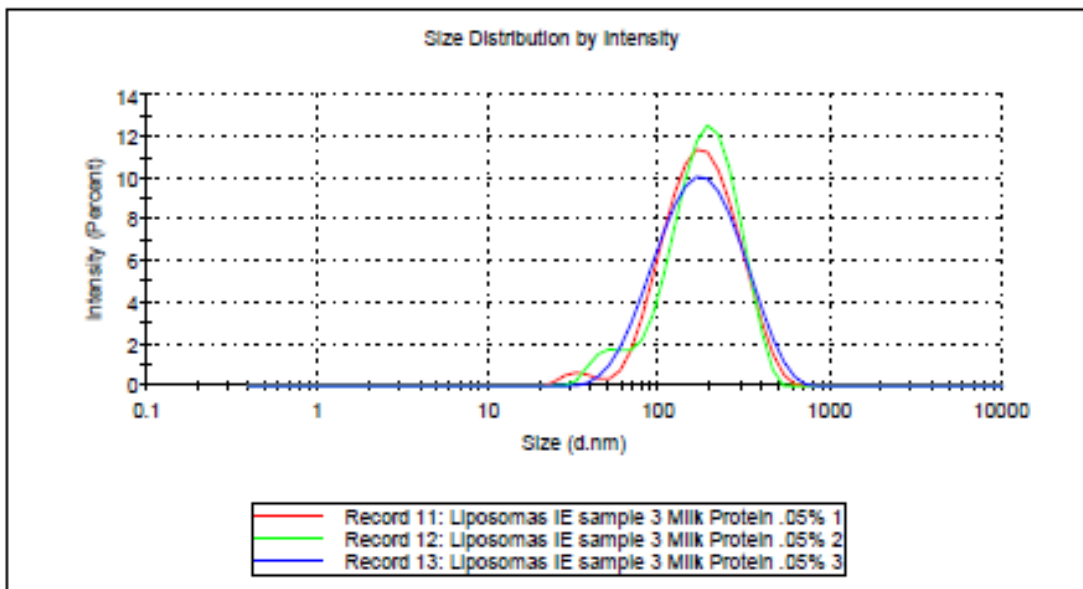
### System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 424,3	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 10

### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 149,1	<b>Peak 1:</b> 193,5	97,4	91,62
<b>Pdl:</b> 0,208	<b>Peak 2:</b> 36,08	2,6	7,921
<b>Intercept:</b> 0,940	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

Result quality **Good**



### Sample Details

**Sample Name:** Liposomas IE sample 4 Milk Protein 1.0% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas IE 01112017 ...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 14	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> miércoles, 1 de noviembre ...

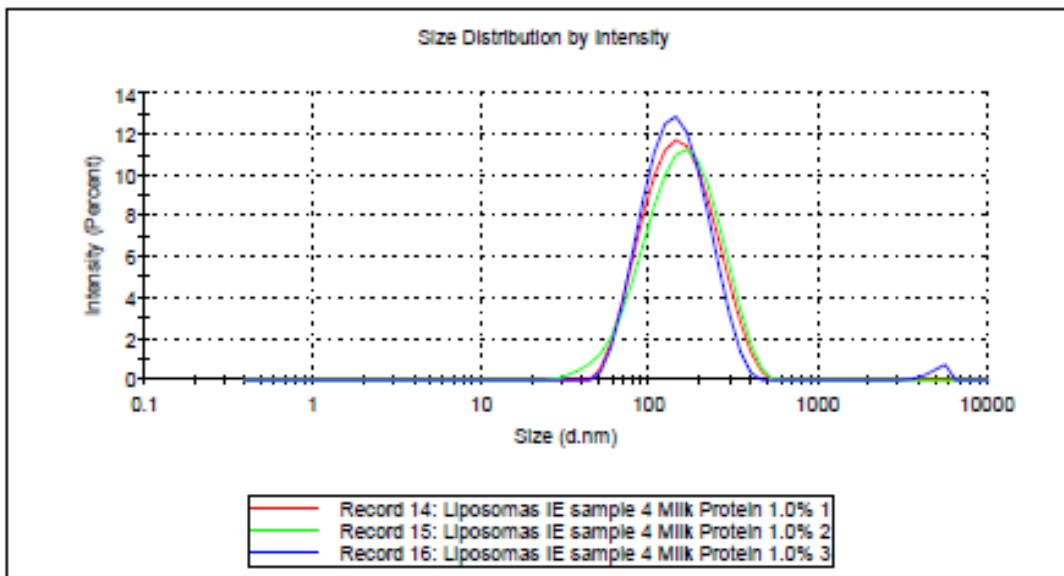
### System

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 60
<b>Count Rate (kcps):</b> 482,3	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 11

### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 133,7	<b>Peak 1:</b> 163,1	100,0	76,00
<b>Pdl:</b> 0,165	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,924	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



### Sample Details

**Sample Name:** Liposomas IE sample 5 Milk Protein 1.0% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas IE 01112017 ...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 20	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> miércoles, 1 de noviembre ...

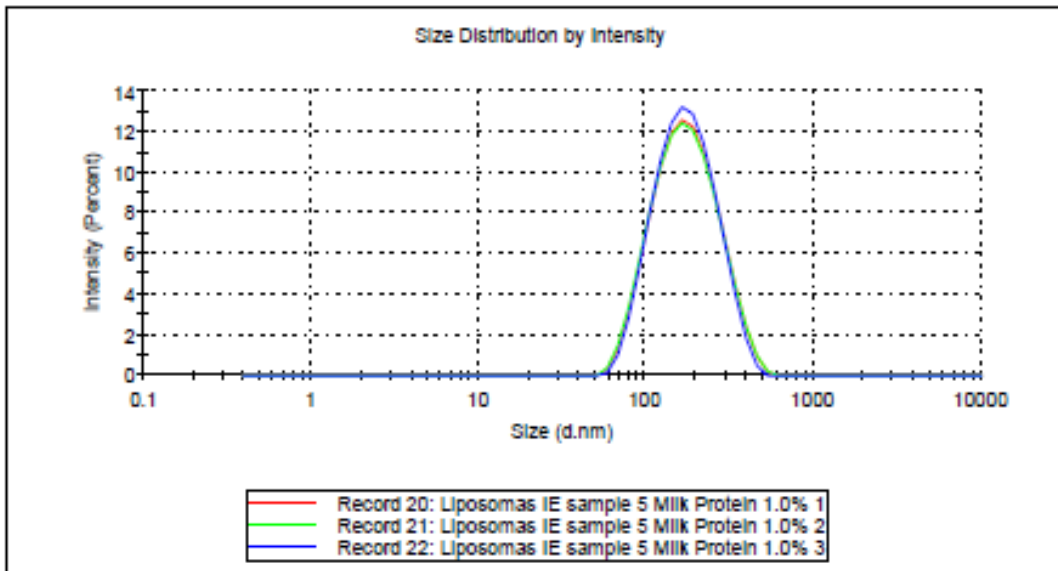
### System

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 60
<b>Count Rate (kcps):</b> 406,0	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 10

### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 152,8	<b>Peak 1:</b> 187,6	100,0	82,29
<b>Pdl:</b> 0,175	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,941	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



### Sample Details

**Sample Name:** Liposomas IE sample 6 Milk Protein 1.0% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas IE 01112017 ...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 23	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> miércoles, 1 de noviembre ...

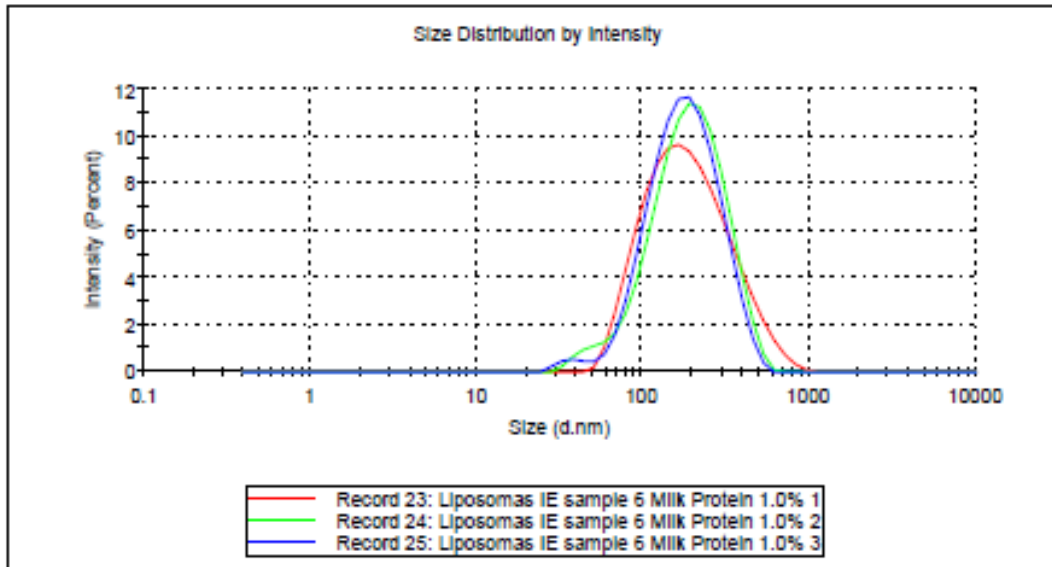
### System

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 110
<b>Count Rate (kcps):</b> 79,4	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 9

### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 157,9	<b>Peak 1:</b> 215,0	100,0	133,2
<b>Pdl:</b> 0,224	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,980	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good





**Sample Details**
**Sample Name:** Liposomas IE sample 7 Milk Protein 2.0% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas IE 01112017 ...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 29	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> jueves, 2 de noviembre de ...

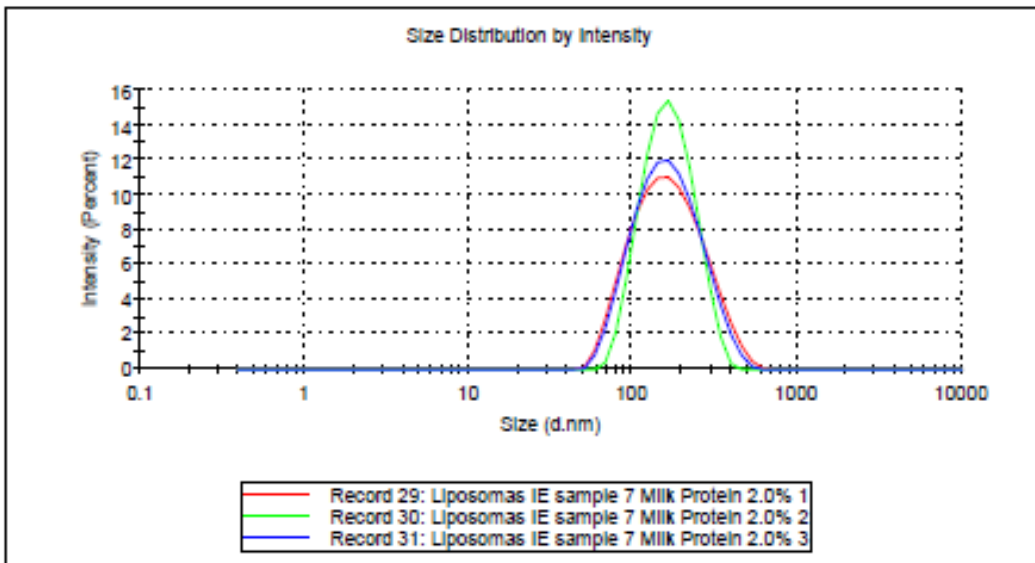
**System**

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 110
<b>Count Rate (kcps):</b> 79,9	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 9

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 145,9	<b>Peak 1:</b> 181,5	100,0	90,50
<b>Pdl:</b> 0,174	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,980	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



**Sample Details**
**Sample Name:** Liposomas IE sample 8 Milk Protein 2.0% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas IE 01112017 ...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 35	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> jueves, 2 de noviembre de ...

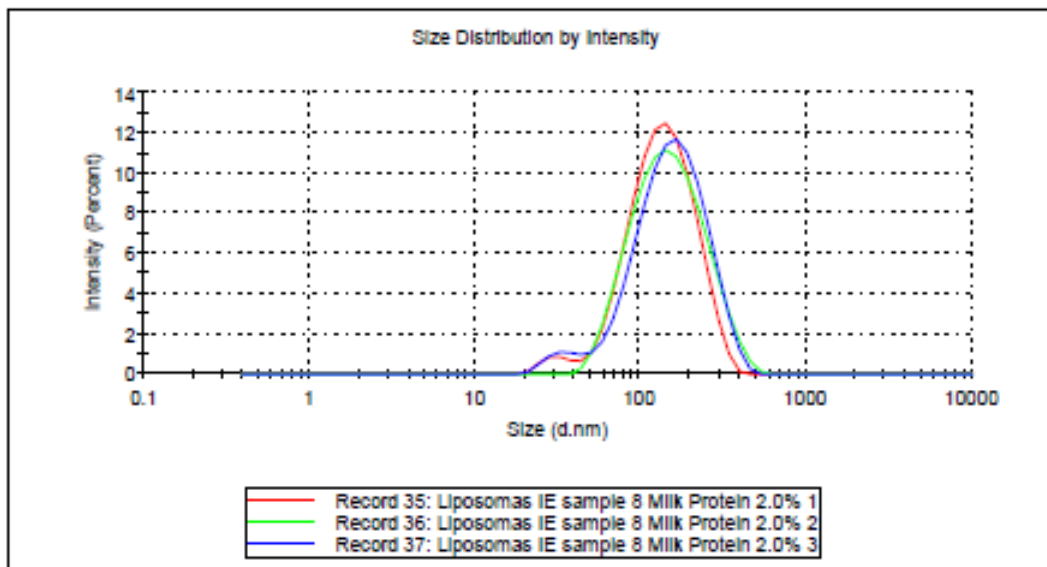
**System**

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 60
<b>Count Rate (kcps):</b> 246,9	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 10

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 115,4	<b>Peak 1:</b> 146,7	96,3	62,01
<b>Pdl:</b> 0,196	<b>Peak 2:</b> 32,92	3,7	6,793
<b>Intercept:</b> 0,958	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



**Sample Details**
**Sample Name:** Liposomas IE sample 8 Milk Protein 2.0% 1

**SOP Name:** Liposomas FR\_ Size.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> Liposomas IE 01112017 ...	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 35	<b>Dispersant RI:</b> 1,330
<b>Material RI:</b> 1,52	<b>Viscosity (cP):</b> 0,8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0,000	<b>Measurement Date and Time:</b> jueves, 2 de noviembre de ...

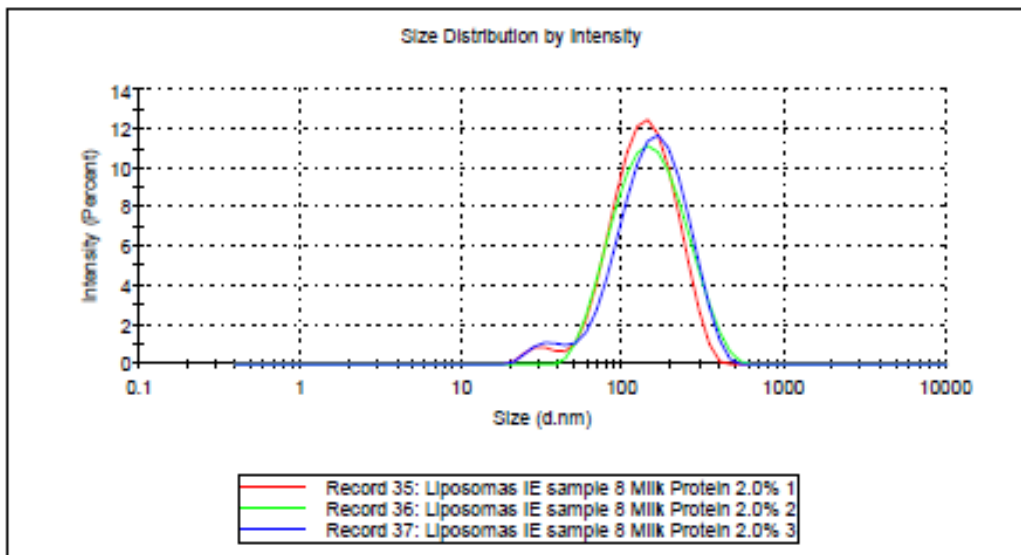
**System**

<b>Temperature (°C):</b> 25,0	<b>Duration Used (s):</b> 60
<b>Count Rate (kcps):</b> 246,9	<b>Measurement Position (mm):</b> 4,65
<b>Cell Description:</b> Disposable sizing cuvette	<b>Attenuator:</b> 10

**Results**

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 115,4	<b>Peak 1:</b> 146,7	96,3	62,01
<b>Pdl:</b> 0,196	<b>Peak 2:</b> 32,92	3,7	6,793
<b>Intercept:</b> 0,958	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



## 7 Referencias

1. Dr. Diana Howard. Structural Changes Associated with Aging Skin [En línea] <[http://www.dermalinstitute.com/us/library/11\\_article\\_Structural\\_Changes\\_AssociatAs\\_with\\_Aging\\_Skin.html](http://www.dermalinstitute.com/us/library/11_article_Structural_Changes_AssociatAs_with_Aging_Skin.html)> [Citado en 30 de abril de 2017]
2. Dickerson, E. et. al. (2014). Pharmaceutical Strategies for the Topical Dermal Delivery of Peptides / Proteins for Cosmetic and Therapeutic Applications. *Cancer Letters*, 269(1), 57–66. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.02.004>
3. Zhang, L., & Falla, T. J. (2009). Cosmeceuticals and peptides. *Clinics in Dermatology*, 27(5), 485–494. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.05.013>
4. Kara Vita. Key biactive ingredients. [En línea] <<http://www.karavita.com/aboutourproducts/keybioactiveingredients.aspx>> [Citado en 30 de abril de 2017].
5. Angel yeast. Natural cosmetic ingredients - Yeast Extract. [en línea] <<http://en.angelyeast.com/contents/1309/37817.html>> [Citado en 30 de abril de 2017].
6. Bouwstra, J. A., Honeywell-Nguyen, P. L., Gooris, G. S., & Ponec, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research* (Vol. 42). [http://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00028-0](http://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00028-0).
7. Marianecchi, C., et. al. (2016). Some recent advances on liposomal and niosomal vesicular carriers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32, 256–269. <http://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.10.008>
8. Shengfeng Peng, Liqiang Zou, Weilin Liu, Ziling Li, Wei Liu, Xiuting Hu, Xing Chen, Chengmei Liu. Hybrid liposomes composed of amphiphilic chitosan and phospholipid: Preparation, stability and bioavailability as a carrier for curcumin. *Carbohydrate Polymers*, Volume 156, 20 January 2017, Pages 322-332.
9. Sonia Alavi, Azadeh Haeri, Simin Dadashzadeh. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. *Carbohydrate Polymers*, Volume 157, 10 February 2017, Pages 991-1012

10. J.S. Dua, Prof. A. C. Rana, D. a. K. B. (2012). Review Article LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *Int J Pharm.*, III(II), 7. <http://doi.org/E-ISSN 2229-4619>.
11. Akbarzadeh, A. et al. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102. <http://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
12. Oselys Rodriguez Justo, Ângela Maria Moraes (2011). Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume, *Chemical Engineering Research and Design*, Volume 89, Issue 6, Pages 785-792, ISSN 0263-8762, <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2010.09.018>.
13. Catherine Charcosset, et. al. (2015). Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices, *Chemical Engineering Research and Design*, Volume 94, Pages 508-515, ISSN 0263-8762, <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.09.008>.
14. Nanosistemas lipídicos, DOLORES TORRES Y BEGOÑA SEIJO, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica., Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela
15. Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13: 238-252.
16. Perrie, Y. (2008) Gregory Gregoriadis: Introducing liposomes to drug delivery. *J. Drug Targ.* 16: 518-519.
17. Fenske, D.B., Chonn, A. & Cullis, P.R. (2008) Liposomes as Nanomedicines : an emerging field. *Toxicologic Pathology.* 36: 21-29.
18. Ehrlich, P. (1906) *Collected studies on Immunology.* John Wiley, New York, pp 442-447.
19. Takeuchi, H., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H. & Kawashima, Y. (2005) Effectiveness of submicron-sized chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *Int. J. Pharm.* 303: 160-170.
20. Wu, Z.H., Ping, Q.N., Wei, Y. & Lai, J.M. (2004) Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* 25: 966-972.
21. Maurer, N., Fenske, D.B. & Cullis, P.R. (2001) Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 923-947.

22. Simard, P., Leroux, J.C., Allen, C. & Meyer, O. (2007) Liposomes for drug delivery. En nanoparticles for Pharmaceutical Applications. Domb AJ, Tabata Y, Ravi Kumar MNV (eds). American Scientific Publishers, Stevenson Ranch California, pp 1-62.
23. El Magharaby, G.M., Barry, B.W. & Williams, A.C. (2008) Liposomas and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34: 203-222.
24. Cevc, G. (1996) Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration and transdermal drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 13: 257-388.
25. Azarmi, S., Roa, W.H. & Lobenberg, R. (2008) Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 863-875.
26. Lian, T. & Ho, R. (2001) Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 90: 667-680.
27. Saunders, L., Perrin, J. & Gammack, D.B. (1962) Ultrasonic irradiation of some phospholipid solutions. *J. Pharm. Pharmacol.* 14: 576-572.
28. Anvanti Polar lipids, Inc. Liposome Preparation  
<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>
29. FRANCIS SZOKA, JR., AND DEMETRIOS PAPAHAADJOPOULOS (1978) Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation.
30. Hydrolactin 2500, DC065, Croda Oleochemicals Personal Care 07/01 DC065/1
31. Hydrolactin 2500 , Croda Oleochemicals Personal Care LA\_137\_DS
32. NaturesPerformers\_Wall chart A2 USA\_ v3 – Croda.
33. Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56:675–711.
34. 124. Kale M, Suruse P, Singh R, Malhotra G, Raut P. Effect of Size Reduction Techniques on Doxorubicin Hydrochloride Loaded Liposomes. *Int J Biol Pharm Res.* 2012;3(3):308–16.
35. Hunter RJ. Zeta Potencial in colloids Science. Principles and Applications. 8th ed. London: ACADEMIC PRESS INC; 1988.
36. Preparation L. Size and zeta potential characterisation of anionic and cationic liposomes on the Zetasizer Nano. *Analysis.* :1–4.

37. Valenta C, Wanka M, Heidlas J. Evaluation of novel soya-lecithin formulations for dermal use containing ketoprofen as a model drug. *J Control Release*. 2000 Jan 3;63(1-2):165-73.
38. M.E. Laniao†, M.C. Luzardo, R. Labordea, O. Sáncheza, Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev. Cub. Física vol .26, No. 1 (2009) p 23-30*
39. Martha Leticia Vasquez, U de Barcelona, Desarrollo y Caracterización de liposomas para aplicación tópica de fármacos - 2015