



VIII Encuentro de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

CONTROL, ASEGURAMIENTO Y GESTIÓN DE CALIDAD FARMACÉUTICA



“Estandarización de un método fluorimétrico para determinar la encapsulación de proteínas en liposomas obtenidos por deshidratación-rehidratación”

Acosta-Castro Y.¹, Castillo-Llanes J.¹, Alvarez-Pérez G.T.², Merchán-Miliá A.Y.², Luzardo-Lorenzo M.C.¹

¹ Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, ²Departamento de Físico-Química, Dirección de Control de Calidad, Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba

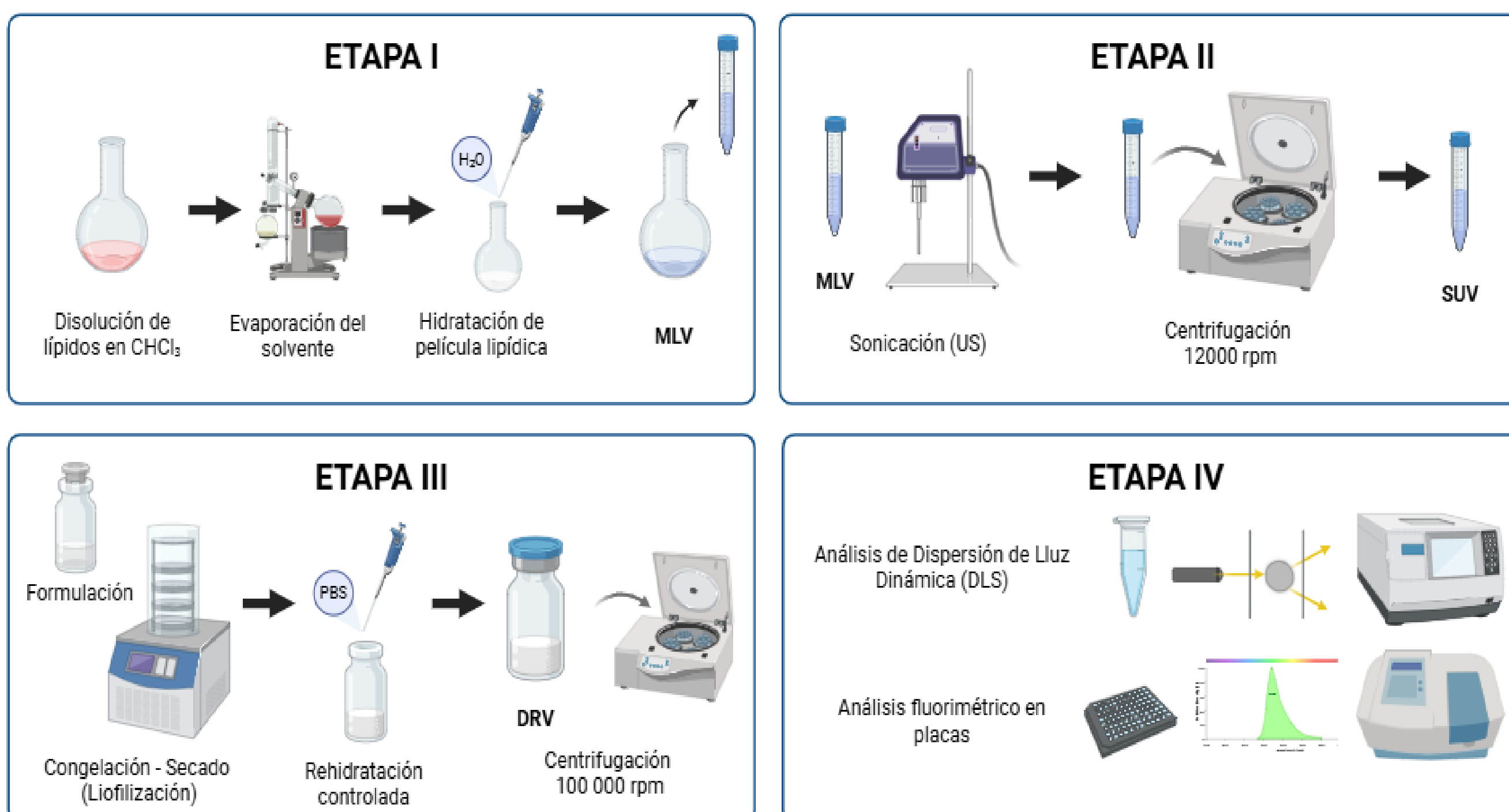
E-mail: yesdeluniversidad@gmail.com, mcluzardo@fbio.uh.cu

INTRODUCCIÓN (OBJETIVOS)

Los liposomas constituyen plataformas versátiles para la encapsulación y presentación de antígenos vacunales. Sin embargo, la determinación precisa de la eficiencia de encapsulación (EE) de proteínas marcadas con fluoróforos requiere un método de lisis estandarizado que garantice la liberación total del contenido liposomal sin interferir con la señal fluorimétrica (Cranfill *et al*, 2016). En este contexto, el **objetivo** del presente trabajo fue estandarizar y validar un método fluorimétrico para la determinación de la EE de proteínas marcadas con FITC en liposomas de DPPC:Col (1:1, mol:mol) obtenidos por el método de deshidratación-rehidratación, comparando el efecto de tritón X-100 y etanol en el rango de concentraciones de 0,1–5% sobre la integridad estructural liposomal, la cinética de liberación del fluoróforo encapsulado y la determinación de EE, con el fin de seleccionar las condiciones óptimas de agente, concentración y tiempo de incubación.

METODOLOGÍA

Proceso deshidratación-rehidratación para la obtención de liposomas



(Kirby & Gregoriadis, 1984; Zadi & Gregoriadis, 2000)

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PN3 “Plataforma vacunal basada en liposomas y proteínas formadoras de poros para potenciar la respuesta contra antígenos tumorales” (PN211LH008-064) y proyecto empresarial “Desarrollo de plataformas vacunales y sistemas de liberación de ácidos nucleicos basados en partículas lipídicas y las proteínas formadoras de poros, sticholisinas, de relevancia para la inmunoterapia del cáncer” (PNAP223UH-002-006) entre el Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana y el Centro de Inmunología Molecular.



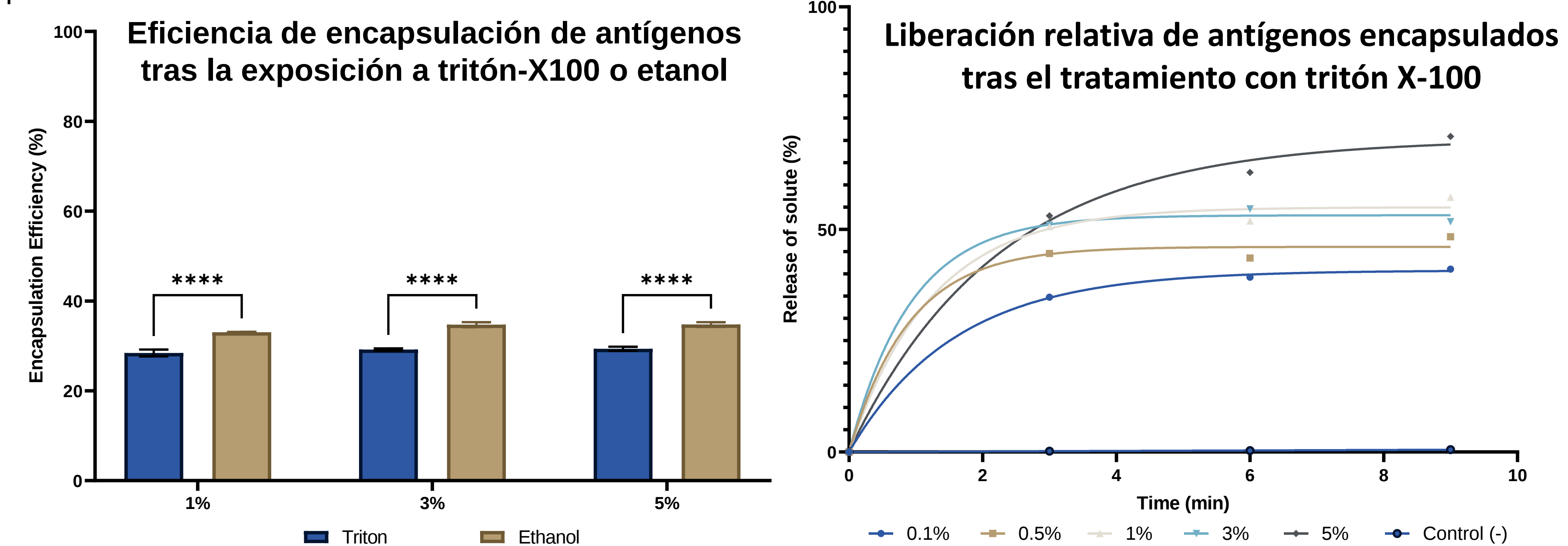
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diámetro, índice de polidispersidad (PDI), potencial zeta (PZ) y pH de liposomas tras la exposición a diferentes concentraciones de tritón X-100 y etanol

Tratamiento	Concentración (%)	Diámetro $\pm$ SD (nm)	PDI $\pm$ SD	PZ $\pm$ SD (mV)	pH $\pm$ SD
Control	0	161,10 $\pm$ 33,4 ^a	0,28 $\pm$ 0,02 ^a	-6,94 $\pm$ 1,31 ^d	6,54 $\pm$ 0,03 ^b
	0,1	9,04 $\pm$ 0,30 ^b	0,29 $\pm$ 0,02 ^a	-24,18 $\pm$ 0,67 ^a	6,73 $\pm$ 0,02 ^a
	0,5	9,10 $\pm$ 0,11 ^b	0,24 $\pm$ 0,01 ^a	-7,46 $\pm$ 1,06 ^d	6,73 $\pm$ 0,01 ^a
	1	9,40 $\pm$ 1,09 ^b	0,20 $\pm$ 0,02 ^a	-8,48 $\pm$ 0,73 ^d	6,67 $\pm$ 0,02 ^c
	3	9,73 $\pm$ 0,13 ^b	0,21 $\pm$ 0,02 ^a	-7,99 $\pm$ 1,11 ^d	6,66 $\pm$ 0,01 ^c
	5	9,86 $\pm$ 0,88 ^b	0,12 $\pm$ 0,02 ^b	-5,04 $\pm$ 1,27 ^d	6,71 $\pm$ 0,03 ^{ac}
Tritón	0,1	171,30 $\pm$ 7,90 ^a	0,25 $\pm$ 0,03 ^a	-16,54 $\pm$ 1,08 ^{bc}	6,14 $\pm$ 0,04 ^f
	0,5	179,10 $\pm$ 20,24 ^a	0,27 $\pm$ 0,02 ^a	-19,77 $\pm$ 1,79 ^b	6,16 $\pm$ 0,01 ^f
	1	178,10 $\pm$ 9,70 ^a	0,24 $\pm$ 0,04 ^a	-15,52 $\pm$ 0,87 ^c	6,17 $\pm$ 0,02 ^f
	3	173,80 $\pm$ 15,38 ^a	0,25 $\pm$ 0,01 ^a	-13,67 $\pm$ 1,31 ^c	6,25 $\pm$ 0,01 ^e
	5	184,4 $\pm$ 2,90 ^a	0,25 $\pm$ 0,02 ^a	-23,70 $\pm$ 0,63 ^a	6,31 $\pm$ 0,02 ^d

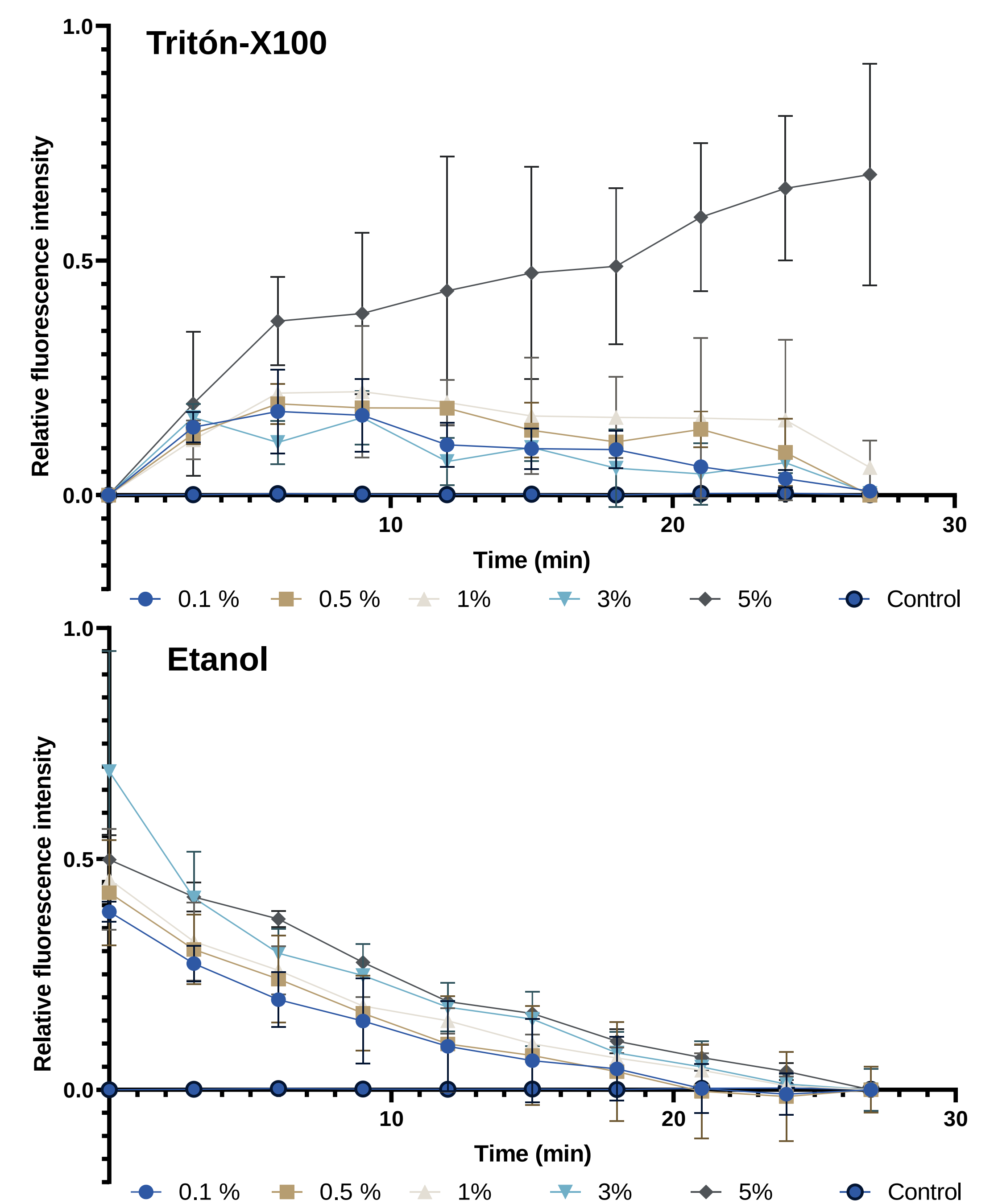
(ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey, $\alpha = 0,05$).

Los resultados demuestran que tritón X-100 y etanol actúan mediante mecanismos distintos sobre la bicapa lipídica. La reducción del diámetro con tritón X-100, independiente de la concentración, es consistente con el modelo clásico de solubilización por detergentes. La ausencia de cambios en el diámetro con las concentraciones evaluadas de etanol indica que este no solubiliza las bicapas en micelas, en concordancia con su mecanismo de acción como perturbador de la fluidez y del empaquetamiento de los fosfolípidos. El análisis temporal de la señal de fluorescencia puso de manifiesto diferencias cinéticas. Con tritón X-100 se observó un patrón que refleja la liberación progresiva del fluoróforo encapsulado y su posterior degradación fotoquímica por exposición continua al haz de excitación. Con etanol, la fluorescencia mostró una disminución desde el primer punto de medición, lo que sugiere que la totalidad de la liberación del soluto ocurrió antes de la primera lectura instrumental.



La mayor eficiencia de encapsulación registrada con etanol se explica porque la liberación inducida por tritón X-100 es dependiente del tiempo. A todas las concentraciones ensayadas se necesitan al menos 6 minutos para alcanzar la meseta de liberación, la cual a su vez es dependiente de la concentración.

Cinética de fluorescencia de liposomas que contienen proteínas marcadas bajo diferentes tratamientos



CONCLUSIÓN

El etanol no resulta adecuado como agente disruptor; en tanto, el tritón X-100 al 5% con 6-10 min de incubación, constituye el protocolo óptimo para determinar la EE en este sistema liposomal, ofreciendo mayor liberación, cinética predecible y ausencia de agregados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cranfill PJ, Sell BR, Baird MA, Allen JR, Lavagnino Z, de Gruiter HM, et al. Quantitative assessment of fluorescent proteins. Nat Methods [Internet]. julio de 2016 [citado 26 de mayo de 2026];13(7):557-62.
- Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles (DRV): A new method for high yield drug entrapment in liposomes. 2, 979-984. Biotechnology. 1984;2:979-84.
- Zadi B, Gregoriadis G. Studies on size reduction of liposomes and their stabilization. 2000.